

第7回細管・等速電気泳動分析シンポジウム

講演要旨集

- 主 催 イソタコ研究会
- 共 催 日本分析化学会，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
- 日 時 昭和 62 年 12 月 10 日（木） 13：00 ～ 17：30
昭和 62 年 12 月 11 日（金） 9：00 ～ 16：30
- 会 場 東京都立大学学館ホール
東京都目黒区八雲 1 丁目 1-1 東京都立大学目黒校舎

ISOTACHOPHORESIS SYMPOSIUM

第7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7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10日(木)

(13:00から)	開 会	城西大・理・化学	小林英三郎	
1.	細管式電気泳動法によるイオン分子量の推定(5)β-ラクタム系抗生物質の分子体積とRE値	九大・医・付属病院 薬剤部 九大・歯・付属病院 薬剤部*	○平川雅章・藤下 修 樋口 駿・大坪健司 青山敏信・唐沢博順*	… 1
2.	等速電気泳動法における分離過程の解析(I I)	広大・工・応用 理化学	○中原 清・広川 健 木曾義之	… 3
3.	分離繰り返し装置を備えた等速電気泳動装置の開発	広大・工・応用 理化学	○広川 健・横田康朗 高羽 均・木曾義之	… 5
4.	細管式等速電気泳動装置用のPG-UVハイブリッド型検出器の開発	城西大・理・化学	○小林英三郎	… 7
5.	キャピラリー電気泳動の全自動化	都立大・理・化学	○山本秀子・真鍋 敬 奥山典生	… 9
6.	細胞電気泳動の開発	島津・バイオ機器部	藤井英彦	… 11
(15:15~15:30)		休 憩		
(15:30から)				
7.	細管式等速電気泳動法による染料関連物質の分析(2)メチレンブルーの光安定化に及ぼすシクロデキストリンの包接作用とその電気泳動挙動	大阪府・工技研	蔵本暢浩	… 13
8.	等速電気泳動法による高温超伝導物質(Y-Ba-Cu)の分離定量	工業技術院・ 電子技術総合研	○金子啓二・金子浩子	… 15
9.	細管式等速電気泳動法による海水中のカリウムイオンの定量	神戸商船大・ 付属船貨輸送研 工業技術院・ 大阪工業試験所*	○福士恵一・日色和夫*	… 17
10.	細管式等速電気泳動法による食品中のアントシアニンの定性分析について	共立女子短大	津田淑江	… 19
11.	細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用(第11報)金属イオンを含むリーディング液を用いたときの芍薬煎液成分の分離挙動	徳島文理大・薬学部	○香西重忠・赤田良信	… 21

懇 親 会

第2日 12月11日(金)

(9:00から)

- | | | |
|--|----------------------------|----------------------------------|
| 1 2. 細管式等速電気泳動法による抗てんかん剤の分析 | 島津・応用技術部
京都市立児童福祉センター* | ○児島佳世子・近藤和子*... 23
伊藤賢治* |
| 1 3. 細管式等速電気泳動による腎臓透析患者血清中酸性物質の定性 | 島津・応用技術部 | ○日根 隆・八木孝夫 ... 25 |
| 1 4. 細管式等速電気泳動法による各種中枢神経系疾患髄液中グルタミンの定量 | 杏林大・保健学部
国立千葉病院
神経科* | ○平岡 厚・三浦勇夫 ... 27
富永 格*・服部宗和* |
| 1 5. D, L-Propargylglycineを投与したラットの各種臓器中のCystathionineとN-Ac-cystathionineの定量 | 高知医大・化学 | ○溝淵詔子・揚田富子 ... 29
児玉裕敬 |

(10:20~10:30)

休 憩

(10:30から)

- | | | |
|--|---------------|---------------------------|
| 1 6. PG微分法による等速電気泳動図の解析(2)発光細菌のタンパク質の分析 | 城西大・理・化学 | ○小林英三郎・伊藤幸代... 31 |
| 1 7. 細管式等速電気泳動法による網膜機能低下モデルの涙液蛋白の研究と電気生理学的利用 | 東レ・基礎研・安全性研究室 | 奥泉仁一 ... 33 |
| 1 8. 細管式等速電気泳動法によるヒト血清の分析 | 新潟大・医・法医学教室 | ○山内春夫・小野政孝 ... 35 |
| 1 9. 細管式等速電気泳動法による血清トランスフェリンの比較生物学的研究 | 専修大学・法学部生理学 | 吉田治弘 ... 37 |
| 2 0. タンパク質の等速電気泳動におけるデータ評価 | 都立大・理・化学 | ○真鍋 敬・山本秀子 ... 39
奥山典生 |

(12:10~13:40)

昼 休 み

(13:40から)

特別講演

キャピラリーゾーン電気泳動法および電気クロマトグラフィー

名工大・工 津田孝雄 ... 41

(14:40から)

- | | | |
|---|-----------------------------|--|
| 2 1. 界面動電クロマトグラフィー用微量試料注入法 | 横河電気(株)・科学技術部 | ○久世秀一・井上嘉則 ... 45
村本節夫・花岡 譲 |
| 2 2. キャピラリー電気泳動法による分離分析(6):ポリアミンについて(I I) | 名工大・工
名大・医*
浜松医科大・医** | ○津田孝雄・小林泰文 ... 47
松本隆利*・堀 明洋*
鈴木 修** |

(15:20~15:30)

休 憩

- | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 2 3. Application of capillary electrophoresis to the separation of Plasmid, Phage, and other viral DNA's | Microphoretic system, Inc. U.S.A. | ○R. Brownlee and M. Melara ... 49 |
| 2 4. 毛細管ゾーン電気泳動によるEDTA類似キレート試薬の分離 | 京大工・工化 | ○八島利幸・寺部 茂 ... 51 |
| 2 5. キャピラリーゾーン電気泳動における有機溶媒の効果 | 鐘紡薬品研究所
近畿大・薬学部* | ○本田 進*・藤原 茂 ... 53 |

閉 会

広大・工
応用理化学

木曾義之

THE 7TH SYMPOSIUM FOR CAPILLARY AND ISOTACHOPHORESIS

December 10–11, 1987, TOKYO JAPAN

Organizer: Japan Discussion Group of Isotachophoresis

PROGRAM

Dec. 10 Afternoon (13:00)

- | | | |
|--|--|--|
| 1. Estimation of the molecular weight of ions by isotachophoresis. V. Molecular volume and RE value of β -lactam antibiotic. | M. Hirakawa, O. Fujishita, S. Higuchi, K. Ohtsubo, T. Aoyama and H. Karasawa | Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine Kyushu University and Hospital Pharmacy, Faculty of Dental Kyushu University |
| 2. Analysis of separation process in isotachophoresis(II). | K. Nakahara, T. Hirokawa and Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering Hiroshima University |
| 3. Development of isotachophoretic analyzer with a separation repeater under different electrolyte conditions. | T. Hirokawa, Y. Yokota, H. Takaba and Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering Hiroshima University |
| 4. Development of PG-UV hybrid detector for capillary-type isotachophoretic analyzer. | H. Kobayashi | Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University |
| 5. Completely automated apparatus for capillary electrophoresis. | H. Yamamoto, T. Manabe and T. Okuyama | Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University |
| 6. Development of cell electrophoresis. | H. Fujii | Biotechnology Instruments department, Shimadzu Corporation |
| 7. Determination of dyes and related materials by isotachophoresis. (2) Complexing effect of cyclodextrin on the photostabilization of methylene blue and it's isotachophoretic behavior. | N. Kuramoto | Osaka Prefectural Industrial Research Institute |
| 8. Determination of superconducting materials (Y-Ba-Cu) By isotachophoresis. | K. Kaneko and H. Kaneko | Electrotechnical Laboratory |
| 9. Determination of potassium ion in seawater by capillary type isotachophoresis. | K. Fukushi and K. Hiiro | Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine and Government Industrial Research Institute, Osaka |
| 10. Qualitative analysis of antocyanins in food-stuffs by isotachophoresis. | T. Tsuda | Kyoritu Women's University |
| 11. Application for capillary-type isotachophoresis to pharmaceutical analysis (XI). Separation behavior of ionic components in Peony root decoction make use of leading electrolyte containing metal ion. | S. Kouzai and Y. Akada | Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University |

Dec. 11 Morning (9:00)

- | | | | |
|-----|---|--|--|
| 12. | Analysis of anticonvulsant by isotachopheresis. | K. Kojima, K. Kondo and K. Ito | Analytical application department, Shimadzu Corporation and Children's Welfare Center of Kyoto City Office |
| 13. | Qualitative analysis of acidic compounds in serum of hemodialyzed blood by capillary-type isotachopheresis. | T. Hine and T. Yagi | Analytical application department Shimadzu Corporation |
| 14. | Capillary isotachopheretic determination of glutamine in cerebrospinal fluid of various central nervous system diseases. | A. Hiraoka, I. Miura, I. Tominaga and M. Hattori | Kyorin University School of Health Sciences and Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital |
| 15. | Determination of cystathionine and NAc-cystathionine in various tissues of D, L-propargylglycine-treated rats. | N. Mizofuti, T. Ageta and H. Kodama | Department of chemistry, Kochi Medical School |
| 16. | Analysis of isotachopherogram by PG differentiation. (2) Analysis of luminous bacterial proteins. | H. Kobayashi and Y. Ito | Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University |
| 17. | Electrophysiological change in the retina of guinea pig and studies on tear proteins of animal model by isotachopheresis. | J. Okuizumi | Toray Industries Inc. Basic Research Laboratories Toxicology Laboratory |
| 18. | Analysis of human serum by capillary-type isotachopheresis. | H. Yamanouchi and M. Ono | Department of Legal Medicine, Niigata University School of Medicine |
| 19. | Comparative biological studies of serum transferrin by capillary tube type isotachopheresis. | H. Yoshida | Laboratory of Physiology, Senshu University |
| 20. | Data evaluation in isotachopheresis of proteins. | T. Manabe, H. Yamamoto and T. Okuyama | Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University |

Dec. 11 Afternoon (13:50)

SPECIAL LECTURE

- | | | | |
|-----|---|---|--|
| | Capillary zone electrophoresis and electrochromatography. | T. Tsuda | Nagoya Institute of Technology |
| 21. | Studies on injection method for capillary electrokinetic chromatography. | S. Kuze, Y. Inoue, S. Muramoto and Y. Hanaoka | Yokogawa Electric Corporation |
| 22. | Capillary zone electrophoresis. (6) Polyamines in human fluids(II). | T. Tsuda, Y. Kobayashi, T. Matsumoto, A. Hori and O. Suzuki | Nagoya Institute of Technology, Nagoya University School of Medicine and Hamamatsu University School of Medicine |
| 23. | Application of capillary electrophoresis to the separation of Plasmid, Phage and other viral DNA's. | R. Brownlee and M. Melara | Microphoretic System, Inc. U.S.A. |
| 24. | Separation of chelating reagents of EDTA analogs by capillary zone electrophoresis. | T. Yashima and S. Terabe | Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University |
| 25. | Effect of organic solvents in capillary zone electrophoresis. | S. Fujiwara and S. Honda | Pharmaceuticals Research Center, Kanebo Ltd. and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University |

1 細管式等速電気泳動法によるイオン分子量の推定(5)

β -ラクタム系抗生物質の分子体積と R_E 値

(九大病院・薬剤部) ○平川 雅章、藤下 修、樋口 駿、
大坪 健司、青山 敏信 (九大歯病院・薬剤部) 唐沢 博順

【緒言】

前回、¹⁾ 演者らは比重の不明な有機系イオン性物質について、その示性式または構造式から分子体積を計算し、絶対移動度 m_0 あるいは細管式等速電気泳動における定性の指標 R_E 値を求める式を報告した。今回は、アミノ酸、ジペプチド、および現在、治療に繁用されているペプチド系の β -ラクタム系抗生物質について検討した。

【計算】

アミノ酸²⁾ およびジペプチド³⁾ の m_0 は広川らが報告した値を用い、 β -ラクタム系抗生物質の R_E 値は下記の実験により求めた。また、それぞれの分子体積は Bondi⁴⁾ が報告した van der Waals Volume V_W (cm^3/mole) の値を $\text{\AA}^3/\text{個}$ 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。

【実験】

装置：細管式等速電気泳動装置(島津IP-1B), 検出器：電位勾配検出器, 泳動電流：100 μA ,
リーディング液：0.01M HCl-アメジオール (pH_L 8.6), ターミナル液：0.01M β アラニン-
水酸化バリウム (pH 11.4), 試料：Cefalotin (CET, pKa=3.60 \pm 0.13), Cefazolin (CEZ, pKa=
2.1), Cefapirin (CEPR, pKa=約5.3), Cefotaxime (CTX, pKa=約3.4), Cefmetazole (CMZ,
pKa=2.34) の各 β -ラクタム系抗生物質

【結果および考察】

[1] アミノ酸：広川らはアミノ酸について、絶対移動度 m_0 と分子量 $M^{1/2}$ との間の相関係数を 0.69 (N=22)、そして Cys, Tau, Tyr を除いた場合で 0.82 と報告しているが³⁾ 2価のアミノ酸 (Asp, Cys, Glu, tyr) の電荷を考慮した場合、⁵⁾ m_0 と分子体積 $V^{2/3}$ との間には次ような相関が得られた。

(1) 上記の2価のアミノ酸の、2価の場合の m_0 を用いて計算した場合

$$m_0 = 7.4 + 530.4 Z/V^{2/3} \quad r=0.955 \quad (N=22)$$

(2) 2価のアミノ酸の1価と2価の場合の m_0 を用いて計算した場合

$$m_0 = 6.2 + 546.7 Z/V^{2/3} \quad r=0.950 \quad (N=26)$$

[2] ジペプチド：広川らはジペプチドについて、2価のジペプチド (Gly-Tyr, Ley-Tyr) を除いた場合の絶対移動度 m_0 と $M^{1/2}$ との間の相関について、 $m_0 = 3.4 + 306.9 M^{1/2}$ ($r=0.94, N=26$) と報告している。³⁾ 2価のものを含めた場合の m_0 と分子体積 $V^{2/3}$ との相関は以下ようになった。

(1) 上記の2価のジペプチドの2価の場合の m_0 を含めて計算した場合

$$m_0 = 7.6 + 570.5 Z/V^{2/3} \quad r=0.985 \quad (N=28)$$

(2) 2価のジペプチドの1価と2価の場合の m_0 を含めて計算した場合

$$m_0 = 6.4 + 602.9 Z/V^{2/3} \quad r=0.968 \quad (N=30)$$

上記のアミノ酸の分子量/分子体積 (M/V) の比はその平均 \pm SD が 1.096 ± 0.067 ($\text{g}/6.02 \times 10^{23} \text{\AA}^3, N=22$)、ジペプチドの M/V の比も 1.067 ± 0.050 ($N=28$) となったが、その理由は、これらの中に比重の大きなハロゲン基など⁶⁾ をもつ Diiodo-tyrosine (I_2 -Tyr, M/V 比=1.936) のようなものが含まれていないためと考えられる。従って、このように比重の大きいものを含まないアミノ酸やペプチドの系では絶対移動度 m_0 は分子量

るいは分子体積のどちらからも推定が可能と考えられる。

[3] β -ラクタム系抗生物質

前述の条件における各抗生物質の R_E 値および分子体積は以下の表のようになった。

Antibiotics	$R_E \pm SD$	$V(\text{\AA})^3$	$m_o^a)$	$m_o^b)$
CET	4.09 \pm 0.14 (N=4)	308.64	19.3	19.0
CEZ	4.37 \pm 0.21 (N=3)	326.58	18.1	18.6
CEPR	4.34 \pm 0.40 (N=4)	329.21	18.2	18.5
CTX	4.38 \pm 0.05 (N=4)	344.01	18.1	18.2
CMZ	4.55 \pm 0.10 (N=5)	354.13	17.4	18.0

これらの値から R_E 値と分子体積 V との相関式を求めると次のようになった。

$$R_E = -0.08 + 0.092 V^{2/3} / Z \quad r=0.939 \quad (N=5)$$

pH_L (リーディング液の pH)の条件をかえた場合の電荷を計算すれば、この式によってそれぞれの条件での R_E 値($pH_L - R_E$ 曲線)を求めることができる。⁶⁾

これらの抗生物質の各 pK_a と $pH_L=8.6$ という条件から、それぞれの電荷は最大の状態($Z=1$)であり、従って、 R_E 値は最少であるから、各抗生物質のおおよその移動度は $m_o \approx m_{o,cl} / R_E = 79.08 / R_E$ で求められる。⁶⁾表にその値 $m_o^a)$ を示した。

また、 β -ラクタム系抗生物質の基本骨格である β -ラクタム環は、cystine や valine で構成されていることから、⁷⁾ これらの移動度は [1] の (1) または (2) の式から推測が可能と考えられる。表に [1] の (1) 式から求めた値 $m_o^b)$ を示したが、 $m_o^a)$ とかなり近い値が得られた。

データ数が少ないが、以下にこれらの抗生物質の $m_o^a)$ と分子体積 $V^{2/3}$ との相関式を示す。

(1) β -ラクタム系抗生物質のみの場合

$$m_o = 0.1 + 867.6 Z / V^{2/3} \quad r=0.932 \quad (N=5)$$

(2) cystine (2価のデータ) と valine のデータ²⁾ を加えた場合

$$m_o = 7.6 + 508.6 Z / V^{2/3} \quad r=0.999 \quad (N=7)$$

(3) cystine (1価と2価のデータ) と valine のデータ²⁾ を加えた場合

$$m_o = 7.4 + 499.8 Z / V^{2/3} \quad r=0.994 \quad (N=8)$$

【謝辞】

本研究を行うにあたり、有益な助言をいただいた広島大学工学部の広川健博士に感謝の意を表します。

【文献】

- 1) 第6回等速電気泳動シンポジウム, 名古屋, 1986年12月, pp. 1-2.
- 2) T. Hirokawa, T. Gojo, Y. Kiso, J. Chromatogr., 369, 59 (1986).
- 3) T. Hirokawa, T. Gojo, Y. Kiso, J. Chromatogr., 390, 201 (1987).
- 4) A. Bondi, J. Phys. Chem., 68, 441 (1964).
- 5) O. Fujishita et al., Chem. Pharm. Bull., 34, 1344 (1986).
- 6) O. Fujishita et al., Chem. Pharm. Bull., 34, 5026 (1986).
- 7) Biochem. J., 84, 157 (1962), Ibid., 86, 280 (1963), Ibid., 86, 284 (1963).

2 3 2チャンネルUV検出装置による分離過程の解析(2)

(広島大工) 中原清、広川健、木曾義之

1. 第6回等速電気泳動シンポジウムに於て演者らは等速電気泳動法における分離過程の解析のために製作した3 2チャンネルUV検出装置の基本性能について報告した。¹⁾ その後装置に改良を加え分解能を向上させた結果、より高精度で分離時間、界面速度などを測定できるようになった。また前回の報告で使用した3成分系解析モデルは隣あった2成分にのみ着目したモデルであったが、その後実験結果をもとに解析法を吟味し、今回初めて3成分系のシミュレーションが可能となった。本講演では、混合ゾーンの解消時間等が定常状態のシミュレーションより得られた濃度などより簡単に算出できる事を示すと共に、2および3成分系の分離過程についてシミュレーションと実験結果を比較検討した結果について報告する。

2. 検出装置自体は前回報告したものとほぼ同一であるが、データ取り込みを高速化し、分解能を向上させた。現在3 2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0.263秒である。測定データを微分して界面位置を決定し、各チャンネルでの界面位置と時間のデータにもとずき最小二乗法を行なって界面速度を算出している。

使用したリーディング電解液(L)は5 mM HClで、緩衝剤としてはβ-アラニン(pH = 3.6)およびε-アミノカブロン酸(pH = 4.4)を使用した。ターミナル液(T)としては10 mMカブロン酸を使用した。試料としてはSPADNS、モノクロロ酢酸、ピクリン酸を上記の緩衝剤でpH調整して使用した。なお試料はL/T界面近傍のT側に注入したが、試料のpHが注入時に変化しないようT液のpHは試料と同一にした。またL、TともにHPCを添加したが通常の0.02%程度では電気浸透流により界面速度が不安定であったので0.2%とした。なお本装置を使用して得られたデータをコンピューター処理してピクリン酸の検出限界を検討したところ、10 pmolまで定量的に検出可能であった(L: 2.5 mM HCl)。

3. 図-1は2成分系の分離過程の模式図である。本装置を使用して詳細に検討したところ、L/A、A/BおよびB/T界面は実験誤差範囲内で平行であること(等速泳動)に加えて、L/A、A/AB、AB/B、B/T界面の移動を表わす方程式は図-1に示したように時間に対して1次である事、L/AとA/ABの切片、AB/B、B/Tの切片が一致し、図-1の点線のようにになっている事が実験的に確認された。この実験事実から混合ゾーンM内のA、B、カウンターイオンQの濃度が定常状態における濃度と次式のように関連している事が明かである。

$$C_{A,M}^t = l_A / (l_A + l_B) \cdot C_A^t$$

$$C_{B,M}^t = l_B / (l_A + l_B) \cdot C_B^t \quad (1)$$

$$C_{Q,M}^t = (C_{Q,A}^t l_A + C_{Q,B}^t l_B) / (l_A + l_B) \quad L_x$$

ここで l_A および l_B は定常状態におけるゾーン長である。

一方試料の分離時間(t_{res})は

$$t_{res,A} = l_A / (E_L m_L - E_M m_{B,M}) \quad (2)$$

$$t_{res,B} = l_B / (E_M m_{A,M} - E_L m_L) \quad (3)$$

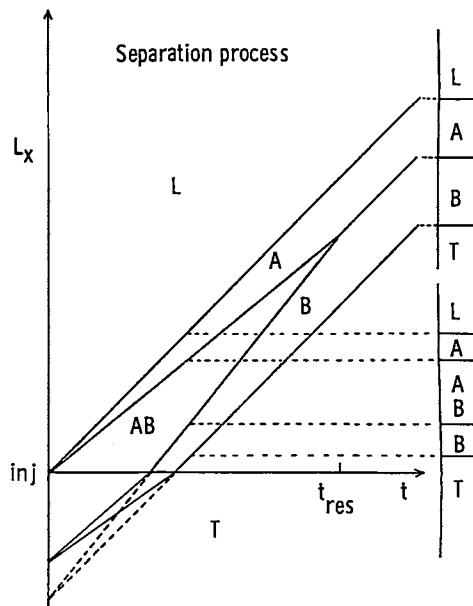
ここでEは各ゾーンの電位勾配、mは実効移動度である($E_L m_L$ は等速電気泳動速度)。2成分系においては $t_{res,A} = t_{res,B}$ が成立しなければならないので両者を等しいとおくと、

図-1 2成分系の分離過程

L : リーディングゾーン、 A, B : 試料ゾーン

AB : 混合ゾーン、 T : ターミナルゾーン

t_{res} : 分離時間 I : 注入した試料



$$E_M = (l_A + l_B) E_{LM} / (l_{AM} + l_{BM}) \quad (4)$$

以上の式を同時に満足するpHが一点だけ存在し、そのpHが混合ゾーンのpHである。以上の簡単な式の重要な意義は混合ゾーンの濃度等の諸量が定常状態により記述できること、換言すれば混合ゾーンの諸量は注入した試料の初期状態とは無関係であることを示している点である。1-4式と同様な式が多成分系についても成立する。

図-2に3成分系について測定された分離過程のイソタコフェログラムを示した。試料はSPADNS、モノクロ酢酸、ピクリン酸で、モル比1:1:1と1:2:1の場合について示した。また表-1に2、3成分系の界面移動速度を、表-2に分離時間の実測とシミュレーションの結果を示した。表より明らかなように2成分系のみならず3成分系においても実測値と理論値は良く一致し、今回の解析法が妥当であることが確認できた。

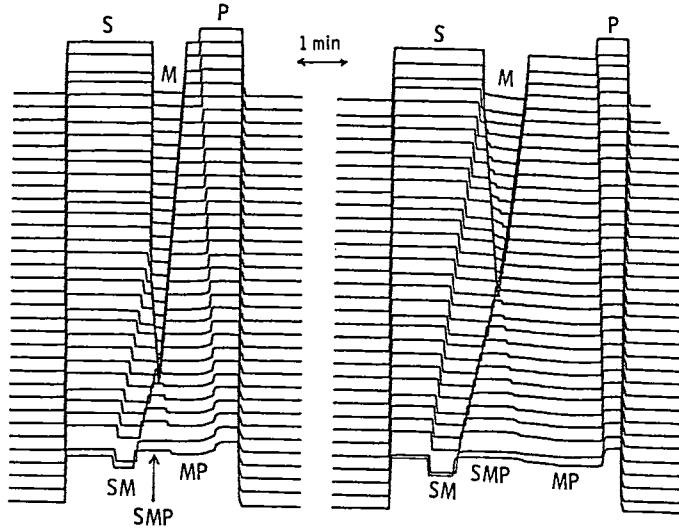


図-2 32チャンネルUV検出装置による
実測イソタコフェログラム
(1-32チャンネル間の距離: 161mm)

S: SPADNS、M: モノクロ酢酸、
P: ピクリン酸
SM、SMP、MPは混合ゾーン

リーディング電解液: 5mM HCl
pH=3.6 (β-アラニン)
ターミナル液: 10mM カブロン酸
泳動電流 49.2 μA

表-1 界面移動速度 ($\times 10^2 / \text{cmsec}^{-1}$) と分離時間
S: SPADNS、M: モノクロ酢酸、P: ピクリン酸

界面	S: M = 1: 1 界面速度		M: P = 1: 1 界面速度		S: M: P = 1: 1: 1 界面速度	
	実測値	理論値	実測値	理論値	実測値	理論値
L / S	2.69	2.69	-	-	2.66	2.69
L / M	-	-	2.66	2.69	-	-
S / SM	2.09	2.17	-	-	2.15	2.23
SM / M	2.99	2.99	-	-	3.02	3.09
SM / SMP	-	-	-	-	1.98	2.01
S / M	2.67	2.69	-	-	2.66	2.69
M / MP	-	-	2.44	2.46	2.39	2.40
SMP / MP	-	-	-	-	3.43	3.32
MP / P	-	-	2.90	2.97	2.86	2.91
M / P	-	-	2.66	2.69	-	2.69
M / T	2.68	2.69	-	-	-	-
P / T	-	-	2.64	2.69	2.66	2.69

表-2 分離時間/秒 (各20nmol)

ゾーン	S: M = 1: 1		M: P = 1: 1		S: M: P = 1: 1: 1	
	実測値	理論値	実測値	理論値	実測値	理論値
SM	796	820	-	-	878	911
MP	-	-	996	1017	1409	1297
SMP	-	-	-	-	725	720

参考文献

- 1) 第6回等速電気泳動シンポジウム要旨集、中原清、広川健、木曾義之(1986)。

(広島大工) 広川健、横田泰朗、高羽均、木曾義之

1. 演者らは等速電気泳動法の分離過程及び定常状態をシミュレートするソフトウェアを開発し、多くの試料についてその妥当性について検討してきた。その結果、等速電気泳動法における分離最適条件の予測にシミュレーションの手法が精度良く適用できる事が明らかになっている。

しかしながら、成分数が多くまたその量が不均一な場合には、一種類の電解液条件(特にpH)のみで全分離が可能である事はむしろ希である。このような場合、既存の装置では電解液が一種類しか使用できないため、電解液を交換後、試料を注入して再分析する必要がある。別のpH条件を選択して分析が続行できる装置が製作できれば、シミュレーションの結果を有効に利用する事も可能となろう。

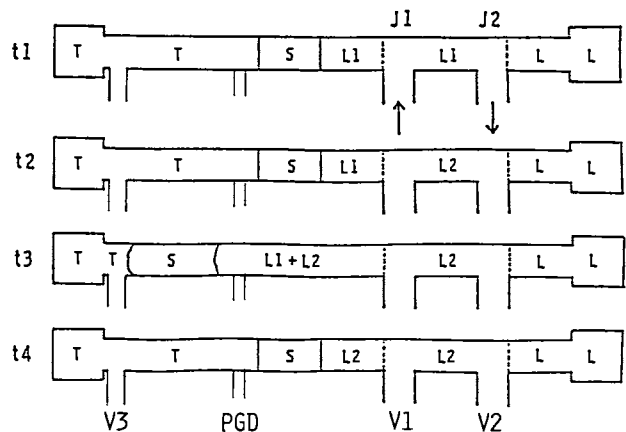
第6回等速電気泳動シンポジウムにおいて、従来の装置の直列型を試作した例について報告したが、流路が長くなるため装置全体にかかる電圧が高くなりそのために電流が漏洩しやすく、保守の点で問題があった。本講演ではこの点を改良するために考案した分離繰り返し可能なpH選択型等速電気泳動装置の試作について報告する。

2. 本装置による繰り返し分離の概念図を図-1に示した。装置を直列型とせず分離用細管の長さを短く保ったまま、電解液条件を変更するためには、電極槽内のリーディング電解液を入れ換える必要がある。しかし電解液槽内の液全体を交換していたのでは時間がかかるだけでなく、試料の一部を失うことにもなりかねない。そこで本研究では、リーディング電解液槽には単に導電性を持たせる意味からNaCl水溶液を満たし(図-1、L)交換は行わず、試料検出器とリーディング電解液槽を接続する細管内(J1-J2)の電解液を微量ポンプにより交換する方式を考案した。この際、カウンターイオン(アニオン分析の場合はNa)が対電極に向かって泳動し、放置しておく設定した電解液条件を乱すと考えられるので、分析中は微量のリーディング液をJ1よりゆっくりと圧送してJ2より排出し(~5 μ l/min)、同時にLからのカウンターイオンを系外に排出する。この操作は常に新しいリーディング液を送り込む意味から重要で、このために通常必要とされる比較的大きな容量のリーディング電解液槽は不要になる。試料の検出には電位勾配型の検出器を一基のみ使用している。

電解液交換のプロセスを図-1に示した。図中V1よりJ1-J2間にL電解液が圧送されている。J1-J2の間隔は30cm(内径1mmのPTFEチューブ)、J1と検出器間は15cm(内径0.5mm)である。t1はL1電解液を使用した分析が終了したところで、この時点で電解液をL2に切り替えJ1-J2間に流した後(t2)、V2を閉じV3をあけて試料を分離開始位置(試料注入位置)付近にまで、電流を流したまま、押戻す(t3)。その後V3を閉じ通常の分析に移り、t4はL2液で分析が終了したところを示している。電解液の交換と押戻しには5-10分を要する。なお今回の装置ではターミナル液の交換は考慮していない。

図-1 pH選択型等速電気泳動装置における電解液交換のプロセス

V1: リーディング電解液(L液)流入用バルブ、V2: L液排出用バルブ
V3: ターミナル液排出バルブ、
J1-J2: リーディング電解液用チューブ
S: 試料、L1, L2: リーディング電解液
L: 10mM NaCl
T: ターミナル電解液(10mM カブロン酸)
PGD: 電位勾配検出器



装置本体としては島津製作所製 IP-1B型を、リーディング電解液の圧送にはガスクロ工業製ダブルプランジャーポンプ PUD-008 を使用した。

イソタコフェログラムはレコーダーに記録するほかマイクロコンピューター (SORD M 223) に取り込み、別途ゾーン長などを精度良く測定できる。

3. 本装置ではポンプによる押し戻し時に試料がリーディング電解液やターミナル液と混合する点は避けられない。その際試料の回収率が変化しないことを確認するため同一の電解液でいくつかの実効移動度の異なる試料でゾーン検出時間の再現性を検討した。その結果押し戻しが十分であれば良い再現性が得られ、通常の分析と変わらない事がわかった。なお図-1に示したように電解液を入れ換える際、リーディング電解液の混合した部分が生じる。pH 3.6 と 4.4 で step height が明瞭に変化する酢酸を使用して繰り返し分析を行なったが問題はなかった。

図-2 に 3 種の電解液で全く同一の試料を繰り返し分析した例を示した。使用したリーディング電解液は 10 mM 塩酸 / β -アラニン (pH = 3.6, 4.0)、 ϵ -アミノカブロン酸 (pH = 4.4)、ターミナル液はカブロン酸である。粘性剤として HPC を 0.02% 添加した。図-2 中には分析終了後押し戻しの間に記録されるパターンも示してある。電位勾配ステップの角が取れており分離されたゾーンがかなり混合している事が明かであるが、分離状態と比べるとさほど広がってはいない。

以上述べたように今回試作した装置は実用性の高いものと考えられる。現在、分離過程の解析結果を参考にして試料量が増加した場合どの程度の距離を押し戻すのが適当か検討している。

本装置では微量ポンプを使用するため、試料量が多い場合にはカウンターフローの手法を応用したいと考えている。

参考文献

- 1) 第 6 回等速電気泳動シンポジウム要旨集、高羽均、広川健、木曾義之 (1986)。

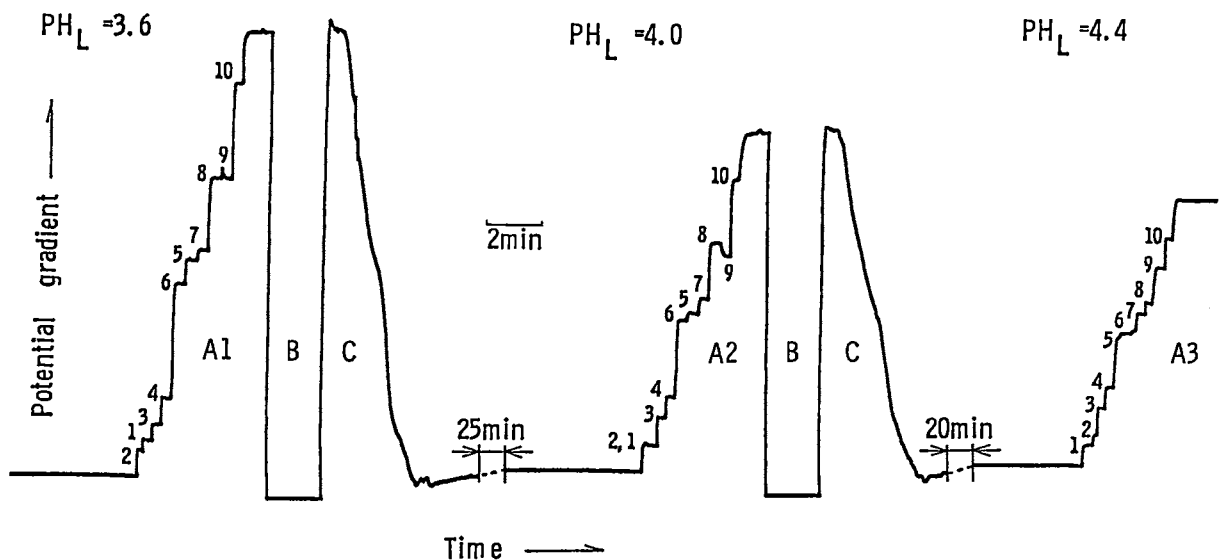


図-2 pH 選択型等速電気泳動装置における電位勾配検出器のパターン (pH 3.6, 4.0, 4.4) 試料: 1. シュウ酸、2. 臭素酸、3. 次亜リン酸、4. プロモ酢酸、5. コハク酸、6. 2-ヒドロキシイソ酪酸、7. 安息香酸、8. 酢酸、9. グルタミン酸、10. 酪酸
A1-A3: イソタコフェログラム B: リーディング電解液交換、C: 押し戻し

4 細管式等速電気泳動装置用の PG-UVハイブリッド型検出器の開発

城西大学・理・化学

小林 英三郎

『dPGイソタコフェログラム』

細管式等速電気泳動法 (ITP) の定性、定量は、ポテンシャルグラジエント検出器 (PGD) によって、描かれるイソタコフェログラム (Fig.1a) の波形を解析する方法と、紫外吸収検出器 (UVD) による紫外吸収曲線 (Fig.1c) を解析する方法が用いられている。

イソタコフェログラムにおいては、成分ゾーン S_1 , S_2 の PG 値を測定し定性指標の RE 値および PU 値を求め、また微分曲線 (dPG/dt) (Fig.1b) の頂点-頂点間の時間巾を測定し定量値としている。一方、UVD 信号 (Fig.1c) のピーク面積は紫外吸収物質 S_2 の定量値となる。

ここで PG と t の軸を交換して (Fig.2a) t を PG で微分すると dt/dPG 曲線 (Fig.2b) が得られる。この曲線は縦軸が t 、すなわち成分のゾーン長を表し、横軸は PG 値を示す。また成分 S_2 の UV 信号によるピークは積算され Fig.2c に示す棒グラフとなる。 Fig.2b, 2c で示した処理結果を『dPGイソタコフェログラム』と呼ぶ。(1)~(5)

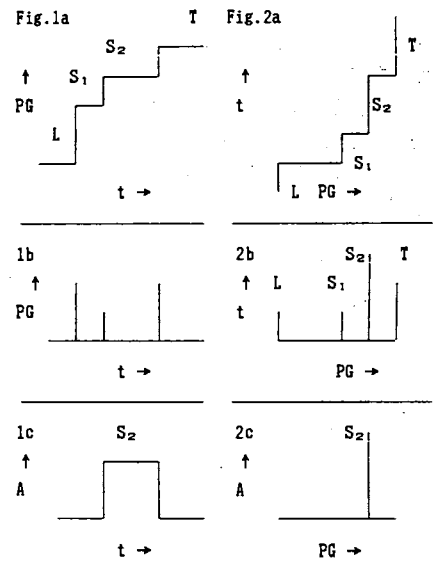
この変換結果は液体クロマトグラムの溶出曲線と比較すると、 t および A は物質濃度を表し、PG は保持時間に相当するので、dPGイソタコフェログラムをクロマトグラムの一般的解析法で理解することが出来る。等速に達した成分 S_1 , S_2 は Fig.2b に示す棒グラフとなり、これらのピーク巾は dPG であるので分離理論段数は“無限大”になると評価される。すなわち ITP は成分ゾーンが等速になれば、その PG 値の大小に関わらず一定の PG 値を示すので液体クロマトグラムで見られるような保持時間の長さによるピーク巾の増大は起こらないことがわかる。

通常、イソタコフェログラム (Fig.1) で ITP の解析を行うと、等速に達したゾーン内では成分濃度が一定であるので成分量の増加は吸収 (A) の増加ではなく t 方向への増加 (Fig.1c) となる。従って UV 信号の波形解析を行う場合成分量が増加するとピーク位置が変化し帰属が困難になる。

これに対して dPGイソタコフェログラムにおいては、UVD 信号は全て PG 値に帰属することが出来るので紫外吸収物質の PG 値から得られる RE 値を指標にした定性が可能になる。

ここで示した『dPGイソタコフェログラム』を得るためには、PG 信号と UV 信号が幾何学的に同一な位置、すなわち PGD の電極部と UVD のセル部が分析管の同一なゾーンに位置していることが望ましい。

イソタコフェログラム dPGイソタコフェログラム



しかしながら、市販されているITPの装置では、PGDとUVD設定場所は泳動の線方向に離れており、両信号の時間的”ずれ”が生じ、得られた信号の同期処理が必要になる。すなわち、PGDとUVDの両信号に共通なマーカを用い、取り込んだデータの同期を行う。従ってリアルタイムで信号を処理することが不可能であり、データの迅速な処理は望めない。

『PG-UVハイブリッド型検出器』

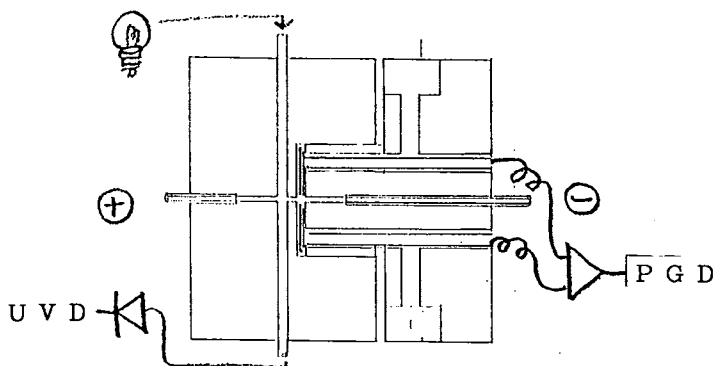
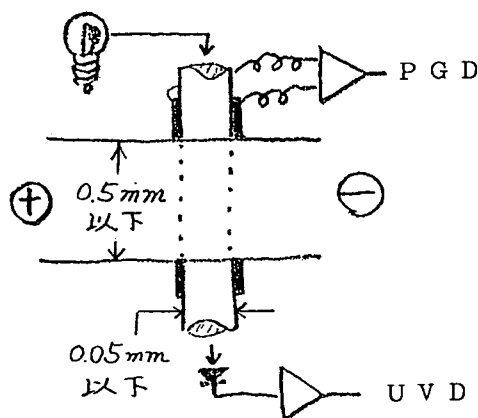
先に取り上げた信号の”ずれ”の問題を解決するためには、PGDの電極部とUVDセル部が被検体に対して同一な場に位置するように設計した『PG-UVハイブリッド型検出器』を用いる必要がある。理想的な型はFig.3に示したようにUVセルをPG電極で泳動の線方向に挟んだものであるが、PGDの感度を維持するためには、UVセル部に少なくとも0.05mm以下の厚さを持つ光学的に透明でかつ絶縁性の高い材質を準備しなければならない。またこの場合、光源のエネルギーが充分なものを用いなければUV信号の高感度検出は望めない。

Fig.3

Fig.4

理想的な『ハイブリッド型検出器』

試作した『ハイブリッド型検出器』



しかしながら今回は、上記条件を満足する材質が入手できないので、PG-UVハイブリッド型検出器としてFig.4に示すものを試作した。PG電極部とUVセル部の距離は2mmとし光量を得るために直径1mmの光ファイバーを窓材料として、テフロンブロックにて製作した。PGの増幅部は島津細管式等速電気泳動分析装置IP-2A、また光源は紫外線吸収検出器UVD-10Aのものを用いた。このハイブリッド型検出器を用い、PG、UV信号の同期および検出感度の評価をし、dPGイソタコフェログラムのリアルタイム処理の可能性について考察する。

また、Fig.3,4で示したUVセルの光路軸に対し直角方向に第二の光ファイバーを設定すればJ. C. REIJENGA⁶⁾の報告にある、2波長同時測光が可能である。さらに、一方の光ファイバーから励起光を与えれば、これに直交するファイバーでは蛍光を得ることが出来る。これらの光学信号とPG信号を同位置で計測できる高感度で選択性が高い『ハイブリッド型検出器』を用いることにより、『dPGイソタコフェログラム』による処理方法は、ITPの分析能力をより高度のものにすることが期待できる。

1) ~ 4) 小林 英三郎 細管式等速電気泳動シンポジウム(1983,1984,1985,1986)

5) 小林 英三郎 生物物理化学 Vol.31 No2 p51(1987)

6) J.C.REIJENGA et al. J.Chromatog. 267(1983)75-84

5 キャピラリー電気泳動の全自動化

○山本 秀子・真鍋 敬・奥山 典生 (都立大・理・化)

キャピラリー等速電気泳動によりタンパク質を高感度で短時間内に分析し、しかも常に再現的な結果を得るために、タンパク質陰イオン分析系の検討および泳動装置の流路系、送液方法等の改良を行ってきた。装置についてこれまで行ってきた改良に加え、試料添加方法をオートサンプラーとぜん動ポンプによる方法に変更し、マイクロコンピュータを用いて、連続全自動分析を行えるようにした。

(方法および結果)

連続全自動分析装置の模式図を図1に示す。主な部分は、島津細管式等速電気泳動装置 IP-2A のものを用いた。電極槽液の送液方法は、すでに報告したように2台のぜん動ポンプによる方法に改良した。また、流路制御のための6個の電磁弁およびピストン弁を取り除き、流路も送液2本、排液1本に簡略化した。泳動用細管は、内壁をヒドロキシプロピルメチルセルロースで被覆したPFEP管 (0.5 mm I.D., 230 mm length) を用いた。試料添加部については、インジェクションポートにガラスキャピラリーチューブ (O.D. 0.35 mm I.D. 0.25 mm) を、マイクロシリンジ (針長 5 cm) の針先が達する位置まで差し込み、固定し、試料添加用のぜん動ポンプからの細管に接続した。オートサンプラーは、テクニコンの40試料用のものを用いた。電極槽液用の2台のぜん動ポンプ、試料添加用ぜん動ポンプ、オートサンプラー、電源、レコーダの動作を制御するリレーインターフェースを製作し、各リレーの動作タイミングは NEC PC 8001マイクロコンピュータで制御した。また紫外吸収や電位勾配のデータは別に述べるようにフロッピーディスクに記録し、データ評価を行えるようにした。

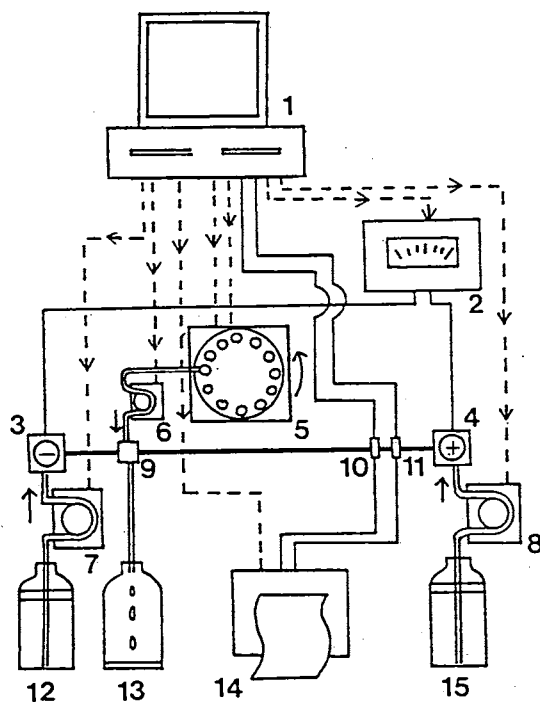


図 1

全自動細管式電気泳動装置の模式図

1. マイクロコンピュータ
(フロッピーディスク、プリンターを含む)
2. 高圧直流電源
3. 陰極および陰極槽
4. 陽極および陽極槽
5. サンプラー (60試料用)
6. ミニペリスタポンプ
- 7, 8. ペリスタポンプ
9. 試料注入口
10. UV検出器
11. 電位勾配検出器
12. 終末イオン溶液タンク
13. 廃液タンク
14. レコーダー
15. 先行イオン溶液タンク

分析スキームを図2に示す。1 試料あたりの分析時間は約2.5分、また、気泡発生などによって泳動が中断した場合は、ただちに次の試料の分析が開始される。すなわち、試料をサンプラーにセットして、キーボードで試料数を入力するだけで、キヤピラリー等速電気泳動分析が全自動で、連続的に行えるようになった。図3に、血清タンパク質を連続全自動分析した結果の1例を示す。

図2 全自動分析スキーム

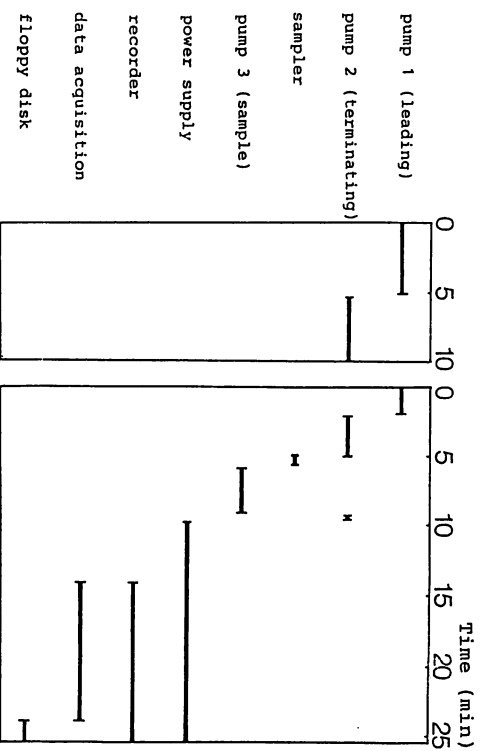
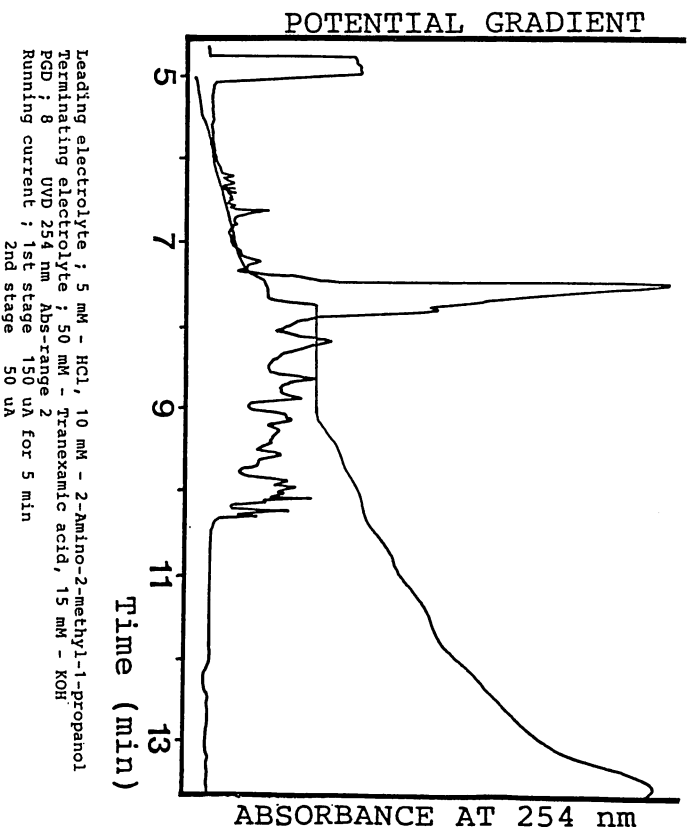


図3 血清タンパク質の分析例



鳥津製作所・バイオ機器部

○ 藤井英彦・秋山純一

従来、顕微鏡をみながら、ストップウォッチで計測していた細胞電気泳動測定を、自動的に行なおうとする試み(1)が、最近、世界各地で行われている。特に、この傾向は Field, Caspary ら(2)のいわゆる「マイクロファージ電気泳動試験」が発表されてから非常に強くなり、すでに数社からこのような自動化装置が市販されるに至った。本稿では我々の開発した装置(3)を従来の研究と、比較しながら紹介したい。

1. 測定方式

今迄されてきた方法に3つある — (i)画像処理法(4-6) (ii)レーザ・ドップラ法(7,8) (iii)空間フィルタ法(9) である。このうち(i)は原理的に人間が行っている動作をそのままおきかえようとするものであるが、現在のところ、細胞を1つ1つ別々に認識しそれぞれの泳動速度を計るという動作を完全に置きかえるまでには至っていないようである。現在までに研究された画像処理法は、①細胞が決められた領域内を通過するのに要する時間を、論理回路により計る(4) ② $t=t_0$ のときと $t=t_0+\Delta t$ の2画面の相関をとる(5) ③ $t=t_0$ と $t=t_0+\Delta t$ の2つの画面を記録・表示し、対応する細胞を測定者にみつけてもらう(6) といった方法にとどまっています、いずれも固有の欠点をもっている。

(ii)と(iii)の方法は、いずれも細胞に光をあて、その散乱光を受光し、全細胞から来る散乱光を一つの時系列信号に直した上で、その周波数分析をする方法である。(ii)は泳動管の測定領域にレーザにより干渉縞を作るか、レーザ光のビートをとる方法であり、本質的に時間コヒーレンスのよい気体レーザが必須である。また、光学系を経時変化・熱膨脹に対して安定に保つのが難しい。それに対して(iii)はレーザビームで干渉縞を作る代りに、対物レンズで細胞の像を作り、その像面にスリット列を置く方法で、光学系の安定性が非常によく、半導体レーザを光源に使用することもでき、我々はこの方法をとった。

また、(iii)の中にはグレーティングを回転させ(9)泳動の方向を検知し、低減ノイズをもカットする試みもあるが、我々は細胞(泳動方向が一定)を念頭におき、低減ノイズはカーブ・フィッティングで除去することで、機械的回転を避けた。

2. 泳動部

正しい泳動測定を行うためには、何よりも、泳動を高速で行わせねばならず、そのためには、導電率の大きい泳動メEDIUMに対しても、高い電位勾配が印加できることが重要である。高い電位勾配を妨げるのは、電極の電気分解による気泡の発生と、熱対流による泳動の乱れである。気泡の発生については、従来、白金黒やパラジウムによる気体の吸収法や、電極の面積を球面状に広げる(9)方法が知らされているが、いずれも安定ではない。我々は半透膜によって、泳動部と電極部を仕切った。熱対流を押えるためには我々は内径0.7 mm の泳動管を使用、その外部をシリコンオイルでおおい、更に泳動ブロックが水冷できるようになっている。この泳動部で、生理食塩水や培養メジウムに対して 38 V/cm までの電位勾配を掛けることができる。

従来の装置では、測定領域を泳動管内の「静止面」に合せているが、本装置では泳動管の中心に視野を合せた。これは、泳動管が細いために静止面に合せたのでは熱膨脹による光軸ずれにより測定の再現性が劣化することと、あらゆるパツファについては半透膜を

を通してくるメジウムの流れが無視できるとは保証されないこと等による。このため、測定される結果は、背景の流れ（電気浸透流）が重畳されたもの（図1）となるが、細胞電気泳動試験では遅延率のみを問題にするので、全く問題はなく、また、必要ならば既知の粒子（2種）を用いて校正することで、易動度の絶対値を知ることできる。

3. 測定例

各種粒子について本装置で計った結果（たて軸），と，手動装置（杉浦研究所製）で計測した例を図1に示す。

また，ヒツジ赤血球とウサギ赤血球の混合泳動の測定例を図2に示す。

これらより本装置は，従来の手動式装置の結果とよい対応を示すことがわかる。本機はサンプルをセットするだけで，わずか5分で測定でき，細胞電気泳動法とその応用の発展に大きく貢献するものと思われる。

謝辞：御指導いただきました独協医科大学
山田喬先生に感謝いたします。

文献

- (1) 例えば A.W.Preece, E.A.Light(eds):
Cell-Electrophoresis in cancer and other clinical
reseaches, North-Holland, 1981 をみよ
- (2) E.J.Field, E.A.Caspary: Lancet 1970, 2, 1337-1341
- (3) 例えば H.Fujii et al: Electrophoresis 1986, 7, 191-194
- (4) 特許公報 (B2) 昭59-52979, 日本国特許庁
- (5) J.Deeley et al: Biochim. Biophys. Acta, 1984, 802 55-66
- (6) 馬場他: 生物物理化学 1987, 31, 96
- (7) R.Steiner et al: Electrophoresis 1985, 6, 82-89
- (8) E.Uzgiris, D-H-Cluxton: Rev.Sci.Instrum. 1980, 51, 44-48
- (9) P.J.Goetz: Cell-Electrophoresis, Clinical
Applications and Methodology(Preece and Sabolovic eds.),
North-Holland, 1979, pp445-461

図1 各種粒子の泳動結果

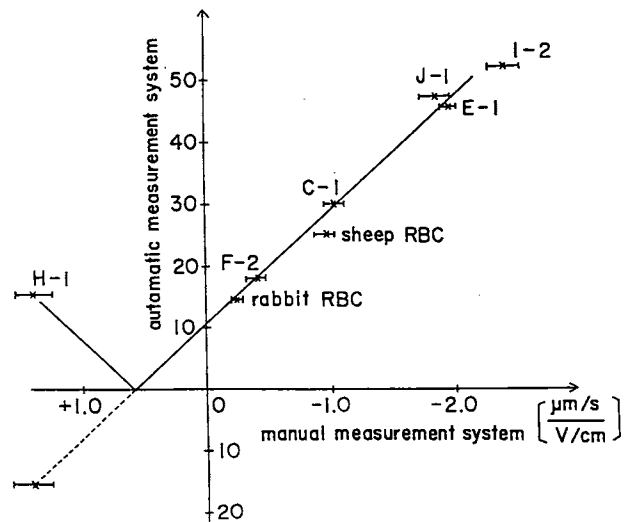
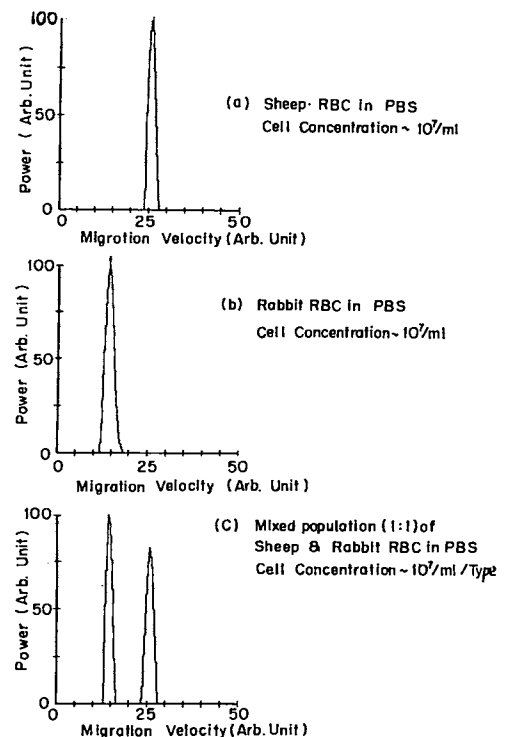


図2 ヒツジ赤血球,ウサギ赤血球の混合泳動



〔緒言〕 メチレンブルーは、鮮明な色彩と大きな分子吸光係数を有することを特徴とする塩基性染料の一種であるが、日光堅牢度が悪いために一般の繊維製品に用いられることは少なく、主として紙や文具の着色、細胞染色、酸化還元試薬などとして利用されている。また、そのロイコ体の形で感熱記録紙用色素として多用される。これら限定された用途に於いても数日～数ヶ月間の保存に耐えない耐光性の低さがしばしば問題となっている。有機色素の光退色は一般に酸化反応に起因するが、その酸化反応にはラジカル自動酸化の他に一重項酸素によるイオンの酸化反応の寄与が大きいことを演者らは先に報告している。¹⁾²⁾ また、前回シクロデキストリン(CD)とアゾ染料との包接体の等速電気泳動(IP)挙動について報告した。³⁾ ここでは、CDの包接作用によるメチレンブルーの光安定化作用とその包接体の電気泳動挙動について調べた結果を報告する。

〔実験方法〕 光退色挙動の検討には、メチレンブルー(和光純薬、特級品、 λ_{max} 661 nm)の 1.5×10^{-5} M水溶液10 ml中に α 、 β 、 γ -CDの所定量を加え、理工科学製光化学反応装置(MG型)を用いてフィルターを介した400 W高圧水銀灯光を照射した。退色比率は分光光度法により求めた。電気泳動の検討には、島津IP-2A装置を用い、泳動管にはPTFE製の長さ4 cm(内径1.0 mm)のもの、FEP製の15 cm(内径0.5 mm)のものとの連結して使用した。電解液は主として、L液に0.03 M水酸化バリウム、0.01 Mバリン(pH=10.0)を、T液には0.01 Mトリス-HCl(pH=3.1)を用いたが、L液中には所定量のCDを添加して分析した。

〔結果及び考察〕 有機色素の光退色は、励起一重項 \rightarrow 励起三重項 \rightarrow 三重項酸素(1O_2)へのエネルギー移動 \rightarrow 一重項酸素(1O_2)の生成 \rightarrow 分解物という経路で進行することが多く、メチレンブルーの光退色も主としてこのメカニズムに基づくものと考えられる。この色素溶液の光退色挙動を、無添加時の初期吸光度 I_0^0 、 t 分間光照射後の吸光度を I_t^0 、またCD添加系での初期吸光度を I_0 、 t 分照射後の吸光度を I_t として、 $(I_0 - I_t)/I_0$ を反応速度の目安に、 $(I_0 - I_t)/(I_0^0 - I_t^0)$ を反応の相対的な指標(退色比)として調べ、その結果を図1および図2に示した。

図2から、メチレンブルーのみでのときの退色比(1.0)に比べ、 β -または γ -CDを添加すると、その濃度の増加に伴って退色比が減少し、これらCDの添加によってメチレンブルーの退色が抑制され光安定化されるのが認められる。

一方、 α -CDの添加の場合には、無添加のときと殆ど変わらず、光安定化効果は認められなかった。 β -および γ -CDを添加したときの退色比

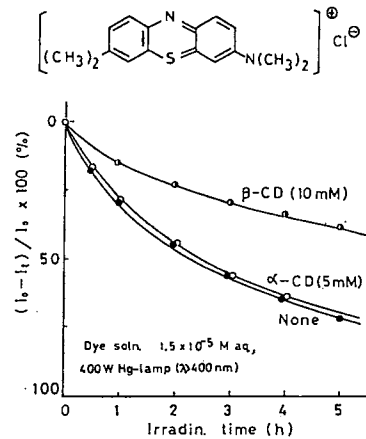


Fig. 1 Influences of added cyclodextrins on photofading rate of Methylene Blue.

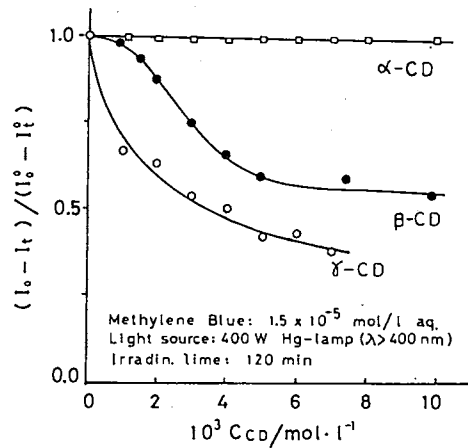
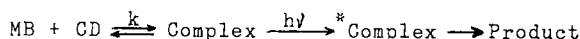
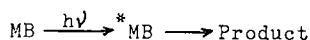


Fig. 2 Effect of cyclodextrin on photofading rate of Methylene Blue

の減少が、メチレンブルーとこれらCDとの包接体を形成することによるのか否かを推察する一つとして、IP挙動との関連を調べた。

メチレンブルーは、用いた電解液系で短時間に精度良く検出できる(図3-A)。メチレンブルーとCDとが包接化合物を容易に形成するのであるならば、この無電荷配位子であるCDを共存させた電解液中を泳動させた場合に、無添加電解液の場合とは異なった泳動挙動を示すことが予想される。事実、L液中にβ-CDを5 mM濃度で加えた電解液系では電位勾配値が大きくなるのが認められ(図3-B)、このことから包接錯体の形成が推察された。図4に、α、β-またはγ-CDを1~8 mM濃度でL液に加えて分析したときのPU値変化をまとめて示した。β-CD(内孔径7~8 Å)の場合には、その添加濃度の増加とともにほぼ直線的にPU値は漸増した。また、内孔径の大きいγ-CD(9~10 Å)を添加した系では、比較的低濃度の添加でPU値は著しく大きくなることが認められた。このようなPU値(またはRE値)の増大は、主として包接錯体の形成により泳動する分子イオンが大きくなることに基づくものと考えられる。一方、内孔径の小さいα-CD(5~6 Å)の場合には、その添加によってもPU値は殆ど変わらなかった。すなわち、IP挙動から、β-およびγ-CDはメチレンブルーと包接体を形成し、その作用はγ-体の方が強いこと、またα-CDは包接体を形成し難いことがわかった。

このIP挙動の結果は、先のメチレンブルーの光安定化に及ぼすCDの添加効果とよく相関しており、α-CDの添加では包接体を形成しないので光安定化作用も示さない。β-あるいはγ-CD添加の場合にメチレンブルーが光安定化されるのは、メチレンブルーの分子中央部がCD環内に入り込み、中央部二重結合への一重項酸素の攻撃が起こりにくくなることによるものと理解される。ただし、90%あるいはそれ以上包接体を形成していると思われるβ-CD(10 mM



M濃度)やγ-CD(5 mM濃度)添加のときにも退色化が起こり完全に抑制されるに至らないのは、生成した包接体も光によって徐々に分解していくためと思われる。

1) N.Kuramoto, T.Kitao, J.Chem.Soc, Perkin II, 1569 (1980)

2) N.Kuramoto, T.Kitao, J.Soc.Dyers Colour., 98, 334 (1982)

3) 蔵本暢浩、第6回等速電気泳動シンポジウム、要旨集 p. 21 (1986)

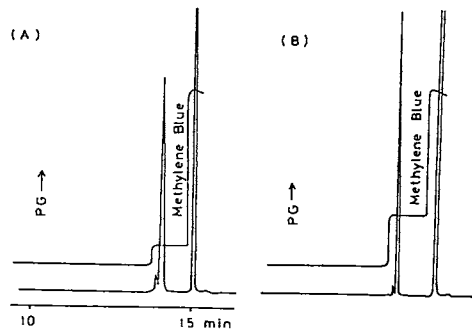


Fig.3 Isolacopherogram of Methylene Blue
(A) no contained (B) β-CD(5 mM) was contained in L solution

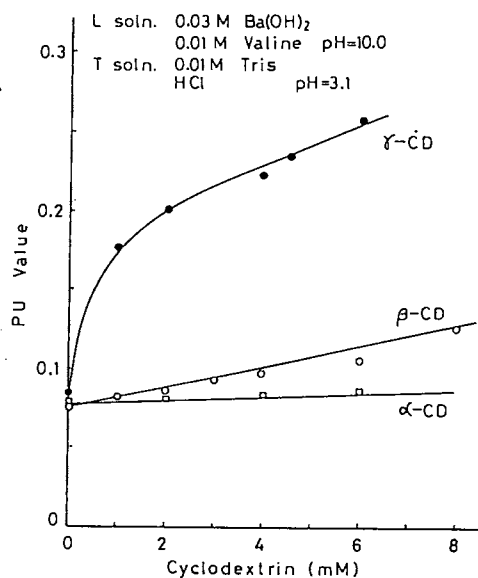


Fig.4 Influences of cyclodextrin on the PU value of Methylene Blue
Current: 100 μA (8 min) → 50 μA

8 等速電気泳動法による高温超伝導物質(Y-Ba-Cu)の分離定量

電子技術総合研究所 金子啓二 金子浩子

1. 緒言

酸化物高温超伝導物質やそれを作製する過程の材料中の元素組成比(イットリウム:バリウム:銅)を明らかにし、高温超伝導を示す組成比(1:2:3)を持つ物質を作製することは、高温超伝導体の構造の推定やその作製のための検討上重要である。これらの組成比を求める分析法としては、上記3種(Y^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+})の陽イオンが同時に分析できる方法が、分析時間の短縮、誤差の低減などの観点から望ましい。これまで高温超伝導体の成分組成比の検討には、主として、3元素の同時分析が可能な、蛍光X線法とICP-AES(誘導結合プラズマ分光分析)法が使用されてきた。このうち、蛍光X線法は高温超伝導物質が酸化物であるため前処理が容易であり、非破壊法で試料を失わない利点がある反面、表面分析法であるため、分析結果が必ずしもバルクの組成を表わしていない場合も考えられ、この方法でバルクの組成を分析するには、材料の均一化が重要であった。ICP-AES法は、溶液中の陽イオン種の相互干渉がなければ、同時分析法として優れた方法であるが、操作法、保守、管理などが煩雑である。

そこで、ICP-AES法と同様にバルクの溶液中の3種の陽イオン(Y^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+})の同時分析が可能な方法として、細管式等速電気泳動法を開発した。本法は、上記3種の陽イオンを含む少量(数 μ l)の試料の分離分析が同時に行なえる簡便な方法であり、特に少量の試料の主成分の分析に適している。

本報告では、細管式等速電気泳動法により、酸化物高温超伝導体の実試料の定量を行なうために、この試料の溶解に使用する酸の種類、溶解方法、酸の影響、分析条件などを検討した結果と酸化物高温超伝導体実試料の分析結果について報告する。

2. 実験

装置は、島津製細管式等速電気泳動装置 IP-1B 型を用い、泳動管は、標準仕様の長さ 20 cm、内径 0.5 mm のテフロン管をそのまま使用した。検出器は、電位勾配検出器を用い、泳動電流は約 20 分間 100 μ A を通電した。溶液の pH の測定には、東亜電波製 HM-20E 型 pH メーターを使用した。試薬は、市販特級品かそれに準ずるものを用いたが、検量線用の陽イオンには、原子吸光用標準液を使用し、酢酸塩を主体とする溶液条件で定量を行なった。また、先行液中の不純物の検討には、高純度酢酸カリウム(Johnson Matthey 社製)を使用した。実試料の溶解も主として酢酸で行ない、未溶解微量成分は少量の硝酸を添加して溶解した。

3. 結果と考察

イットリウム、バリウム、銅の酸化物を容易に溶解可能な酸は、酢酸と硝酸、塩酸であった。溶解に使用する酸が分析を妨害しないためには、分析基礎液成分の酸で溶解することが望ましい。その上、上記3元素の水酸化物の沈殿しはじめる pH は、それぞれ Y 6.4, Ba 6.2, Cu 4.4 である¹⁾から、微酸性の領域で緩衝作用のある Buffer 溶液を基礎液として分析できる方法が望まれた。これらの理由から、酢酸を主体とする溶解法を考案し、分析に使用する先行液や後続液も酢酸塩を用いた。先行液の組成は、0.01M 酢酸カリウム、0.05% PVA (pH 5.4) であり²⁾、後続液は、0.01 M tris-酢酸(pH 5)が良好であ

った。先行液の pH は Fig.1 に示すように、pH 4.5 から 6.5 の広い範囲にわたって使用可能であった。これらの溶液条件で、上記陽イオン標準液 (Y^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+}) をもちいて得たイソタコフェログラムの 1 例を Fig.2 に示した。市販の酢酸カリウム (JIS 特級) には約 0.02 % のナトリウムが共存しているのので、その Na^+ が検出された (Fig.2)。同様の条件で求めた合成試料溶液 (陽イオン標準液を Y^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} が 1:2:3 の割合に混合した溶液) による検量線を Fig.3 に示した。また、酸化物高温超伝導体実試料の溶解液を用いて、注入液量を変化させて求めた、濃度とゾーン長さとの関係は、比例関係を示した。実試料の定量を行なった結果、試料を十分混合して行なった蛍光 X 線法と比較して、組成比で ± 0.02 以内で一致した。

- 1) J. Kragten, "Atlas of Metal Ligand Equilibria in Aqueous solution", p.71, 223, 719, John Wiley & Sons (1977)
- 2) F. M. Everaerts, J. L. Becker and Th. P. E. M. Verheggen, "Isotachopheresis" Elsevier Sci. Publ. Comp., Amsterdam (1976)

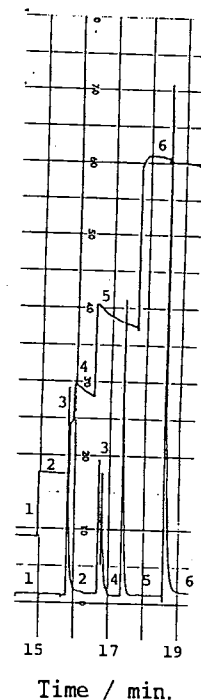


Fig.2 Isotachopherogram of some cations in the system CH_3COOK -Tris using a potential gradient detector. 1. K^+ , 2. Ba^{2+} , 3. Na^+ , 4. Y^{3+} , 5. Cu^{2+} , 6. Tris. +

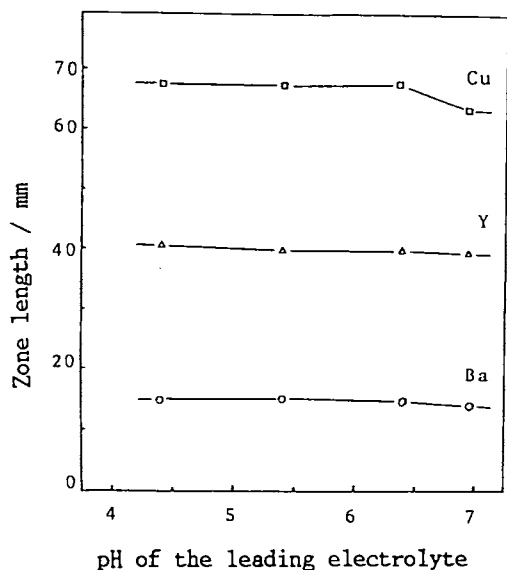


Fig.1 Effect of the zone length of Ba, Y and Cu ions as a function of pH
System : CH_3COOK -Tris.
Molar ratio of sample : $Y_{0.4} : Ba_{0.2} : Cu_{1.0}$

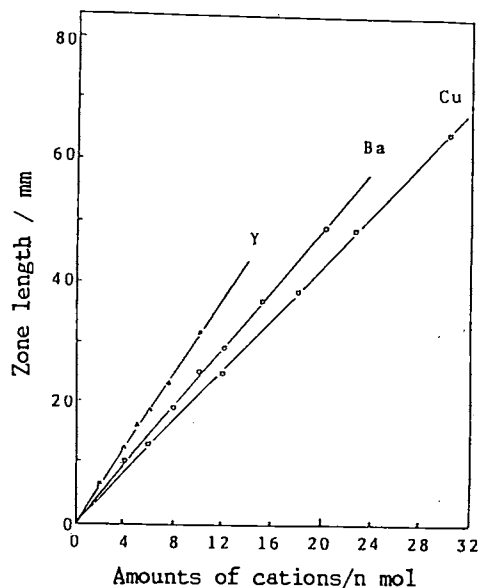


Fig.3 Calibration curves of Y, Ba, and Cu in the system CH_3COOK -Tris.
Migration current : $100 \mu A$
Chart Speed : 40/mm

9 細管式等速電気泳動法による海水中 のカリウムイオンの定量

(神船大・阪工試) ○ 福士恵一・日色和夫

1. 緒言 細管式等速電気泳動法により海水中のカリウムイオンを定量する場合、共存する多量のナトリウムイオンを、あらかじめ妨害しない程度まで取り除く必要がある。そこで前処理法として、塩化アンモニウム溶液を溶離液としたイオン交換法について検討した。また溶出液中の多量のアンモニウムイオンの影響を除くために、カリウムイオンとナトリウムイオンとの分離定量に最適な強アルカリ性のリーディング液についても検討した。以上の検討結果について報告する。

2. 実験 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置IP-2A型を使用した。泳動管は内径1.0 mm、長さ10 cmのPTFE製チューブに、内径0.5 mm、長さ15 cmのFEP製チューブを接続したものであり、検出器は電位勾配検出器を用いた。リーディング液は、5 mM水酸化セシウム、2 mM 18-crown-6及び0.01 % HPNCを含む70 % メタノール水溶液であり、ターミナル液は、5 mM臭化テトラブチルアンモニウム及び0.01 % HPNCを含む70 % メタノール水溶液である。泳動電流は最初の15分間150 μ Aとした後、50 μ Aに切り換えた。カラムはアンモニウム形にしたDowex 50W X8 (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3 mm、長さ5 cm)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Isco社製Cygnnet型を使用した。表面海水は紐をつけた試薬瓶で採水し、海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。海水のpH及び塩分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型塩分計を用いて測定した。

3. 結果 はじめにカリウムイオンとナトリウムイオンとの分離定量に最適なリーディング液について検討した。すなわち前記のリーディング液を用いたが、18-crown-6及びメタノールの濃度を各々1~3 mM、60~80 %と変化させた。なおターミナル液中のメタノールの濃度も同様に変化させた。その結果、前記の電解液組成が最適であることが分かった。ついでカリウム及びナトリウムイオンを溶離するための塩化アンモニウム溶液の濃度及び流速、カリウムイオンの回収率に対する他の塩類濃度の影響、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、海水中のカリウムイオン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濾過する。この海水0.5 mlを1 ml/minの流速でカラムに流し、カリウムイオンを吸着させる。同時にナトリウム、マグネシウム及びカルシウムイオンも吸着される。純水5 mlでカラムを洗浄した後、 2×10^{-2} M塩化アンモニウム溶液40 mlを2 ml/minの流速で流し、ナトリウムイオンを溶離する。ついで 3×10^{-1} M塩化アンモニウム溶液を1 ml/minの流速で流し、カリウムイオンを溶離する。最初の0.5 mlを捨て、次の1.5 mlを採り、この溶出液3 μ lを等速電気泳動装置に導入する。本法により、カリウムイオンを700 mg/lまで添加した人工海水試料についてFig.1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、検量線

の各点についてカリウムイオン濃度1 mg/l当りのゾーン長から求めたところ、相対標準偏差で0.021 (n=7)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、試料中のカリウムイオン濃度2 mg/lが最低定量限界となる。なおカリウムイオンの回収率はほぼ一定で39±3%であった。回収率が低いのは、ナトリウムイオンを溶離するとき同時にカリウムイオンも少しづつ溶離されるからであり、またカリウムイオンの溶出液の最初のフラクションを捨て、次の3つのフラクションのみを集めているからである。しかし前述のように、本法ではカリウムイオンの回収率はその濃度にかかわらずほぼ一定であるので、実用上差し支えないと考えられる。ついで大阪湾沿岸で採水した表面及び海底付近の海水試料中のカリウムイオンを本法により分析した。また六甲アイランドで採水した海水試料に、カリウムイオンを200 mg/l添加し、分析した。これらの結果をTable 1に示す。Fig.2は六甲アイランドで採水した表面海水試料を本法で分析したときのイソタコフェログラムである。

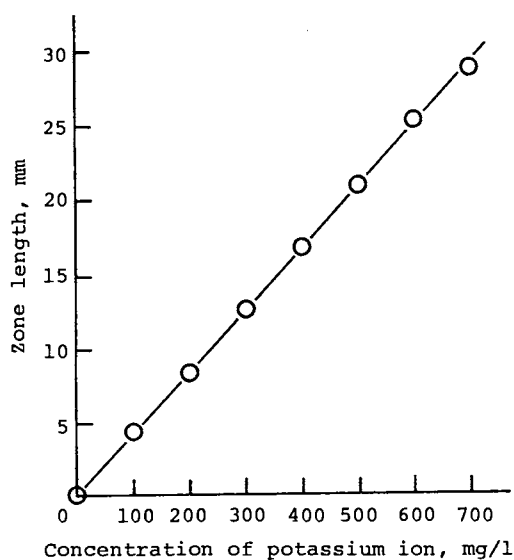


Fig.1 Working curve of potassium ion

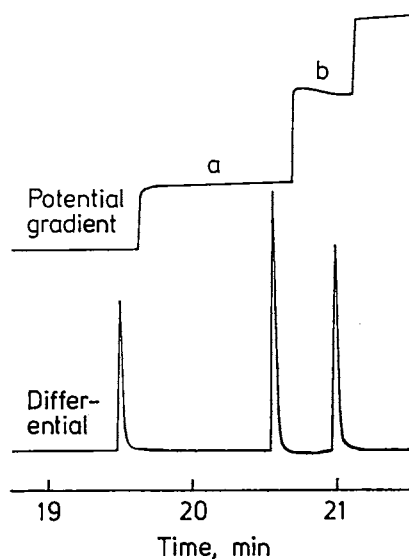


Fig.2 Isotachopherogram of seawater sample treated by the proposed method. a: Na⁺; b: K⁺

Table 1 Analytical results of potassium ion in seawater samples

Sampling site	Depth (m)	Temp. (°C)	pH	Salinity (‰)	K ⁺		
					Added (mg/l)	Found (mg/l)	Error (%)
Port of Amagasaki	0	16.5	8.52	9.0	—	119	—
Port of Amagasaki	4.8	11.2	7.96	28.0	—	345	—
Mouth of Muko river	0	14.6	7.91	21.1	—	267	—
Mouth of Muko river	3.7	10.5	7.90	24.5	—	364	—
Nishinomiya harbor	0	13.4	8.14	17.7	—	272	—
Nishinomiya harbor	2.5	10.9	7.86	27.9	—	362	—
Pond of KUMM	0	12.6	8.53	24.6	—	372	—
Pond of KUMM	5.5	11.0	8.15	28.1	—	391	—
Rokko island	0	12.5	8.37	27.2	—	369	—
Rokko island ^a	0	—	—	—	—	195	—
Rokko island ^a	0	—	—	—	200	432	+19
Rokko island	5.5	10.5	8.23	29.6	—	364	—
Rokko island ^a	5.5	—	—	—	—	204	—
Rokko island ^a	5.5	—	—	—	200	449	+22

Sampling date: April 6, 1987; KUMM: Kobe University of Mercantile Marine; a: 2 times diluted

共立女子短期大学

○ 津田 淑江

諸言 アントシアニンは、赤、青、紫、紫黒色などを呈する高等植物の花弁や果実の色、ハツカ大根の色、紫シソ、赤キャベツ、ダリアの赤葉、秋の紅葉した葉の色などの色調の母体となる色素の一群である。この色素は生体内では糖と結合した配糖体 (glucoside) となって存在することが多く、天然の色素の中で最も不安定な化合物の一つである。一般に果実、野菜に含まれるアントシアニンの大部分は不安定で調理、加工及び貯蔵中に変色して、その品質を劣化させる主要な原因となっている。

花にみられるアントシアニジンの大部分はペラルゴニジン (pelarugonidin)、シアニジン (cyanidin) およびデルフィニジン (delphinidin) であり、母核フェニル基 (右側の B-ring) における OH 基の数と位置により決定される。又、OH 基にグリコシド結合する糖の種類と数の違いにより、多くの種類のアントシアニンが存在することになる。シアニジンの 3' 位の OH 基にグリコシド結合したものがクリサンテミンである。

従来これらの分離分析には、ろ紙電気泳動、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーなどが用いられてきた。最近、平岡らによって細管式等速電気泳動法は、植物中のフラボノイドの存在の有無を検査するための有効な手段であることが報告されている。そこで本研究において、食品の赤、紫、青の鮮やかな色調を示す原因となっているアントシアニンの分離、同定に、それを利用することを試みた。

方法 島津細管式等速電気泳動装置 I.P.- 1B および I.P.- 3A を用い、検出には電位勾配検出器及び紫外部吸収検出器を用いて実験を行った。

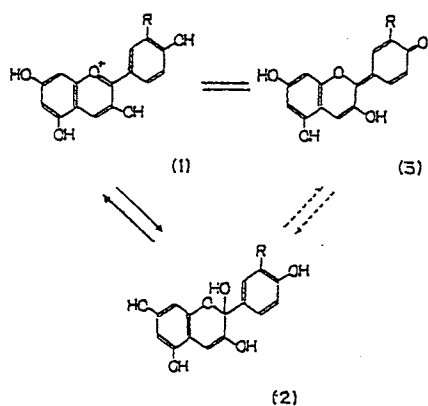


Fig. 1 Color Mechanism of Anthocyanins

Table 1

Isotachoelectrophoretic conditions for analysis of anthocyanine

Leading electrolyte	
Cation	H ⁺
Concentration	0.01 N
Counter ion	Cl ⁻
Terminal electrolyte	
Cation	Tris
Concentration	0.01 N
Electric current (μA)	100
Additive	0.5% Triton X-100
Capillary tube	0.5 mm φ, 20 cm
Controlled temperature (°C)	20

試料 シアニジン、デルフィニジン、ペラルゴニジン、クリサンテミン(シアニジン-3-モノグリセライド)は平岡氏らにより結晶化された標品の分与を受け用いた。

小豆は61年度産エリモ小豆の種皮を試料とした。

黒大豆、シソは市販品を試料としヤツデの実は北の丸公園にて採取し試料とした。

結果及び考察

平岡らは、これらアントシアニンの化合物を細管式等速電気泳動法を用い、陰イオンとして泳動分析を行ない、化学構造の微妙に異なるアントシアニン類の分離に成功したと報告している。一般にアントシアンはFig.1に示すように強酸性下ではフラビリウムイオンとなって熱や光に比較的安定であるが、中性から弱酸性下では速やかに水和されて無色のブソイド塩基となり、またアルカリ性下では一時的に青い色調を呈するアンヒドロ塩基になり極めて不安定になると考えられている。またアントシアニンは2-フェニル-ベンゾピリリウム構造をもつため、オキシニウム酸素によって+に荷電し強い塩基性を持っていると言われる。これらのことから本研究においては陽イオン(Cation)分析を試みた。すなわちリーディングイオンとして Ba_2^+ , K^+ および H^+ を用いた泳動条件により泳動を試みた。その結果、用いたリーディング液のpHはアントシアンが安定とされている強酸性領域では安定したゾーンが見られたが、アルカリ側ではゾーンピークがシャープでなかった。なかでもリーディング液を0.01 N 塩酸とし、ターミナル液に0.01 N トリスを用いた系が最もシャープで安定した電位勾配を示したため、以後の泳動条件はTable 1に示すような条件によって行った。ペラルゴニジン、シアニジン、デルフィニジン、クリサンテミンの結晶を1% HCl-メタノールに溶解しその溶液を泳動した。分析に要した時間は約20~30分であった。

Fig.2はシアニジン、Fig.3は小豆、黒豆の種皮の色素として知られているクリサンテミンの結晶の泳動図である。

以上のように細管式等速電気泳動法を用い、アントシアニンとアントシアニジンを陽イオンとして分離することが出来た。

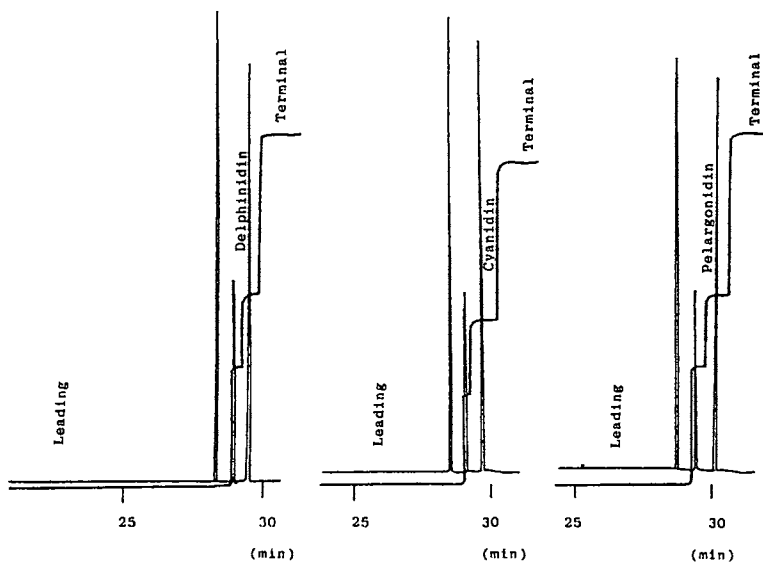


Fig.2 Isotachoelectrophoretic Separation of Anthocyanidine

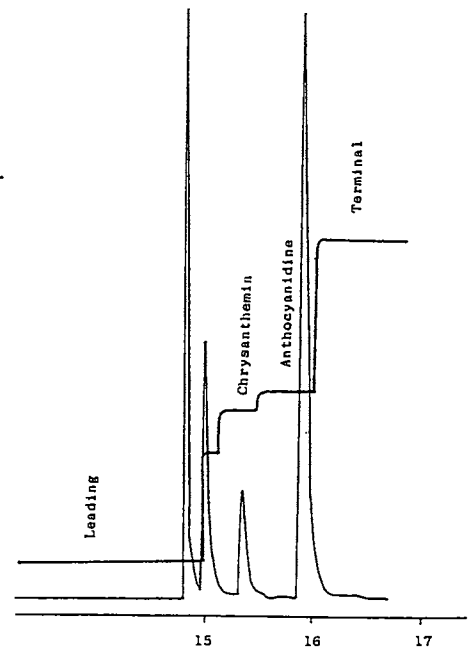


Fig.3 Isotachopherograms of Chrysanthemine

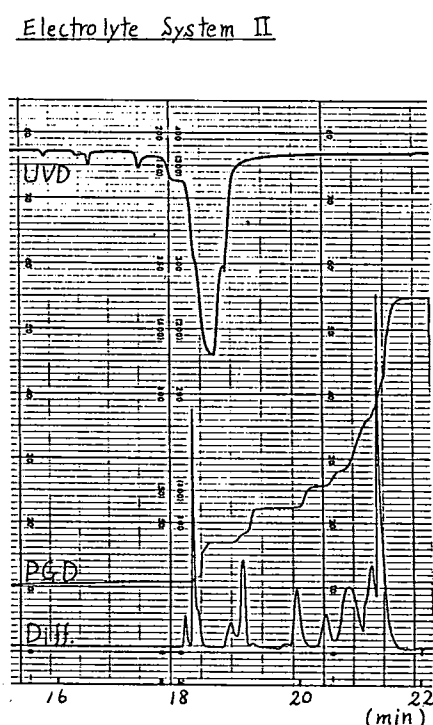
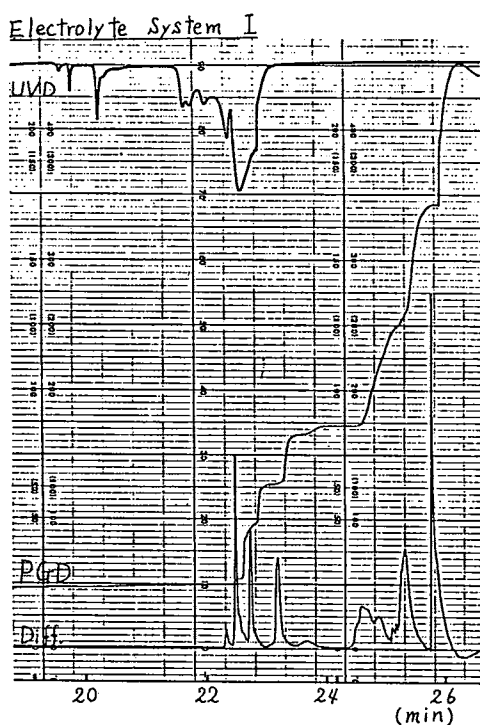
11 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用(第11報) 金属イオンを含むリーディング液を用いたときの芍薬煎液成分の分離挙動

(徳島文理大・蒸) ○香西重忠, 赤田良信

〔目的〕 演者らは、漢方薬の理化学的な品質評価法の開発の一環として、細管式等速電気泳動法の適用を試み、その基礎的條件の検討を行っている。今回は、多数の漢方薬に配合されている汎用生薬の一つである芍薬に着目し、産地及び市場の異なる芍薬煎液中のアニオン成分のパターン分析に、金属イオンを含むリーディング液を使用し、その分離挙動の相違による芍薬の識別の可能性について検討することを目的とした。

〔実験〕 装置はIP-2A型細管式等速電気泳動装置を用い、検出器はPGD-2A型電位勾配検出器及びUVD-10型紫外分光検出器(254nm)を直列に接続した。泳動管は、プレカラムとして1.0mm I.D. X 80mm (PTFE)を、分析カラムとしては0.5mm I.D. X 140mm (FED)を使用した。泳動電流は250 μ A \rightarrow 100 μ A, チャート速度は10~40mm/minで分析した。電解液は、(I) 10mM HCl, β -Alanine (L液) - 10mM Sodium Capronate (T液), (II) 10mM HCl, Histidine (L液) - 10mM pH 7.2 MES-TRIS (T液)を用い、一定量の金属塩化物をそれぞれL液に添加した。試料液は、常法に従って調製した芍薬煎液を遠心分離し、得られた上澄み液を使用した。

〔結果及び考察〕 Na, Mg, Ca, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Cd及びAlの各塩化物の一定量を分析条件(I)及び(II)のL液に添加し、その分離挙動を比較した。その結果、用いる金属イオンの種類によりそのフェログラムが異なることがわかり、特に分析条件(II)においてこの傾向は顕著であり、芍薬相互の識別が可能であることが示唆された。



Isotachopherograms of Peony Root Decoction by Electrolyte System I and II with 1mM CoCl₂

抗てんかん剤の分析

島津・応技

○児嶋佳世子

京都市児童福祉センター

近藤和子, 伊藤賢治

1. 緒言

抗てんかん剤としては、バルプロ酸、ジフェニルヒダントイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、プリミドン、アセトアゼミド、エトサクシミド、クロラゼパンなどがあるが、患者の症状によってこれらの内の一種類あるいは数種類が投与されている。てんかん発作を抑えるにはこれら抗てんかん剤の有効血中濃度を保つ必要があり、治療上、薬物濃度測定は不可欠である。

これらの血中薬物濃度は比較的低濃度であるため、血中の他成分や今回検討を行った等速電気泳動法で分析する場合には電解液不純物が分析の妨害になることも多々ある。

そこで、抗てんかん剤としてバルプロ酸、ジフェニルヒダントイン、フェノバルビタール、エトサクシミドの4種類を選び、分離条件と共に血中の他成分や電解液の不純物除去の方法を検討した。

2. 電解液不純物の除去

今回検討した抗てんかん剤は全て陰イオンとして解離するので、主として陰イオン分析におけるカウンターイオンと粘性剤について検討した。

検討した電解液を表 I に示す。リーディング電解液中リーディングイオン濃度はすべて 5 mM、溶媒は水、水-エタノール (1:1)、水-アセトン (1:1) について検討した。電気浸透流抑制のため水系リーディング電解液には HPMC などを 0.05-0.1% 加えた。ターミナル電解液の溶媒は水、ターミナルイオン濃度は 10 mM とした。

表 I のシステム I-IV を用

表 I 電解液組成

システム No.	リーディング電解液		ターミナル電解液	
	組成	pH	組成	pH
I	HCl, β -アラニン	3.2-3.8	MES, Tris	7.2
II	HCl, 6-ACA	3.8-5.0	MES, Tris	7.2
III	HCl, クレアチニン	4.1-5.5	MES, Tris	7.2
IV	HCl, ヒスチジン	5.0-6.0	MES, Tris	7.2
V	HCl, Ammediol	7.5-9.5	6-ACA, Ba(OH) ₂	11.0
VI	MES, Ammediol	7.5-9.5	6-ACA, Ba(OH) ₂	11.0
VII	HCl, Ammeol	9.0-10.5	6-ACA, Ba(OH) ₂	11.0
VIII	MES, Ammeol	9.0-10.5	6-ACA, Ba(OH) ₂	11.0

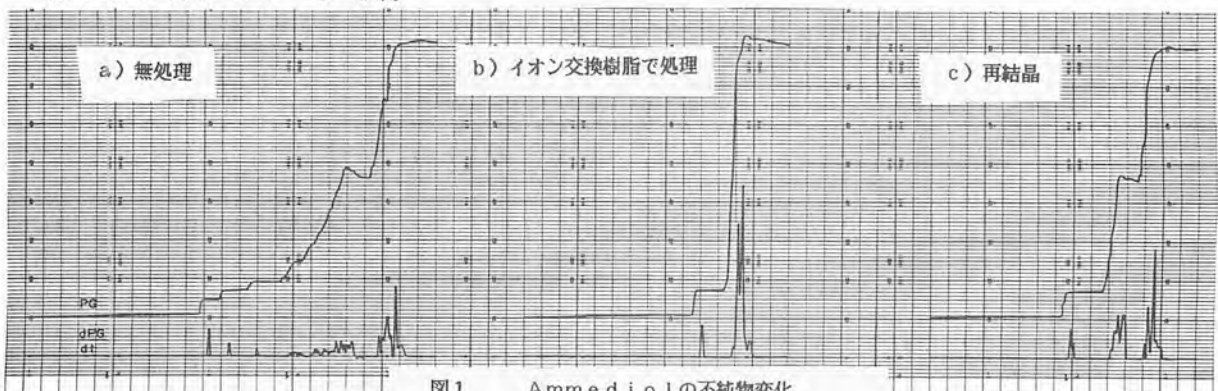


図1 Ammediolの不純物変化

いてバルプロ酸分析を検討し，V-VIIを用いてその他の薬物の分析を検討した。

表IのVの電解液を用い，Ammediolの分析を行った。図1a)は試薬特級品をそのまま用いたときのイソタコフェログラム，b)はイオン交換樹脂を通したものの，c)は再結晶したもののイソタコフェログラムである。a)に比べてb)，c)では不純物量が減少していることがわかる。b)，c)の不純物量，操作性，回収率などからイオン交換樹脂の使用が適当と判断した。また，再結晶のむずかしい粘性剤についてもイオン交換樹脂の適用は可能である。イオン交換樹脂としてはVの電解液の場合Ammediol，粘性剤両者共にIRA-410，411の併用が有効であった。

3. バルプロ酸の分析¹⁾

血清中には多量のリン酸並びに乳酸が含まれているが，これらとバルプロ酸を分離するには表IのシステムII，III(溶媒は水)が適当であった。

血清を直接IPで分析することもできるが，多量に含まれる塩化物イオンのため分析時間が長くなるのは否めない。そこですりつぶした炭酸銀による簡便かつ効率の良い脱塩化物イオン法を検討した。

血清1mlに対し，水4ml，炭酸銀25mgを加え練り合わせた後，遠心分離する。血清を処理せず直接分析に供したものでは分析時間は約30分かかかるが，この方法を採用することにより分析時間を約15分と半減することができた。

このときの定量値の一部を酢酸エチル抽出後GLC分析したものと比較して表IIに示す。その他，アセトニトリルで除タンパク後GLCやHP LCで分析したものやメチル化してGC分析を行ったものと患者血清52点について比較したが，相関係数は80-98%を示した。ばらつきが大きいものもあるが，測定時の試料

表II 患者血清中バルプロ酸濃度定量値

検体 No.	バルプロ酸 投与量 (mg/日)	バルプロ酸濃度 (μg/ml)		
		IP (無処理)	IP (炭酸銀処理)	GLC
1	300	34.1	34.3	33.0
2	450	45.7	43.4	43.0
3	0	N. D.	N. D.	N. D.
4	600	36.2	38.5	35.6
5	400	60.3	63.7	50.3
6	350	28.1	27.8	29.3
7	350	41.3	40.5	45.3
8	350	66.8	67.0	52.5
9	400	59.3	62.3	52.5
10	200	54.2	57.5	46.7

の状態，測定日，測定者が異なったことを考え併せると血中有効濃度の測定には十分適用できるものと考えられる。

4. フェニトイン等の分析

フェニトイン，フェノバルビタール，エトサクシミドは表IのVの電解液を用いて血清中他成分と分離できた。このときバルプロ酸などの他の抗てんかん剤は妨害にはならなかった。図2に健常人血清にこれら薬物を添加し，炭酸銀による脱塩化物イオン処理を行ったときのイソタコフェログラムを示した。

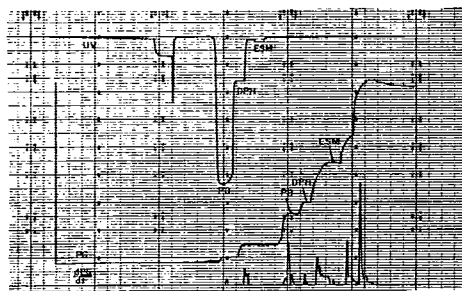


図2 抗てんかん剤添加健常人血清(炭酸銀処理)

謝辞 本研究に際し，バルプロ酸のGLC分析に協力して頂きました岐阜薬科大学河合聡先生並びに大日本製薬(株)総研宇津井雄三氏に深く感謝致します。

1) 児嶋佳世子，八木孝夫，近藤和子，伊藤賢治，河合聡，臨床化学，14，41(1985)

1. はじめに

細管式等速電気泳動法 (ITP) による人工腎臓透析患者血清 (以下患者血清と略す) の分析を行い、健常人血清には見られない254nm にUV吸収を持つ幾つかの陰イオン成分の存在を明らかにしてきた。ITPは除蛋白操作をすることなく血清中の微量のイオン成分を迅速に分析することができ、患者血清のスクリーニング等に適していると思われる。しかし先に述べた陰イオン成分の定性はなされておらず、今回定性を目的としてITP及びHPLCの分取法を用い、最終的にガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) にて定性を行った。

2. 実験

① 島津細管式等速電気泳動装置: IP-3A型、IP-2A型を使用し、分取には分取付属装置: IPP-2A型を用いた。リーディング液は0.01M塩酸、0.02Mβアラニン、0.05%PVA (分取時には添加せず) を用い、ターミナル液には0.01Mカブロン酸ナトリウムを用いた。試料の血清は処理せずに分析に供した。

② 島津高速液体クロマトグラフ: LC-6Aシステムを用いた。カラムにはShim-pack SCR-101H (7.9φ×300mm)、移動相は0.05%過塩素酸水溶液を使用した。血清は1N過塩素酸で除蛋白を行った。

③ 島津ガスクロマトグラフ: GC-15A型並びに島津ガスクロマトグラフ質量分析計: GCMS-QP1000型を使用した。カラムはフューズドシリカキャピラリーHicap CBP-1 (0.33φ×25.0m) を用い、カラム温度を70→300℃ (10℃/min.) に設定した。

3. 結果及び考察

図1に患者血清のITPの分析例を示す。健常人血清には見られない254nm に吸収を持つ陰イオン成分が多数検出されている。これらのUV吸収を持つイオン成分の定性を行うためにITPのみで目的イオン成分の分取を試みたところ、微量であるために単一成分として分取することができなかつた。また逆に試料量を増すと十分な分離が得られない結果となった。そこで、ITPより分取が容易と思われるHPLCにて分取を行うことにした。図1のように分離されたこれらのイオン成分を一括してITPで分取し、HPLCで分析を行った。その結果を図2に示す。この時、相互に矢印1、2の成分が対応していることを確認した。

除蛋白後の患者血清をHPLCで分析して、矢印1、2の成分を含むフラクションを分取した。各フラクションを塩酸酸性下でエーテルまたは酢酸エチル抽出を行った後、溶媒を留去しTMS化を行い、GCMSで定性を試みた。この時、いずれのフラクションからも多数の高級脂肪酸の影響を受け、目的成分の定性には至らなかつた。これらの高級脂肪酸は254nm にUV吸収を持たないこと、更にITPの分析条件では検出されないことを考え合わせると、HPLC分析時に混入してくる不純物と思われる。これらの不純物を取り除くには薄層クロマトグラフィやカラムクロマトグラフィが一般に用られるが、迅速性に欠

くこと、新たに分離条件の検討が必要になること、溶媒抽出や濃縮操作が必要になる等の問題が生じた。そこで、HPLCである程度精製された本試料の場合、目的イオン成分と高級脂肪酸の分離が容易で、溶媒抽出等の複雑な処理を行わずに迅速に分析できるITPを使用して、HPLCで得られた矢印1、2の各フラクションの分取を行った。

ITPの分取で得られた各フラクションの溶媒を除去した後、TMS化してガスクロマトグラフで分析した。図3に矢印1のガスクロマトグラムを示す。カウンターイオンのβアラニンの他に目的成分(※印)と見られる物質が検出された。質量分析の結果、矢印1の成分は4-ヒドロキシ馬尿酸、矢印2の成分は馬尿酸であることが判明した。

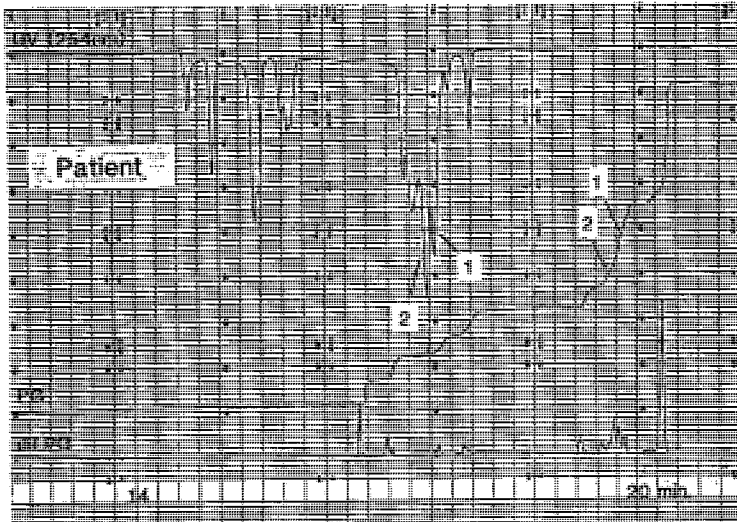


図1 患者血清のITP分析例

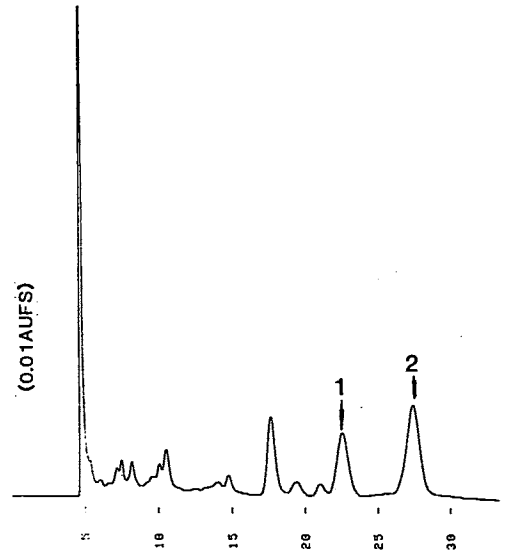


図2 患者血清のITP分取物のHPLC分析例

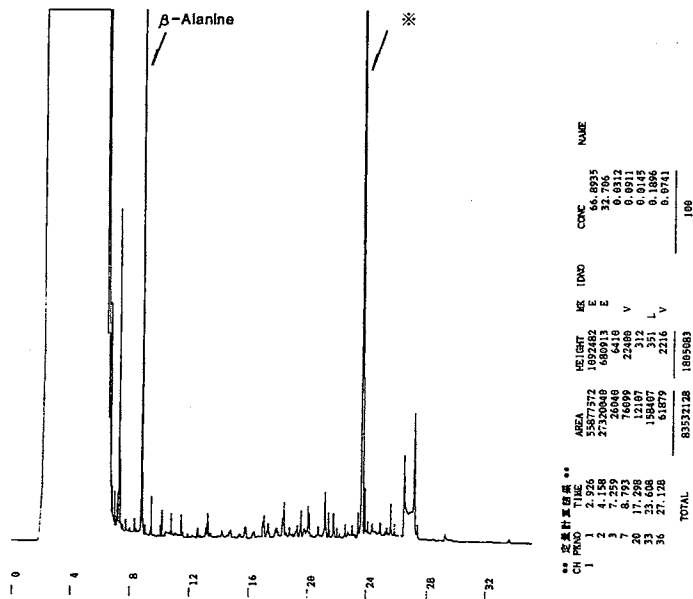


図3 患者血清中の矢印1成分のGC分析例

14 細管式等速電気泳動法による各種中枢神経系疾患髄液中グルタミンの定量

(杏林大・保健) ○平岡 厚, 三浦 勇夫

(国立千葉病院・神経科) 畠永 格, 服部 宗和

ヒト脳脊髄液に含まれる遊離アミノ酸についての初期の研究者たちの報告によると、L-グルタミンが、絶対濃度 ($444 \pm 84 \text{ nmole/ml} \approx 65 \pm 12 \text{ } \mu\text{g/ml}$)¹⁾ 及び血清との濃度比 (髄液/血清の平均値 0.86)²⁾ において、他のアミノ酸各々より数十倍以上多く含まれている。従って、髄液グルタミンの大部分は、血しょう由来ではなく、中枢神経系内で合成されたものであり、その濃度変化は、中枢神経系内の病態を反映し得るものであると考えられる。グルタミンは、 α -ケトグルタル酸とアンモニアより生合成され、又、栄養源として及び neurotransmitter のグルタミン酸の原料として使用され得るが、現在まで髄液のグルタミン酸の臨床化学的研究によって明らかにされていることは、肝性脳症の時に、著しい濃度の上昇 (血液由来のアンモニアが脳内に増加した為と考えられる) が見られることだけであり、³⁾ 血中アンモニアの異常高値を伴わない大部分の精神・神経疾患や正常者における髄液グルタミン濃度の変動の臨床化学的・生理的意義は不明である。今回我々は、細管式等速電気泳動法により、髄液アミノ酸全体を定量分析することなしに、グルタミンのみを簡便に分析する系を確立し、それを用いて、多数の髄液検体中のグルタミン濃度の測定を行なった。

(材料及び方法)

材料: 国立千葉病院・神経科に入院中の各種の中枢神経系疾患 — 脳血管障害、脳や髄膜の炎症、変性脱髄性疾患、代謝性疾患 (肝性脳症を含む)、腫瘍、てんかん、機能的な精神病、神経症など — の患者腰椎より採取された、のべ80余例の髄液検体を、 -20°C で凍結保存 (約1週間) した。

方法: 装置は、島津 IP-2A (PGD-2 Potential Detector 付) を使用し、分離は 20°C に維持されたテフロン細管 ($1 \text{ mm} \times 4 \text{ cm} + 0.5 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$) 中に行なった。電流は、初期10分を $200 \mu\text{A}$ 、続いて $100 \mu\text{A}$ に stabilize し、Leading Ion として 0.005 M MES (amediol を用いて $\text{pH} 9.05$ に調節)、Terminal Ion として $0.01 \text{ M } \beta\text{-Alanine}$ ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ により $\text{pH} 10.8$ 又は triethanolamine により $\text{pH} 10.0$ に調節) を使用、検出は電位こうばいによった。試料は、凍解直後 10 ml を注入した。Chart speed は 40 mm/min. で行なった。なお、Leading 液は、 0.04% (w/v) の HPMC を含む。

(結果及び考察)

試料を注入し、 $200 \mu\text{A}$ の初期電流を通じると約 10 kV の電圧がかかり、10分後に $100 \mu\text{A}$ に切りかわると約 4 kV に低下。再び上昇して 7 kV になる頃には、空気中の CO_2 に由来する HCO_3^- 、髄液中の Cl^- 、有機酸、酸性アミノ酸等、移動度の大きい陰イオンはすべて通りすぎて Leading Ion の MES の安定したゾーンが検出され、以降は、Fig. 1 のような isotachopherogram が得られた。矢印の主成分ゾーン (PU: 約 0.3) は、グルタミンに対応しており (標品との混合分析によるゾーン長の延長により同定)、定量性も良好であった。1試料の分析に要する時間は約40分であった。髄液蛋白質中で移動度の大きい prealbumin, albumin 等は、本分析系では Terminal Ion の $\beta\text{-Alanine}$ よりも低い PU 値

を持たなかった。従って、この系は、一部の中性アミノ酸等きわめて限られた物質のみを検出・定量する為のものである。

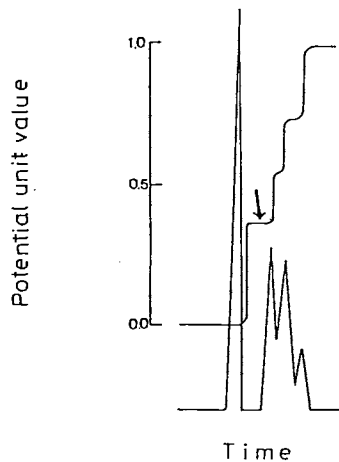


Fig. 1. A Typical Isotachopherogram of Cerebrospinal Fluid

Leading Electrolyte: 0.005M MES-Amidol (pH 9.05)

Terminal Electrolyte: 0.01M β -Alane-Triethanol-amine (pH 10.0)

Sample: 10 μ l of Cerebrospinal Fluid

Current: 100 μ A Chart Speed:

40 mm/min. The arrowed zone corresponds to L-glutamine.

上記の分析系にもとづいて、80余例の髄液検体中のグルタミン濃度を測定したところ、肝性脳症でない、すなわち血中アンモニアが異常高値になっていない人の髄液グルタミン濃度は、20 μ g/ml台から100 μ g/ml台までの正規分布型の濃度分布を示し、初期の研究者たちが報告した値¹⁾²⁾に近い数値となった。10才台から80才台までの年代別の集形では、有意差は認められなかった。髄液の臨床検査において測定された総蛋白量、糖、クロールの濃度との間には相関性は認められなかったが、細胞数が増加する現象(pleocytosis)とグルタミン濃度の上昇が結びついている例が、炎症性の疾患を中心に観察された。脳血管障害や変性・脱髄疾患等において脳実質に器質性の損傷のある場合、総蛋白量や細胞数が正常範囲内であっても、髄液中のNeuron Specific Enolaseの濃度(Enzyme Immuno Assay法で測定)の上昇が見られたが、そのような例と髄液グルタミン濃度の増加とは一致していなかった。以上より、髄液グルタミンは、その大部分が中枢神経系内で合成されたものであるが、その濃度の上昇は、傷害を受けた脳組織からの逸脱によってではなく、脳内における何らかの代謝活動が活発になっていることによって生じるものと考えられた。

参考文献

- 1) Gjessing, L.R. et al: Eur. Neurol. 12, 33 (1974)
- 2) McGale, E.H.F. et al: J. Neurochem. 29, 291 (1977)
- 3) Plum, F.: Exp. Biol. Med. 4, 34 (1977)

15 DL-Propargylglycine を投与したラットの各種臓器中の Cystathionine と N-acetylcystathionine の定量

高知医科大学 化学

○溝淵詔子、揚田富子、児玉裕敬

Cystathionine 尿症患者の尿中には Cystathionine とともに N-acetylcystathionine も多量排泄されていることが報告されている。又最近では Cystathionine γ -lyase の自殺基質である DL-Propargylglycine をラット腹腔に投与することにより実験的に Cystathionine 尿症を作ることができるようになった。このラットの尿中にも Cystathionine 及び N-acetylcystathionine が排泄されており、これらの物質は主としてアミノ酸分析器により定量されていた。そこで我々は細管式等速電気泳動を用いて上記の物質の定量について検討し、DL-Propargylglycine を投与したラットの各種臓器及び尿中の定量を行なった。

実験方法：

DL-Propargylglycine (10mg/200g) をラット腹腔に投与し、投与後定められた時間に屠殺し速やかに各組織を分離し、5倍容の2% SSA 溶液でホモジネートし、遠心分離した後、その Supernatant を Diaion SKI (H-form) のカラムにかけ、水洗後 2N-NH₃ で溶出した。その溶出液を減圧乾固し、残渣を一定量の水に溶解し、細管式等速電気泳動により分析した。尿の処理も同様に行なった。

Cystathionine の分析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 (pH 8.9、5% ポリビニールアルコールを含む)、終末電解液は 0.01M γ -アミノ酪酸と Ba(OH)₂ (pH 10.9) を用い、N-acetylcystathionine の分析には、先行電解液として 0.01M HCl と β -alanine (pH 3.1)、終末電解液として 0.01M caproic acid が用いられた。

成績：

Cystathionine の定量については、すでに報告してきた。Fig 1 には Authentic N-acetyl-Cystathionine (A)、正常な肝臓の Sample (B) と (B) に NAC-cystathionine、ASP、GSH、Glu を加えたものの電気泳動を示している。

正常なラット (B) の肝臓には NAC-cystathionine は検出されなかつた。また、NAC-cystathionine と ASP、Glu、GSH 等はこの泳動条件でよく分離することが確認された。

Fig 2 には正常ラットの脾臓 (A)、DL-Propargylglycine を投与した後の脾臓 (B)、及び B に NAC-cystathionine を加えた時の電気泳動のパターンを示している。NAC-cystathionine は脾臓でも正常ラットでは検出されなかつたが、DL-Propargylglycine を投与したラットの脾臓では検出することが可能であつた。

Fig 3 には NAC-cystathionine の検量曲線を示しているがその検量線はよい直線性を示した。Table 1 には脾臓における Cystathionine と NAC-cystathionine の定量をアミノ酸分析器と細管式等速電気泳動で定量した結果を示している。その結果はかなりよく一致しており、この方法で十分定量出来ることを示している。

尚、現在 DL-Propargylglycine を投与した後の各種組織及び尿中の Cystathionine と NAC-cystathionine の定量を行なっているため、その結果も合せて報告する。

Fig. 3 Standard curve of authentic NAc-cystathionine. 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.

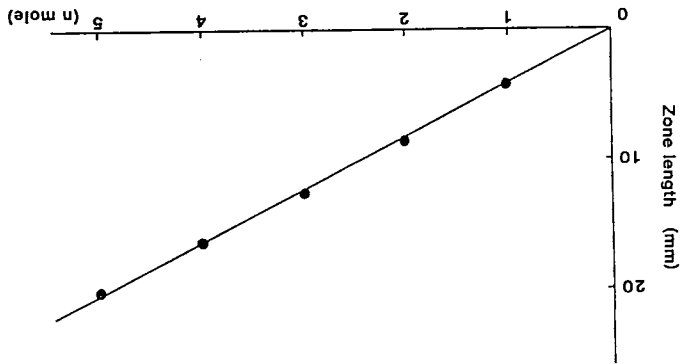


Fig. 2 Isoelectrophoretic runs of pancreas of normal rat(A), D,L-propargylglycine treated rat(B) and (B) + NAc-cystathionine(C).

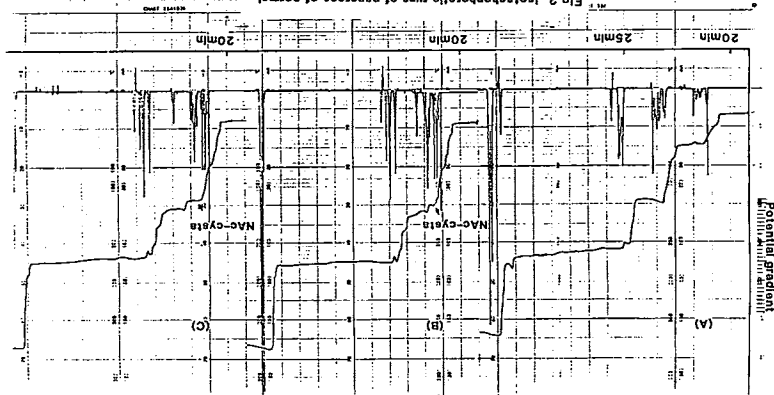


Fig. 1 Isoelectrophoretic runs of authentic NAc-cystathionine(A), liver of normal rat(B) and (B) + NAc-cysta + Asp + GSH + Glu(C).

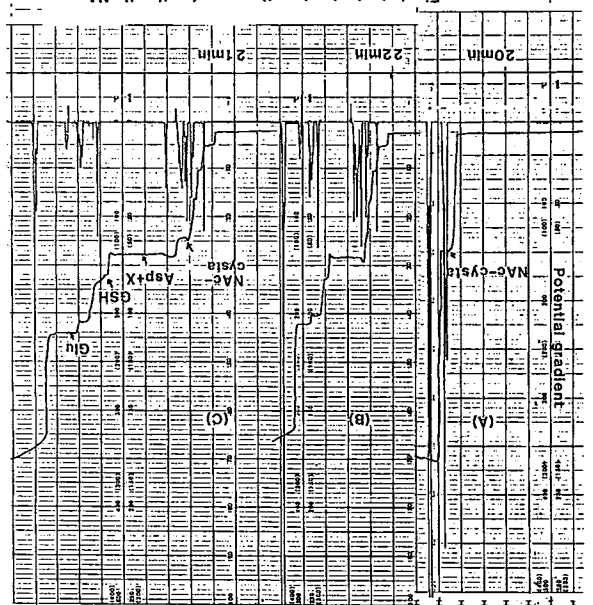


Table 1
Determination of cystathionine and NAc-cystathionine in pancreas of D,L-propargylglycine treated rats.

Time	NAC-cystathionine		cystathionine	
	Isoelectrophoretic analyzer (pmoles/ml)	Amino acid analyzer (pmoles/ml)	Isoelectrophoretic analyzer (pmoles/ml)	Amino acid analyzer (pmoles/ml)
5hr	N.D.	0.01	0.86	0.95
10hr	0.18	0.16	2.54	2.81
15hr	0.27	0.23	4.44	4.20
20hr	0.32	0.34	2.88	2.73
24hr	0.28	0.22	2.97	2.81

16 P G 微分法による等速電気泳動図の解析 (2) 発光細菌のタンパク質の分析

城西大学・理・化学 ○小林 英三郎・伊藤 幸代

『d P G イソタコフェログラム』

細管式等速電気泳動法 (I T P) において、P G 信号の微小変化 $\Delta P G$ に属するゾーン長 (t)、およびこのゾーンに含まれる物質の UV 吸収量 (A) を、P G 値に対してプロットすれば『d P G イソタコフェログラム』を得ることが出来る。^{1)~6)}

I T P でタンパク質のように移動度が近接した成分を分析する場合、多成分系の両性電解質であるキャリアアンホライトまたはアミノ酸等の混合物をスぺーサーとして用いられている。用いるスぺーサーの量によって、また検体に含まれるタンパク質の量によって UV 信号は時間軸方向にその巾を増減し吸収パターンは変化してしまう。従って、液体クロマトグラムのようにリテンションタイムで定性帰属をするのは不可能であり、UV 吸収パターンのみで紫外吸収物質の同定をするのは高度の判断力を必要とする。『d P G イソタコフェログラム』においては、UV 信号は常に物質固有の電気泳動的性質を反映する P G 値への帰属が出来るので、試料およびスぺーサーの組成が異なっても、P G 値に基づく R E 値を定性指標として再現性が高いより詳細な解析が可能である。

『発光細菌のタンパク質の分析』

1. タンパク試料の調製

発光細菌 (*Photobacterium leiognathi* SC-1002) を B G P Y 培地で培養し、菌体による発光が終了したのちの定常状態の菌体を集菌した。洗浄菌体を 0.1 M リン酸緩衝液で懸濁し、音波破碎器にて処理し 12,000 × g の上清を得、細胞抽出液とした。

2. 分析条件

島津細管式等速電気泳動分析装置 I P - 2 A、紫外線吸収検出器 U V D - 1 0 A
プレカラム 1.0mm × 40mm 分析カラム 0.5mm × 300mm
Leading buffer 5mM HCl pH 9.2 with 2-AMP containing 0.2% HPMC
Terminating buffer 50 mM Arginine
スぺーサー キャリアアンホライト (pH 3.5~10.0), ホリハッファ-74,96
上記アンホライトを 100 倍希釈して 1 : 1 : 1 に混合したものをスぺーサー混合液とする。

3. データ処理

島津クロマトパック C - R 2 A、C - R 3 A
N E C P C 9 8 0 1、C O N T E C A D 1 2 - 1 6 S
P G、U V 各検出器から得た信号は C M T または F D に記録し d P G 処理プログラム [I P D P G] により『d P G イソタコフェログラム』を描いた。

『結果』

スぺーサー混合液 6 μ l に対し、透析した細胞抽出液の各 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l を試料として使用した I T P の分析結果を Fig. 1a, 1b, 1c の『イソタコフェログラム』に示した。試料量の増加にともない時間軸方向へ UV 信号が巾を広めていることが明確である。この結果を [I P D P G] により処理し『d P G イソタコフェログラム』に描いたものを

Fig.2に示す。a, b, cはそれぞれ Fig.1a,1b,1cに対応し試料量を増加させたものであるが、各ピークは横軸のPG値の一定の範囲に入っており、PG値による各ピークの帰属が可能である。

細胞抽出液を2 μ lに固定し、スパーサー混合液を3 μ l, 6 μ l, 12 μ lの各量を用いたもの『dPGイソタコフェログラム』をFig.3に示す。a, b, c, はそれぞれスパーサー混合液を増加したものであるが、各ピークは横軸のPG値の一定の範囲に入っており、先の結果同様に使用したスパーサーの量や種類に関わらず、PG値による各ピークの帰属が可能である。

『イソタコフェログラム』で見ると高いPG値の領域にシャープなピークがあるが、スパーサー分布を『dPGイソタコフェログラム』で判断すると、この場合高いPG値の領域にはスパーサーが”粗”であり、疑似ピークが生じたものであると分かる。

Fig. 1 『イソタコフェログラム』

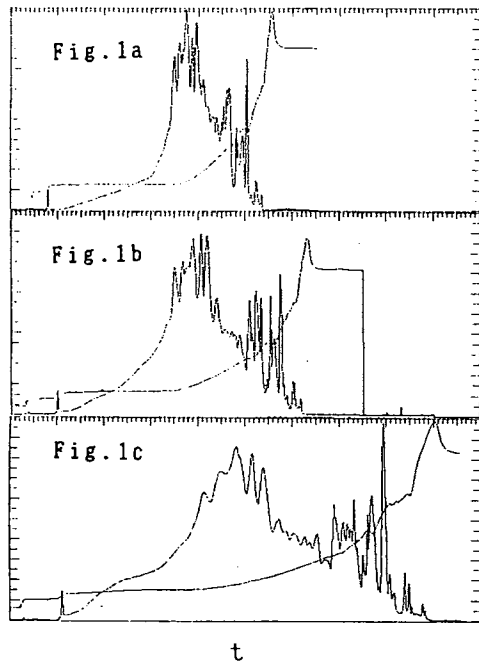


Fig. 2 『dPGイソタコフェログラム』

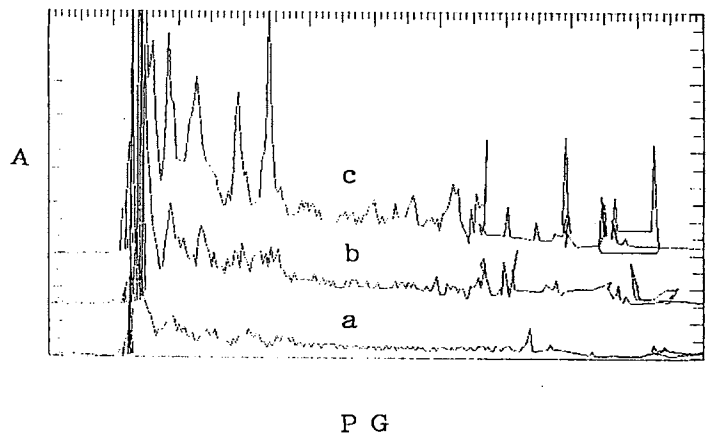
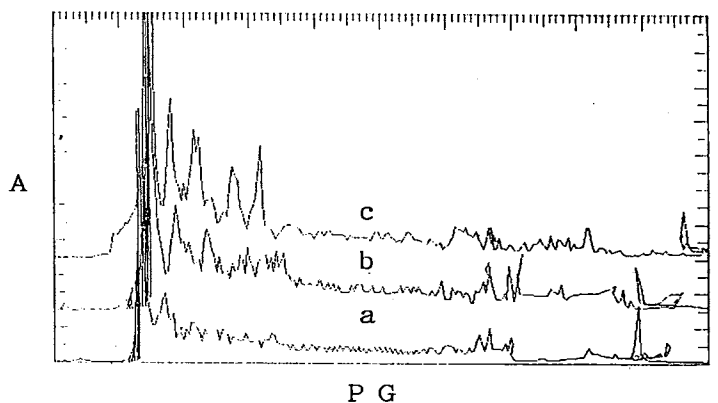


Fig. 3 『dPGイソタコフェログラム』



- 1) ~ 5) 小林 英三郎 細管式等速電気泳動シンポジウム(1983,1984,1985,1986,1987)
 6) 小林 英三郎 生物物理化学 Vol.31 No2 p51(1987)

序 論

近年、化学物質¹⁾の安全性試験項目の一つとして、視覚毒性試験の重要性が強調されるようになってきており、現在、ルーチン化されている前眼部の視診や眼底検査以外にも、その機運が出てきている。特に眼科領域における臨床視覚電気生理学の研究は急速に展開されている。その中でも、電気生理学的手法である網膜電位図(以下ERG)や視覚誘発電位(以下VEP)の臨床応用は多岐に渡り、その内容も多彩である。

このような観点から酢酸エチルに溶解させたToluene diisocyanate(以下TDI)を用いて、モルモットの鼻腔内に反復して塗布することにより、喘息とアレルギー症状の双方を動物に惹起させることを見出し、これまでいろいろな機会に報告して来た。今回は、このモデルで、塗布後、多量の涙液や充血等が目に見えられたため、細管式等速電気泳動法による涙液の蛋白成分の検討²⁾と併せて、ERGおよびVEPの双方を経日的に記録し、波形の形態的推移について検討した結果を報告する。

実験材料および方法

実験動物

動物は、Hartley系雄性モルモット(300-600g)を1群4匹使用した。これらの動物は、室温 22 ± 2 ℃、湿度 50 ± 10 %および明暗周期12時間に維持管理された動物室で、個別飼育し、予備飼育と検疫終了後、実験に供した。

薬 物

網膜機能低下モデル作成のために用いた薬物は、2.4 TDIと2.6 TDI(片山化学製)の混合比4:1のもので、酢酸エチル(和光純薬製)で、その都度溶解させ、左右鼻前庭部分に塗布した。また、対照群には酢酸エチルのみを同様に塗布した。

網膜機能低下モルモットの作成

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 μ lずつ1日1回連続7日間モルモットに塗布し、感作後、3週間のインターバルを経過後、週2回同じように塗布し惹起24回繰り返し作成したものを実験に供した。

細管式等速電気泳動法

細管式等速電気泳動法は、島津1P-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 HCl-10mM ammadio-0.1% HPMC、pH8.95とし、ターミナル液(T)として、10mM、AGA-10mM ammadio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、lucine、glutamic acid、 β -alanineを各10mg/10mlの0.4ml、pH3.5~9.5のamyholine50 μ lを溶解し、蒸留水で1mlとした、スプレー溶液30 μ lに試料10 μ lを加えて混合し、1 μ lを分析した。

通電は、最初の12分間を150 μ A、続いて75 μ A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。

ERGおよびVEPの記録

ERG記録用電極は、ソフトコンタクトレンズ型電極を用い、散瞳処理後、左側眼角膜面に装着し、不感電極は外側強膜に装着した。VEP記録用電極³⁾は、ネジ電極を用い硬膜上に接するように頭骨内に埋没した。埋め込み位置は、頭骨上ブルグマの後方15mmを起点とし、不感電極は、ブルグマの前方3mmとした。

光刺激は、光刺激装置(日本光電製、MEM-3202)を用い、被験眼の前方約30cmに設置したキセノンランプより行った。また、光刺激強度は、20ジュールで10秒間隔に50回の光刺激に対する反応と同時加算し、時定数は0.01秒および0.003秒で記録した。(Fig.1)。

ERGおよびVEPの計測

各波成分の振幅および潜時a波・b波の計測法に準じて行った。すなわち、ERGの波の振幅は、基線からa波の頂点まで、b波の振幅は、a波の頂点からb波の頂点までとして各々計測した。次に、VEPでは、最初の陽性波(P1波)の頂点から最初の陰性波(N1波)の頂点までの振幅をP1-N1振幅として計測した。潜時は、いずれも光刺激時点から各々の波の頂点に至るまでの時間とした。

眼底検査

ERG記録眼と対側の眼球を、散瞳剤5%トロピカミド(ミドリンP[®]、参天製薬)点眼にて散瞳処理後、動物用眼底カメラ(コーワ、RC-II model 621)を用いて、眼底像を観察し、惹起24回目に撮影した。

病理組織学的検査

検査は、酢酸エチル塗布群およびTDI塗布群で惹起24回を経過したモルモット網膜について行った。すなわち、エーテル麻酔下で、左右眼球を摘出し、6%Glutaraldehyde液に浸漬後、5%Formaldehyde液中に固定・保存し、その後、パラフィン包埋を行い、3-4 μ に薄切し、Hematoxylin-Eosin染色を施し検鏡した。

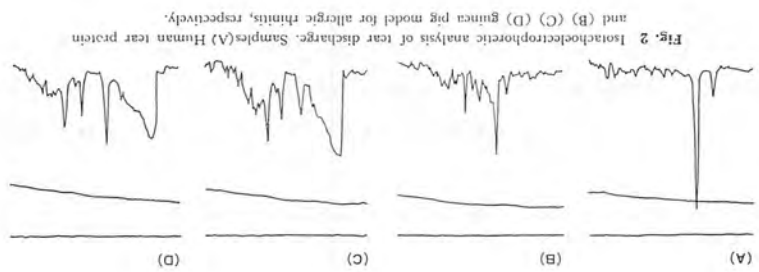


Fig. 2 Isoachroelectrophoretic analysis of tear discharge. Samples (A) Human tear protein and (B) (C) (D) guinea pig model for allergic rhinitis, respectively.

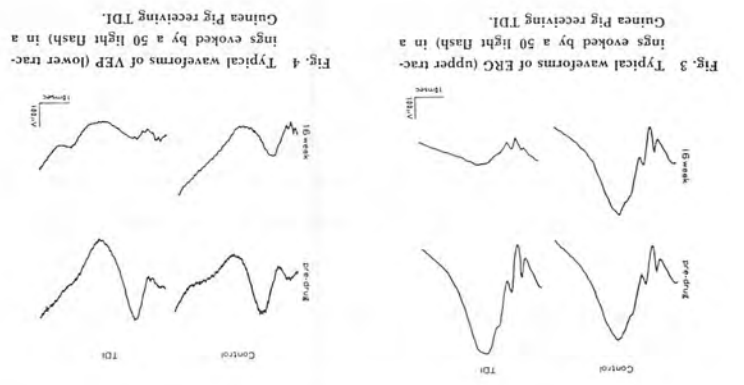


Fig. 3 Typical waveforms of ERG (upper tracings evoked by a 50 light flash) in a Guinea Pig receiving TDL.

Fig. 4 Typical waveforms of VEP (lower tracings evoked by a 50 light flash) in a Guinea Pig receiving TDL.

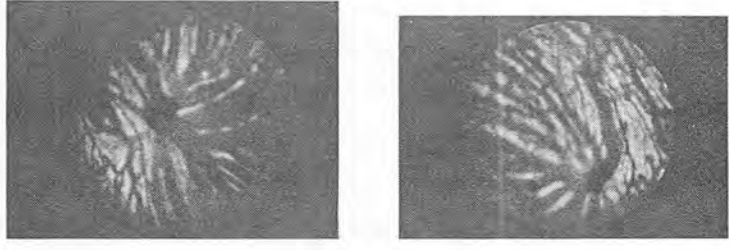


Fig. 5 Ocular fundus of a Guinea Pig receiving TDL.

Fig. 6 Normal ocular fundus of Guinea Pig.

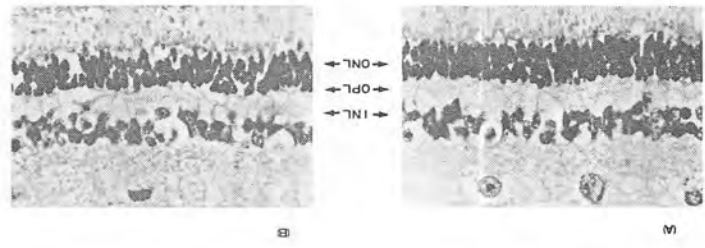


Fig. 7 (A) Light micrograph of the retina of a control Guinea Pig. (B) Light micrograph of the retina of a Guinea Pig receiving TDL. INL : Inner nuclear layer. OPL : Outer plexiform layer. ONL : Outer nuclear layer.

新潟大学医学部法医学教室 山内春夫、小野政孝

細管式等速電気泳動法（イソタコ）は、試料の前処理を殆ど必要とせず、かつ短時間で分析が可能である等の利点を持っており、法医学の分野でもその応用範囲は広いと考える。

今回、我々は、島津 IP-3Aで、3種類の検出用キャピラリーによる血清分析を行ってみた。

〔方法〕

1. 島津細管式等速電気泳動装置（IP-3A）はリーディング電極（L）、ターミナル電極（T）ヘルピング電極（H）の3電極形で、T-H間及びT-L間で通電し、その分析はUV検出器（280nm）及び電位勾配検出器（PGD）で検出し、電位勾配の微分信号（PGF DIFF）とともに3ペンのレコーダーで記録した。
2. リーディング液は、5mM HCl- 10mM Ammediol- 0.1% HPMC 4000（シグマ）、ターミナル液は、10 mM 6- Aminocaproic acid -10 mM Ammediolを Ba(OH)で PH 10.8 に調整したものを、スパーサー溶液には、数種類の 0.2 mM アミノ酸に pH 3.5~9.5 の Ampholine (LKB) が 2%となるように加えたものをを用いた。
3. 検出用キャピラリーは次の3種類について比較した。内径 0.2 mm のヒューズドシリカキャピラリー（以下「 ϕ 0.2mm」）、内径 0.3 mm 及び内径 0.5 mm の FEP製キャピラリー（以下「 ϕ 0.3mm」及び「 ϕ 0.5mm」）

〔結果及び考察〕

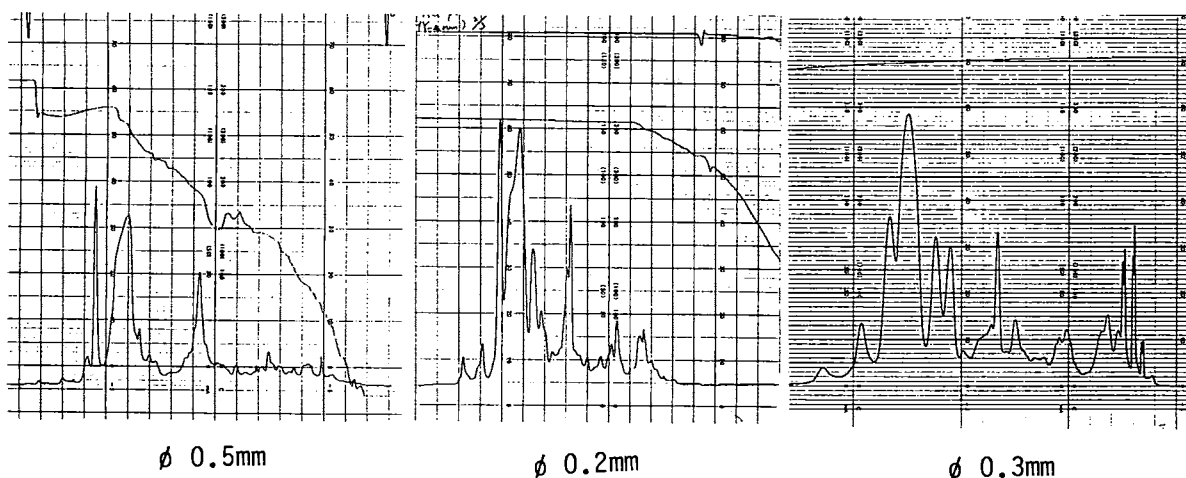
〔1〕 ϕ 0.5mmの FEP製キャピラリーによる分析

- (1). T-L間で、最初の 5分間 150 μ A、次に 75 μ A の定電流で12~20分間泳動した。
- (2). 血清とスパーサー溶液とを 1:3 になるように混合し、その 1 μ l を注入して分析を行うと、そのUVパターンは、A1b 領域、次いで、Tf、 γ -G1 の順にピークを認めた。このパターンは、従来の IP-2A等での分析結果の報告と略一致している。
- (3). 血清を室温及び冷蔵庫（4℃）で 22 日まで保存し、経時的に分析を行ったところ、室温では 7日、冷蔵庫内では 14 日までのものは、最初の新鮮な血清の分析パターンと略同じパターンを示した。
- (4). 血清を -80℃で冷凍後に解凍したものについてみると、解凍後 1日以内では新鮮な血清の分析パターンと略同じパターンを示したが、解凍後室温並びに冷蔵庫で保存した場合には 2~3 日でパターンの変化が著明となった。

〔2〕 ϕ 0.2mmのヒューズドシリカキャピラリーによる分析

- (1). T-H間で Q値に達するまで、最初の 1~2 分間 200 μ A、次に 150 μ A の定電流で泳動し次に、T-L間で、20 μ A 4分間、さらに10 μ A の定電流で15~20分間泳動した。
- (2). 血清とスパーサー溶液とを蒸留水で各10倍に希釈し、1: 1, 2, 3, 4, 5, 6 の割合で混合し、各 1 μ l を注入したところ、1:3 の割合が最適であった。
この時の泳動パターンは、 ϕ 0.5mmで、血清とスパーサー溶液とを 1:3 になるように混合し、1 μ l 注入したものと同一パターンを示しており、 ϕ 0.5mmに比べて約10倍の高感度の分析が可能であることを示唆している。

- (3). 血清とスぺーサー溶液とを蒸留水で各10倍に希釈し、1:3の割合で混合したものを1~8 μ l 注入したところ、注入量とともに分析時間が長くなり、個々のピークが巾広くなった。注入量としては、1~3 μ l が適量と考えた。
- (4). 血清とスぺーサー溶液の希釈倍数を、各10倍、20倍、40倍としたものについて比較したところ、40倍希釈したものを4 μ l 注入したものと20倍希釈したものを2 μ l 注入した場合、10倍希釈したものを1 μ l 注入したものは略同じパターンを示した。
- (5). ϕ 0.2mmでは、流路や検出器がつまりやすく、流路の点検、洗浄を十分に行う必要があった。特に、ターミナル液の流路に炭酸バリウムの白色の細かい結晶が出現しやすく、各溶液のリザーバーに付属の炭酸ガス除去ユニットを取りつけることによる効果がみられた。
- (3) ϕ 0.3mmの FEP製キャピラリーによる分析
- (1). T-H間でQ値に達するまで、最初の2分間 200 μ A、次に4.0kVの定電圧、さらに150 μ Aの定電流で泳動し、次に、T-L間で、20 μ A 6分間、さらに10 μ Aの定電流で15~20分間泳動した。
- (2). ϕ 0.2mmの場合と同様に、血清とスぺーサー溶液とを蒸留水で各10倍に希釈したものを、1:3の割合で混合し、1 μ l 注入したところ、 ϕ 0.2mmの泳動パターンと略同様のパターンが得られた。即ち、 ϕ 0.3mmでも、 ϕ 0.5mmに比べて約10倍の高感度の分析が可能であった。
- (3). ϕ 0.3mmでも、 ϕ 0.2mmの場合と同様に、流路や検出器がつまりやすく、流路の点検、洗浄を十分に行う必要があった。しかし、 ϕ 0.3mmでは、泳動管のキャピラリーチューブが交換可能であり、交換が不可能な ϕ 0.2mmよりも保守管理は容易であった。



なお、 ϕ 0.3mm FEP製キャピラリーは島津製作所の八木孝夫氏の御好意により、貸与され使用させて頂いた。島津製作所の関係者の方々に深謝致します。

19 細管式等速電気泳動法による血清トランスフェリンの比較生物学的研究

専修大学・法・生理 吉田治弘

細管式等速電気泳動法（以下CITP）による血清の分析は、Delmotteの報告以来、多数の研究者により分析法の改善に関する検討及び蛋白質の同定ならびに利用法などが明らかにされている。演者も健常者と白血病患者血清あるいはイヌ、ウマなどの動物血清の検査をする機会を得て、特別の条件を考えずに八木ら、日根などの報告した条件で検討を進めたところ、ヒト、ウマでは簡単に血清トランスフェリン（以下Tf）の遺伝的多型性を、またイヌ血清ではハプトグロビン（以下Hp）の量的差異の検出に極めて有用なことを見いだしてきた。しかし、他種の動物については、血液を採取する機会が少なく分析せずに来ていたが、今回、比較的多種類の動物血清について検査する機会を得た、しかし個体数の僅少ななものもあり十分な検討ではないが参考になればと紹介する。

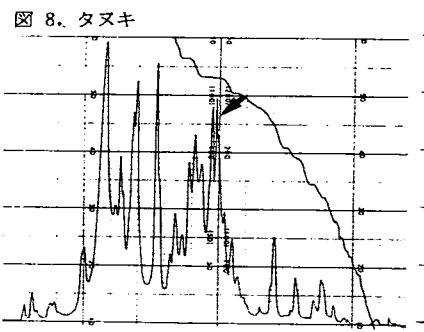
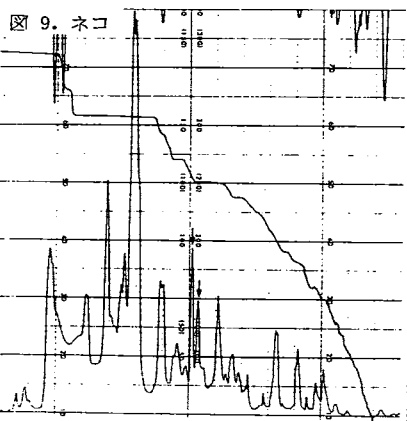
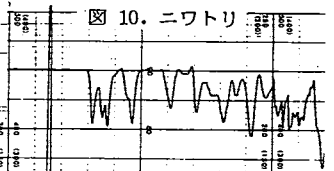
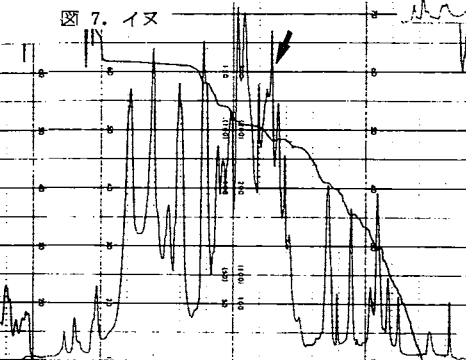
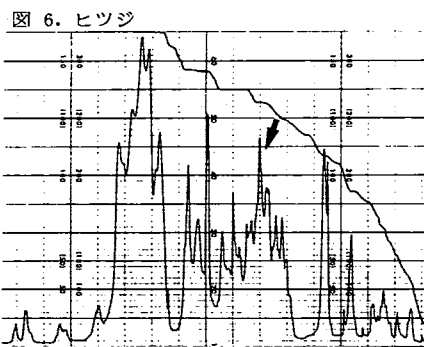
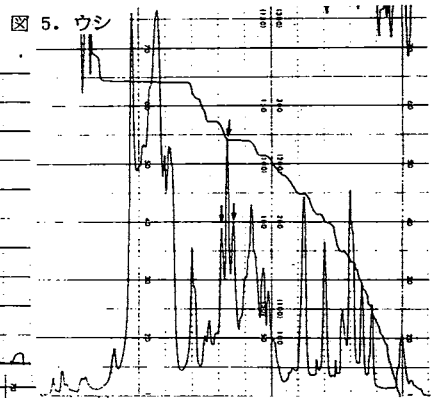
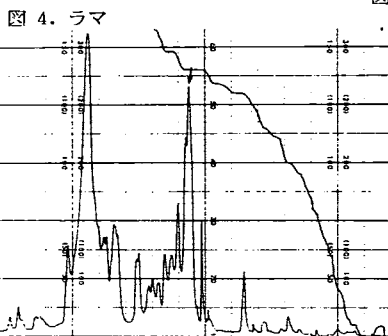
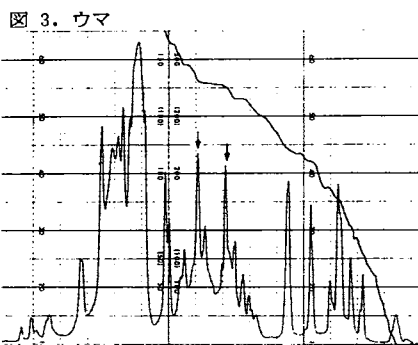
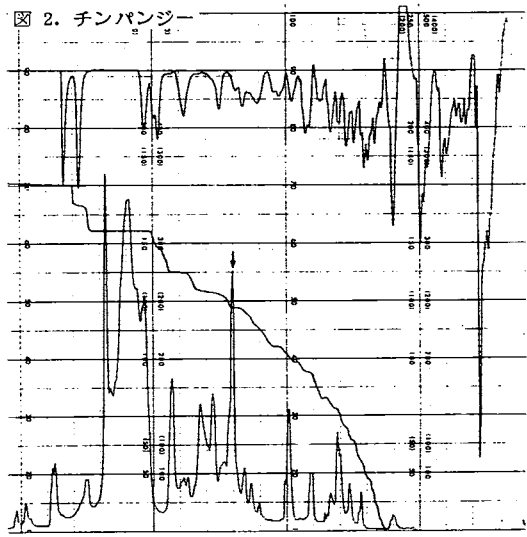
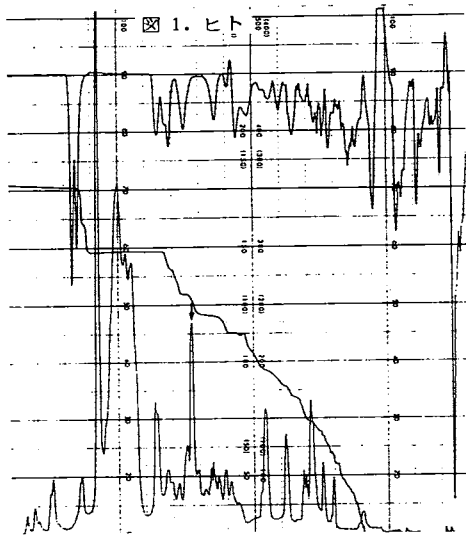
材料と方法

分析に供した動物血清はウシ、ウマ、ヒツジ、ラマ、イヌ、タヌキ、ネコ、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリ、シャチ、イルカ、チンパンジーおよびヒトの15種であり、血清は分析に供するまで -60°C にて凍結保存していた。分析条件は、島津製作所製IP-2A型を使用し、 $1\phi\times 100\text{mm}$ のプレカラム、 $0.5\phi\times 300\text{mm}$ の分析用カラムにより、リーディング液には $5\text{mM HCl}-10\text{mM Ammediol}-0.1\% \text{ HPMC}$ $\text{pH} 8.9$ 、ターミナル液には $10\text{mM } \epsilon\text{-ACA}-10\text{mM Ammediol}-\text{Ba}(\text{OH})_2$ $\text{pH} 10.8$ とした。通電は $125\mu\text{A}$ 15min. 続けて $75\mu\text{A}$ 13min.とした。試料は血清 $5\mu\text{l}$ に $15\mu\text{l}$ のスペーサー溶液（ $3.5\sim 9.5$ Ampholine $50\mu\text{l}$ 、アミノ酸溶液（Asp.Glu.Val.Leu. β -Ala.Gly.Tricine 各 $10\text{mg}/10\text{ml}$ ） 0.4ml 、蒸留水を加えて 1ml とした）を加え、よく混和したものを $1\mu\text{l}$ を注入した。検出は 280nm のUV吸収で行い16min.から $4\text{cm}/\text{min}$ で記録した。

実験結果

ヒトを始めとする15種の動物血清について、CITPによる分析を実施したところ、それらの一部は図1~10に示す様に、血清のUV吸収パターンに顕著な種属差が見られた。特に興味深いのは、Alb. Tf.域に検出された種属間差異である。ウシ、ウマ、ヒツジなどの動物にあつてはAlb.の遺伝的多型性が明らかにされ、CITPにおいてもそれらを示唆する結果を得ている。ここでは、標題に掲げたTf域について検討を進めると、まずM2D-PAGEでのパターンでは、チンパンジー、ラマ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリなどは、ヒトに似たpH、分子量域に数個のスポットとして観察され、イヌ、ネコ、タヌキはpHはややアルカリ寄りに、分子量は高分子域に寄つたものと推定された。また、ウシ、ウマは、各々に特有のパターンを示していた。CITPでのTf域は、まずヒトとチンパンジーのパターンを比較すると、図1,2に示す様に、ヒトでは単一の大きなピークが検出され、チンパンジーでは、この域に3本のピークとして検出されたが、最も遅いピークがTfと思われる。ウマとラマ（ラクダ科）の血清では、図3,4に示すようであつた。ウマについてはすでに100例以上の検査を終え、矢印の所にTfを確認している。ラマは、一例のみであるが、M2D-PAGEの結果を参照すると矢印で示した大きなピークと思われる。ウシでは、図5に示すように矢印で示した3つのピークがTfである。ヒツジについては、図6に示す様に、Tfの前の域に個体差が検出されるが、蛋白質としてはまだ未同定である。Tfについては、矢印の所と推定しているが、確実という点ではもう一つである。イヌとタヌキのM2D-PAGEのパターンはよく似ており、タヌキがイヌ科であることもうなずける結果であつた。CITPの結果では、図7,8に示す様に、やはりよく似ており、Tfの域も同様の位置と思われた。ネコについては、図9に示すようなパターンが得られ、Pre-Alb域の大きなピークは他の種には見いだすことは出来なかつた特異なものであつた。Tfについては矢印で示した2つのピークと推定された。ニワトリは図10に示す様に、今回の試料の中で唯一の鳥類でありAlbが特異的であるが、Tfについては矢印の部位である。これはすでに種々の報告があり簡単に推定可能であつた。これらの他にイルカ、シャチ、マウス、モルモット、ウサギなどを分析した。

これらの15種の動物種について、何れも例数は少ないもののTf域だけに注目してみると、極めて広いTf域を有するウマのpH範囲、分子量域に全ての動物種のTfが分布していたという意外な結果であつた。しかし、いずれの種においても鉄の輸送蛋白質であることから考えると、当然であつたかも知れない。また、CITPが検出している情報は、IEF-,M2D-PAGEなどの従来の泳動法とは異なる次元からの観察法を提供している可能性もある。



○真鍋 敬・山本 秀子・奥山 典生 (都立大・理・化)

キャピラリー等速電気泳動では、陰極と陽極のあいだに検出器を取り付け、分離泳動していく各ゾーンの検出を行っている。タンパク質の分析には、紫外吸収検出器と電位勾配検出器が用いられており、紫外吸収の値は、分離されたあるゾーン中に、タンパク質がどれだけ存在するかという定量のための情報となり、電位勾配値はゾーン中の試料の移動度に関係しているため、タンパク質を同定するための情報となる。しかし、これらの値は従来チャート上に曲線として記録されるだけであり、紫外吸収ピークと電位勾配値の対応づけやピーク面積の算出は、手作業で行っていた。我々は、キャピラリー等速電気泳動の連続全自動化に伴い、データ収集とデータ処理についても自動化することを試みた。

(方法および考察)

データ収集システムの模式図を、図1に示す。紫外吸収検出器、および電位勾配検出器は島津細管式等速電気泳動装置 IP-2Aのものを用いた。紫外吸収検出器および電位勾配検出器からの電圧は2台の増幅器でそれぞれ約100倍に増幅し、AD変換器を介してマイクロコンピュータ NEC PC 8001+に入力した。入力したデータは、フロッピーディスク上に記録させた。連続全自動分析終了後、ディスク上のデータについて1試料ごとに紫外吸収ピークと電位勾配値を対応づけするデータ処理を行い、縦軸に紫外吸収、横軸に電位勾配をとるグラフ作成を行った。紫外吸収検出と電位勾配検出の時間のずれは、アザイドイオンによって補正した。図2に、記録計に記録されるなまのデータを示し、図3に、紫外吸収検出と電位勾配検出の時間のずれを補正したグラフ、図4に、横軸に電位勾配、縦軸に紫外吸収をとったグラフを示す。図4から、紫外吸収ピークがどのような電位勾配値を持つかが決定できた。こうして紫外吸収値から定量を行い、電位勾配値から同定を行うためのデータ処理の自動化をさらに進めている。

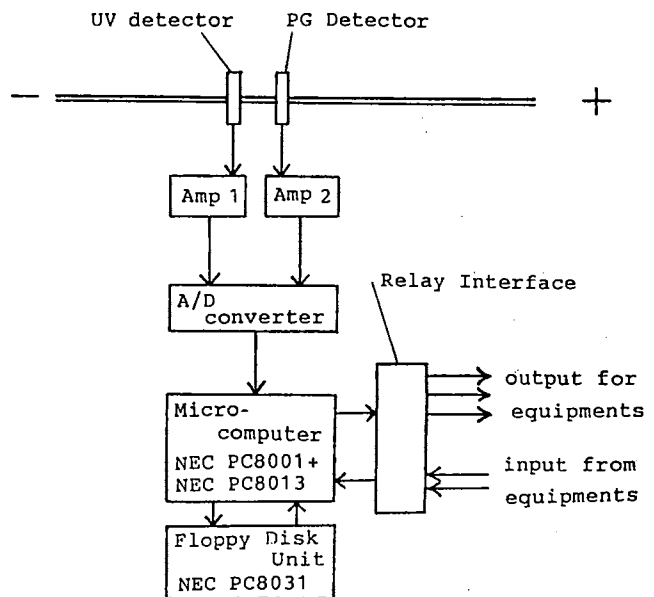


図1
データ収集システムの模式図

図 2

記録計に記録された
紫外吸収と電位勾配
のデータ

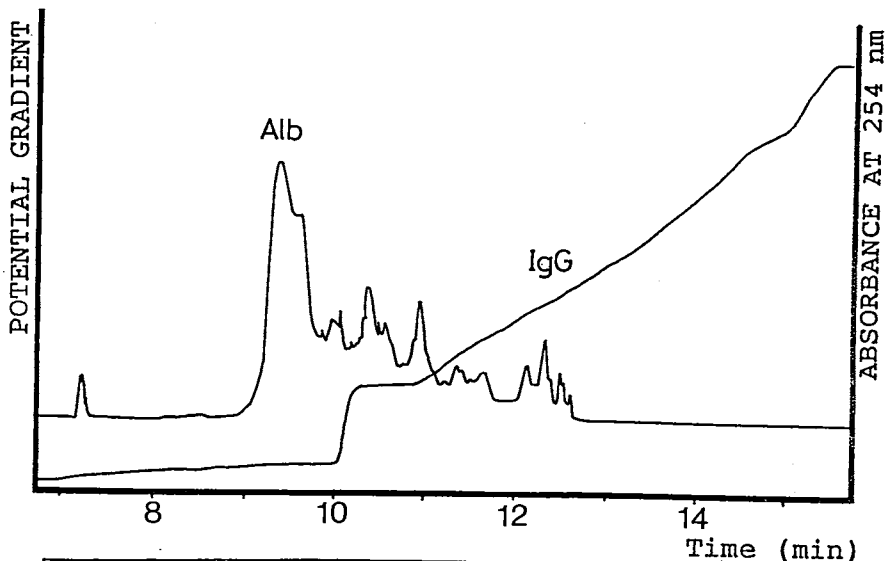


図 3

紫外吸収検出と電位
勾配検出の時間のず
れを補正したグラフ

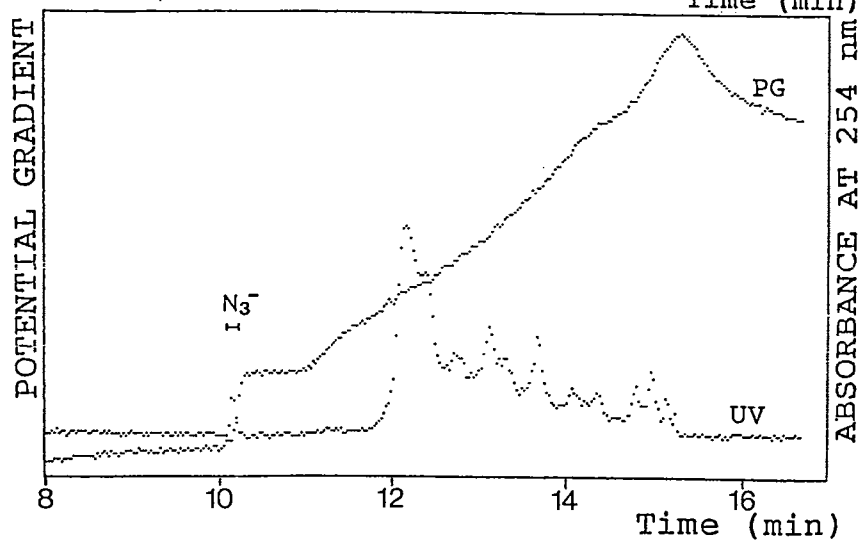
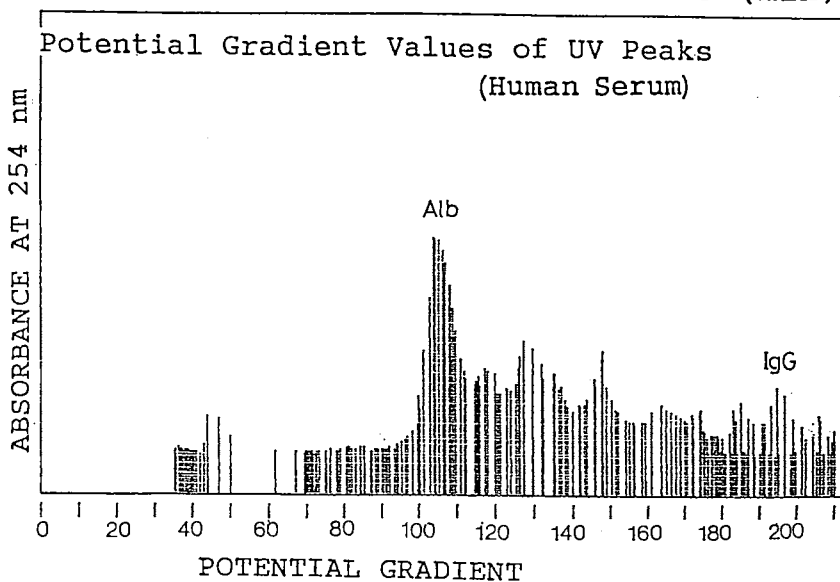


図 4

横軸に電位勾配、縦
軸に紫外吸収をとっ
たグラフ



特 キヤロリ-γ-電氣泳動法 による電氣泳動の試

(名工大・工) 津田 秀雄

等速電氣泳動法は 0.5mm 内外の細管をカラムとして用い、粘性の小工媒体中 (自由溶液) で 10~20 kV の高電圧で迅速分離を行ない、非常に有効な方法である。等速電氣泳動法は媒体を狭い空間に充填し、試料成分の界面を鋭くし、移動度と試料濃度の双方に關係して分離を進行する。試料成分の濃縮が主の特長である。又電氣泳動装置の中で唯一の完成した機械的分析装置である。

支持媒体を自由溶液とした電氣泳動として 71-70-電氣泳動の試 (1)。自由溶液での γ-電氣泳動法は Hjerten (2) が 3mm の中空ガラス管で試行している。熱による対流を防ぐためガラス管自体を回転させた。その装置で又カラム、全長 1.7m、9×10⁷ 等を分析している。

Everaerts (3) は 1979 年にほぼ同等電氣泳動に用いる溶液組成で、11-7-1×7-9-3+比溶液の試行のみを用い、γ-電氣泳動を行なった。0.2mm × 20cm のガラス管で行ない、理論段高として 10⁴ μm の非常に小さい値を得た。0.2mm での熱による対流の問題に悩まされた。

Jorgenson (4) は キヤロリ-γ-電氣泳動の試料移動に積極的に浸透流を利用した。浸透流の利用により正負のイオンを同一電極側に溶出させた。0.075mm × 100cm の細いガラス管を用いて 30 kV を印加し理論段高 25 μm (理論段数として 40 段) を得ている。

津田 (5) は 10×10⁷ 管、溶融石英管 (2×2×11 カマエ-7)、ホリ、70 kV の管 (FER) の材質に對して浸透流の測定を行ない、電氣泳動と浸透流の直線關係を求めた。浸透流と移動度の比を逆方向の溶出側に示した。この方法を水素酸、シリカ管 (5)、装置中の又カラムの測定

寺野 (9) はガラス媒体中に SDS を存在させ、浸透流と SDS とを逆方向に合わせ、分離したい試料をミセルに吸着して不動態 (吸着平衡) の電氣的に移動させることにし、72-1-1 種類の分離を用いた。この方法を界面電氣泳動として、71-7-1 と名づけている。この方法によりカラムの分離 (10) 等を行なった。本田 (11) は キヤロリ-γ-電氣泳動法を用いて、ガラス管中の藥物の定量を行ない、ガラス媒体に有機溶媒を加えてその分離に効果的な分離に成功した。

Reference (1) K. Hamada, J. Chromatogr., 159 (1978) 183-191. (2) Hjerten, S., Chromatogr. Rev., 9 (1967) 122. (3) Mikkers, F.E.B., Everaerts, F.M., Verheggen, Th.K.M., J. Chromatogr., 1979, 169, 11-22. (4) Jorgenson, S.W., Suda, K.D., Anal. Chem., 1981, 53, 1298-1302. (5) Tsuda, T.; Nomura, K.; Nakagawa, G., J. Chromatogr., 264 (1983) 385-392.

装置関連

(A) 注入法

電気浸透流
移動度による注入

Jorgensen

落差法

ロータリ型インジェクター
時間差ロータリバルブ

(TSUDA, MIZUNO, AKIYAMA)

(KUZU, INOUE, MURAMOTO, HANAOH)

注入量 / カラム内体積
注入量と HETP

(B) 浸透流

カラム口径
カラム内壁の表面電荷
(正, 負, 電荷密度)

カラム媒体
(粒性, 歪電定数)

塩の濃度 TSUDA, HONDA

ゼータポテンシャル

電気二重層の厚さ

フロープロファイル (栓流 + 層流)

Pretorius, TSUDA, JORGENSEN
GULOCHON

(B) カラム

ヒューズトシリカフェーズ
パイレックスガラスキャピラリー管
ソーダ
テフロン管
ポリテトラフルオロエチレン管 (FEP)

TSUDA

(E) 検出器

紫外
蛍光 レーザー, キセノン

電位向配検出器

Tsuda

伝導度型検出器

Zave

ポストカラム反応 - 蛍光検出
TSUDA

内壁への化学結合理固着膜の生成 Jorgensen
添加物による内壁表面の荷電の調節 TSUDA, TERABE
(SDS, セルトリキチンモノエーテル等)

添加物による吸着を防ぐ
(エチレンジアミン, TSUDA)

強アルカリ溶液の使用による吸着防止

Sauer, McGanill

電気化学検出器

EWING

質量分析計

Oliveros

(F) 分離対象

カルボン酸 Everaerts
HONDA
Zave
アミノ酸 (D, L) 無機イオン
TSUDA
スルホン酸 TSUDA 陰イオン
(SO₄ etc.)
Tanaka

ポリジメチル塩 TSUDA

ヌクレオチド TSUDA

ナリイヌクレオチド Terabe
Karger

アミノ酸塩 Jorgensen

カテコールアミン Ewing
Sauer, McGanill

タンパク質

ケイ皮酸誘導体 Honda

塩素化フェニール Terabe

クレーニール Terabe

カルボン酸同位体分離 Tanaka
Terabe

(C) カラム媒体

自由溶液

ミセル存在した溶液

Terabe

金属イオンテトラヘキシルアンモニウム塩の添加

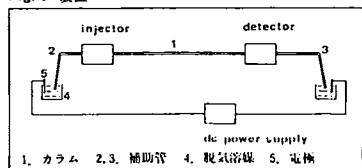
Jorgensen

TERABE
アクリルアミドゲル, アガロース

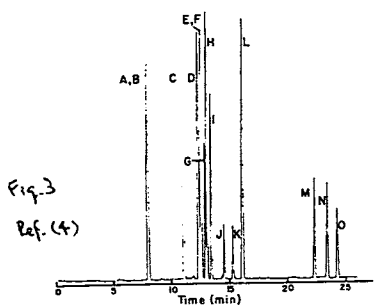
Hjerten, TERABE

カラム-電気泳動装置

Fig. 1 装置



1. カラム 2,3. 補助管 4. 脱気溶液 5. 試液



Zone electrophoretic separation of dansyl amino acids: A = unknown impurity, B = ϵ -labeled lysine, C = di-labeled lysine, D = asparagine, E = isoleucine, F = methionine, G = serine, H = alanine, I = glycine, J and K = unknown impurities, L = di-labeled cysteine, M = glutamic acid, N = aspartic acid, O = cysteic acid. The concentration of each derivative is approximately 5×10^{-4} M, dissolved in operating buffer.

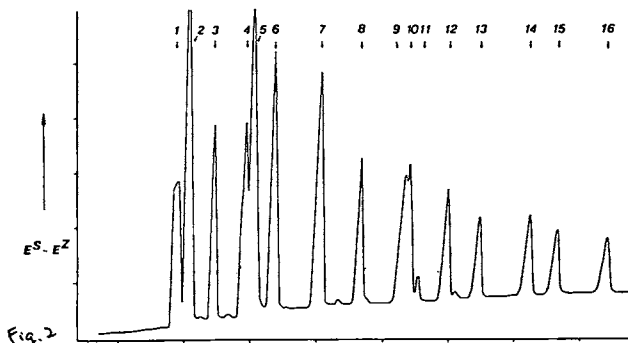
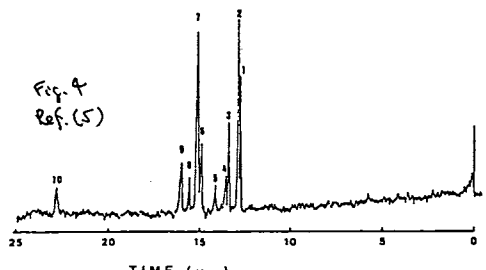
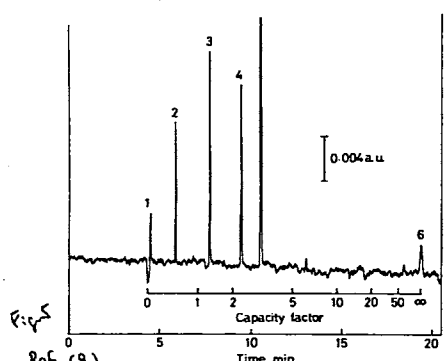


Fig. 2 Ref. (3)

Zone electrophoretic separation of a 16-component sample. 1 = Chloride; 2 = sulphate; 3 = chlorate; 4 = malonate; 5 = chromate; 6 = pyrazole-3,5-dicarboxylate; 7 = adipate; 8 = acetate; 9 = propionate; 10 = β -chloropropionate; 11 = unidentified; 12 = benzoate; 13 = naphthalene-2-monosulphate; 14 = glutamate; 15 = enanthate; 16 = benzyl-DL-aspartate. Sample load: $17.5 \cdot 10^{-11}$ mole for each constituent. $E^1 - E^2$ = difference in electrical field strength between the carrier electrolyte and the sample zone. t (min) = time of analysis.



Separation of pyridinium salts. Pyrex glass capillary: 85 μ m I.D. \times 105 cm, of which 90 cm was used as column. Solvent: 0.05 M Na_2HPO_4 . Constant-current mode: 80 μ A (ca. 14.2 kV). Each solute shows $1.5 \cdot 10^3 \cdot 2 \cdot 10^3$ theoretical plates. Solutes: 1 = N-methyl-4-methyl-; 2 = N-methyl-3-methyl- or N-methyl-2-methyl-; 3 = N-methyl-2,4-dimethyl- or N-methyl-2,3-dimethyl-pyridinium salt; 4 = N-methyl-2-aminopyridinium salt; 5 = N-benzyl-; 6 = N-benzyl-4-cyano-; 7 = N-2,4-dinitrophenylpyridinium salt; 8 = unknown; 9 = 1,2,3-trimethyl-3,5-bis(ethoxycarboxyl)pyridinium salt; 10 = pyridine.



Chromatogram by electrokinetic separation indicating the total range of elution: (1) methanol, (2) phenol, (3) *p*-cresol, (4) 2,6-xylenol, (5) *p*-ethylphenol, (6) Sudan III; total tube length, 650 mm; tube length from the injection end to the detector cell, 500 mm; total applied voltage, ca. 20 kV; current, 33 μ A; detection wavelength, 220 nm. Other conditions are the same as in Figure 1.

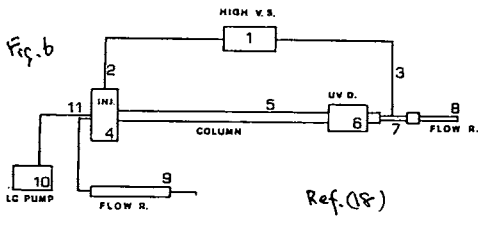
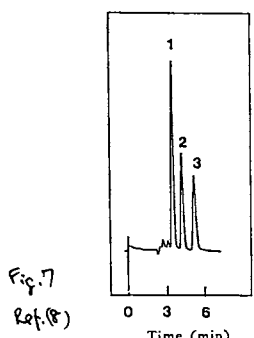


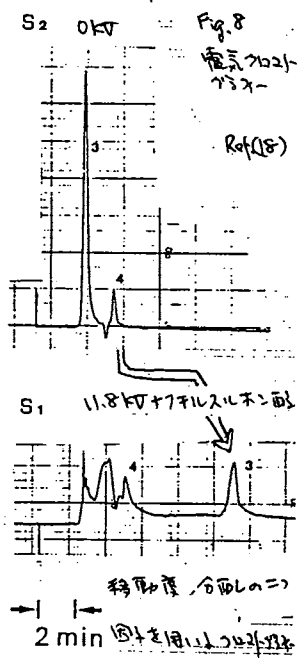
Fig. 6 Ref. (18)

電気カラム分離装置

電気泳動法によるカラム分離装置



Separation of aromatic compounds by using electroosmotic flow in liquid chromatography. Column: 0.4 mm i.d. and 9.1 cm in length, packed with 3 μ m ODS (Develosil), Effluent: 100% methanol, Detector: UV 254 nm, sens 16, Applied voltage: 12.4 kV, Current: 2 μ A, Solute: (1) Methyl benzoate, (2) Anthracene and (3) Pyrene (k' 1.2, N 2600)



21 界面動電クロマトグラフィー用微量試料注入法

横河電機 ○井上 嘉則、久世 秀一、村本 節夫、花岡 護

Studies on injection method for electrokinetic chromatography
Yokogawa Electric Corporation

Yoshinori INOUE, Shuichi KUZE, Setsuo MURAMOTO and Yuzuru HANAOKA

1. 緒言

界面動電現象を利用した、微小口径キャピラリーカラムを用いる分析法については、Jorgenson¹⁾、津田²⁾、寺部³⁾らによって検討されている。また、寺部らによって確立されたミセル可溶化界面動電クロマトグラフィーを用いることにより、疎水性の非イオン性物質にまで適応させることが可能となった。

この分析法における最も大きな問題点は、数nl以下の任意の微量の試料を再現性良くキャピラリーに注入することである。従来より行われている注入法としては、落差を利用する方法、電気浸透流を利用する方法、マイクロバルブを用いる方法などがあるが、試料の組成を変えずに、再現性良く極微量を注入する方法は確立されていない。

演者らは、種々の注入法について検討を行った結果、落差を用いる方法とスプリットを用いる方法で良好な注入再現性が得られた。更に、これら2つの注入法の特長を生かした特殊なマイクロバルブを開発し、再現性が良い可変容量の極微量注入法を確立した。

今回は、演者らが検討を行った種々の注入法と新しい極微量試料注入法について、注入の再現性を中心に報告を行う。

2. 実験

次ページの図に3つの注入法と装置の概略図を示した。全ての装置とも試料注入器、キャピラリーカラム、検出器及び緩衝液タンクは恒温槽の中に設置してあり、試料注入器は恒温槽の外から手動あるいは自動で操作できるようになっている。試料は、A法では恒温槽内の試料注入器のターンテーブル上に設置されるが、BおよびC法では恒温槽外よりマイクロシリンジで試料注入器にロードできるようになっている。試料注入量は3法共、落差あるいは水位差を一定とし、A法はディップ時間、B法は試料ループ容量、C法はロータが切り替わっている時間を調節することで決定される。

試料注入器の評価は、寺部らにより確立されたミセル可溶化手法を用いて行った。キャピラリーカラムには、メチルシリコン被覆のDB-1 (J&W社製、内径50 μ m、有効長500mm)を、緩衝液には、0.1M SDSを含むリン酸ホウ酸緩衝液を用いた。試料には、フェノール類を用い、紫外吸収検出器(205nm)で検出を行った。

3. 評価結果

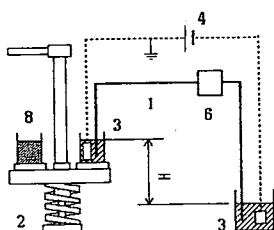
表に、フェノールを試料として求めた再現性と、各注入法の特徴をまとめた。

各注入法ともピーク面積値で1.5%以下と非常に良好な再現性を示したが、A法では手動注入法であるため保持時間の再現性が若干悪くなっている。

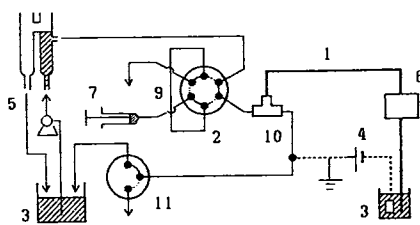
総合的には、スプリット法と可変容量バルブを用いる方法が良いと思われるが、スプリット法は1分析に使用する試料量が多い点が問題である。ディップ法は本田ら⁴⁾により報告されているように自動化することで改善が図れるが、装置が大きくなり、また、恒温槽内に設置した時の試料の変性が問題である。以上の点から、現時点では可変容量バルブを用いた注入法が最良と考えている。

4. おわりに

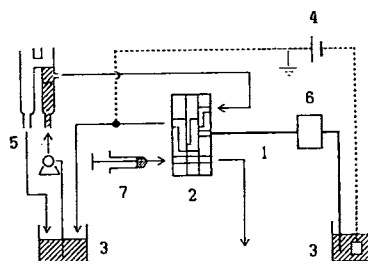
新たに開発した微量可変容量試料注入バルブを用いることで、n1オーダーの極微量の試料を再現性良く注入することを可能にした。今後、実試料での評価を行い更に改良を行くつもりである。



A. ディップによる注入法



B. スプリットによる注入法



C. 可変容量バルブによる注入法

各部の名称

1. キャピラリー
2. 試料注入器
3. 緩衝液タンク
4. 高電圧電源
5. 定水位作成装置
6. 検出器
7. マイクロシリンジ
8. 試料瓶
9. 試料ループ
10. スプリット部
11. リサイクルバルブ

キャピラリー電気泳動用試料注入法

表 注入の再現性と各注入法の特徴

注入法	再現性 CV%(n=10)		試料量 (μ l)	試料の 変性	操作性	自動化
	保持時間	面積				
A	0.21	1.37	>100	?	煩雑	難しい
B	0.11	1.52	50-500	なし	容易	容易
C	0.10	1.28	1-5	なし	容易	容易

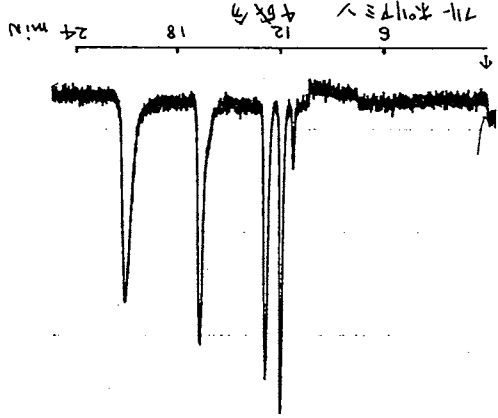
1) Jorgenson, J.W. et al. Anal. Chem. 53(1981)1298-1302

2) Tsuda, T. et al. J. Chromatogr. 264(1983)385-392

3) Terabe, S. et al. Anal. Chem. 56(1984)113-116

4) 本田 進ほか 第6回細管・等速電気泳動分析シンポジウム講演要旨集 P.25-26

50µm I.D. x 1m
320µm I.D. x 25cm
RF-535



711-ホリミソ 4成分
5成分
12成分
18成分
24成分
711-ホリミソ標準体にて比較
濃度比の2分回注入
濃度比 31 mmol/L

電圧 40KV (711-ホリミソ 5分回 SKV)
4成分 ホリミソ-NAOH 5mm (pH 9.0)
EG 5% SDS 2%

分離条件

分析は、211a。ニホ標準条件下に、5 mmol/L ~ 1 mmol/L 抽出される。
検出器を7-1入側にし、711-ホリミソ部分は20KVに設定し、711-ホリミソ標準体との
内径 0.5mm / 外径 1mm, 1mm / 2mm, 2mm / 3mm の3つの管を2
管をくくり、これを標準体とのホリミソに回流し、20セカンドの管中に溶解
標準を注入して抽出。

溶解標準を用いた場合、711-ホリミソ、711-ホリミソの吸着が強く主成分として
711-ホリミソ標準体とホリミソ (SDS) を加えて抽出し、711-ホリミソ-711-ホリミソの SDS の濃
度をコントロール形成したものを抽出して分析した。

23 Separation and Detection of < 50 kilobase DNA by Capillary Electrophoresis
Robert Brownlee and Thomas Kasper

Microphoretic Systems, Inc.
750 Pastoria Ave.
Sunnyvale, CA 94000

Address until Nov. 25, 1987
RGB Investment Corp.
485 E. Middlefield Rd.
Mountain View, CA 94043
(415) 961-0105

Abstract:

Since the first paper by Jorgensen, et al (1) in 1981, interest in electrophoresis in open fused silica capillary tubing has increased. Today over 30 scientists are exploring and extending the application of this powerful new separation method. However, most of these scientists have been trained as analytical chemists and the sample types explored by capillary electrophoresis (CE) have generally been small molecules, the usual subject of analytical chemists. The potential application and commercial market potential for CE is in modern biochemistry and molecular biology. In these fields, various gel electrophoresis techniques are the main analytical tool, with proteins and DNA/RNA being the principal samples of interest. With the notable exception of some protein work (2) and impressive data for small oligonucleotides (3), the use of CE for biological samples has been scarce. No results have been published to date for large or restricted double stranded DNA .

We have been exploring the separation and detection of viral DNA by electrophoresis in unmodified 50 to 73 micron ID fused silica capillary tubing 50 cm in length. Using self made capillary and optical component holders to measure "on column", the detection methods used were: UV absorption with a modified Kratos 757 Spectrophotometer and a pulsed Xenon flash fluorescence with a modified Hewlett-Packard 1046A detector. From the standpoint of limits of detection and elimination of artifacts, the fluorescence detection was superior to the UV absorption. Using step changes of fluorescein concentration, the fluorescence detector achieved 3×10^{-7} molar sensitivity at signal/ noise = 3.

Using the fluorescence detector and step change sample solutions, two different fluorescent "nuclear stains" were used, EtBr and Hoechst 33258, which are well known in gel electrophoresis and are specific for DNA . Both stain the DNA and can be simply added to the running buffer solution. With EtBr, (ex 250 nm, em 585 nm) 30 ug/ml labeled Herring sperm DNA could be detected, with signal/ noise = 3, and with Hoechst 33258, (ex 232 nm, em 458 nm), the same sensitivity was obtained.

CE separations have been successful (?) for a number of viral and phage vectors used in molecular biology: lambda, M13, pBR322, pUC18, pUC19, and SV40. These range in size from 2,600 to 48,000 base pairs in length. In addition restriction enzyme fragments of phage Lambda have also been analyzed by CE , using several buffers derived from the standard gel electrophoresis buffer TBE. We qualify our successful claim with a question mark because the interpretation of the electropherograms is often unclear. We are sure that 1) all the sample is electrophoresed and detected, 2) only DNA is detected, and 3) that there are more peaks than expected.

(1) Jorgenson, J. and Lukacs, K. D. Anal. Chem. 1981, 53 , 1298-1302

(2) Lauer, H. and McManigill, D. Anal. Chem. 1986, 58 , 166-170

(3) Cohen, A. S. et al. Anal. Chem. 1987, 59 , 1021-1027

24 毛細管ゾーン電気泳動による EDTA類似キレート試薬の分離

(京大・工) ○八島利幸・寺部 茂

1. 緒言

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; エチレンジアミン四酢酸) や、その類似体である DTPA、CyDTA、NTA などは、多くの金属と安定な金属キレートをつくる。この性質からこれらは、分析化学の分野でキレート滴定試薬やマスキング剤として、また他の医学、薬学、農学や工業の分野でも安定剤やマスキング剤その他として非常に幅広く使用されている。しかしこの EDTA 類似体が複数種含まれる場合にこれらを相互に分離することは現在 HPLC では困難である。そこで今回は毛細管ゾーン電気泳動法を用いてこれらの相互分離を試みた。

2. 実験

毛細管には内径 50 μm、全長 80 cm、検出器までの有効長 60 cm のフューズドシリカ管を用いた。また、電気泳動溶液には 50 mM のリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用い、電気浸透流を抑えるために 0.1% ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を加えた。試料は Fig. 1 に示す 12 種の EDTA 類似体であるが、このままでは検出が困難であるので、これらの 10 mg/mL 水溶液を、鉄(III)の 100 mM クエン酸塩緩衝液溶液 (pH 5.0) で 5 倍に希釈して鉄(III)と錯体を生成させたものを注入試料とし、210 nm の紫外吸収を測定して検出を行った。電圧は 20 kV 定電圧で行い、その他の装置、方法はすでに報告したもの(1)と同じである。

3. 結果・考察

用いた試料の構造と略語を Fig. 1 に示す。これらは酢酸系 9 種、スルホン酸系 1 種、リン酸系 2 種に分類される 2 ~ 6 塩基酸であり、大部分は鉄(III)と錯体を生成しても負の電荷をもつので、電気泳動を行うと試料は負極から正極へと移動する。また、今回は鉄(III)と錯体を生成させる際に過剰の鉄(III)が水酸化鉄の沈澱を生じないようにクエン酸塩の緩衝液を用いたが、クエン酸と鉄(III)との錯体も同方向へ泳動し、紫外吸収をもつので試料ピークと同時にこのクエン酸-鉄(III)錯体のピークも観測された。

酢酸系 7 種の分離例を Fig. 2 に示す。最初の大きい 2 つのピークはクエン酸-鉄(III)錯体のピークである。

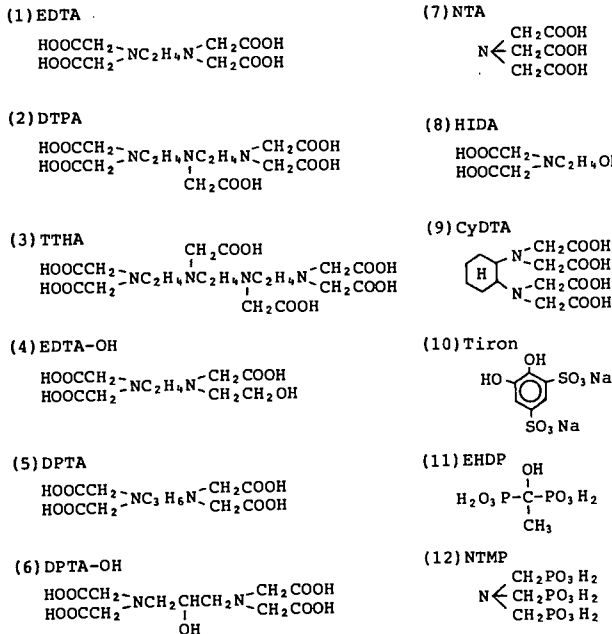


Fig.1 EDTA analogs

DPTAとHIDAは検出されなかった。これは、この2種の試料では鉄(Ⅲ)とのキレート生成定数Kが小さく(温度20℃、イオン強度 $\mu = 0.1$ での $\log K$ は、EDTAで25.1、DTPAで28.6、HIDAで11.6)、クエン酸と錯体を生成するほうが有利であったためと思われる。同様の理由でリン酸系の試料についてもピークは検出されなかった。また、NTAが他のピークよりもブロードになっているが、これも、NTAのキレート生成定数が他の試料よりも小さい($\log K = 15.9$)ことが一因と思われる。もう1つ、CyDTAのピークもブロードになっているが(EDTA-OHのピークの理論段数は約14万段、CyDTAのピークは約2.2万段)、CyDTAのキレート生成定数はEDTAのそれよりも大きく($\log K = 28.1$)、前記の理由では説明できない。この理由はよくわからないが、CyDTAにおいては生成定数は大きいものの、反応速度が遅いことがわかっており、それが関係していることが考えられる。

さらに溶出の順序をみると、(1)~(4)の試料で(1)は4塩基酸、(2)は5塩基酸、(3)は6塩基酸、(4)は3塩基酸であり、構造はほとんど同じなのでカルボキシル基の多い順に溶出することが期待され、実際にはDTPAとTTHAは分離していないものの、期待された順序になっている。

今回は試料をあらかじめ鉄(Ⅲ)と錯体を生成させておき、それを注入するという方法をとったが、できれば前処理なしでそのまま注入する方が望ましい。そこで電気泳動溶液を、鉄(Ⅲ)を含むクエン酸塩緩衝液として実験を試みたが、前述のようにその溶液自体が紫外吸収をもつので試料ピークが負になってしまい、あまりうまくいかなかった。

また、Fig. 2では(6)と(7)のピークがクエン酸の大きなピークに重なっており望ましくない。そこで今後の改良点として1つには鉄(Ⅲ)を含む緩衝液の濃度を低くすること、またもう1つには今回検出されなかった試料のために、クエン酸以外の、もっと鉄(Ⅲ)とのキレート生成定数が小さいものを緩衝液として使用することが考えられる。

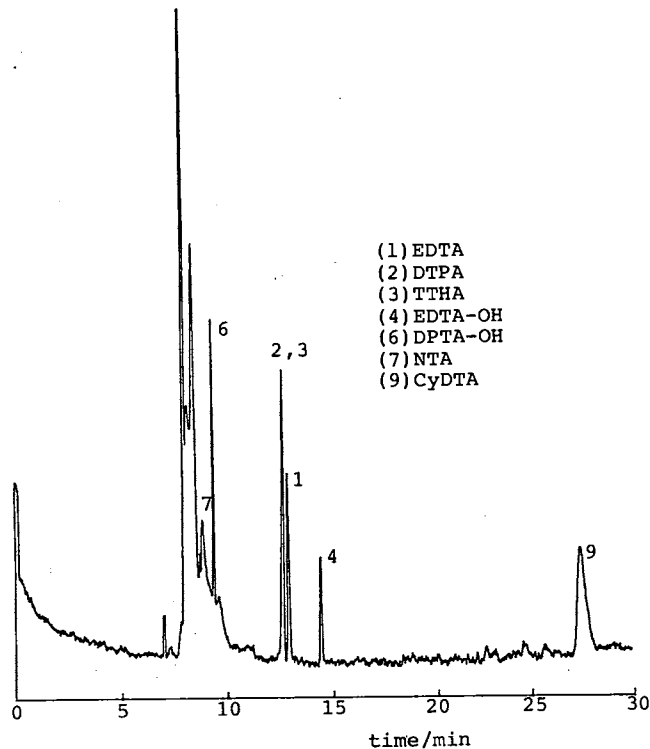


Fig.2 Separation of 7 analogs of EDTA

(1) S. Terabe et al.; Anal. Chem., 56, 111 (1984)

25 キャピラリーゾーン電気泳動における有機溶媒の効果

(鐘紡薬研) 藤原 茂
(近畿大薬) 本田 進

1. はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動はキャピラリー等速電気泳動と異なり、電場におかれたキャピラリーとキャピラリー内壁成分の相互作用により発生する電気浸透流をdriving forceとして積極的に利用する方法であるが、この電気浸透流が検流であるため分離された成分の拡散が最小限に抑えられ、高いカラム効率が得られると同時に優れた分離が期待される。この方法は1979年にMikkersら(1)によって始められ、その後種々のイオン性物質の分離に応用され、分離分析法としての優秀性が次第に認識されるようになってきたが、これまでのところキャリアはもっぱら水溶液に限られていた。しかし、キャピラリーゾーン電気泳動においては内径の小さい毛細管を使用するため、試料成分に対して十分な検出感度を得るためには 10^{-3} - 10^{-2} mol/Lという高い試料濃度が要求され、イオン性有機化合物中にはこのような高い濃度で試料を導入した場合水溶液キャリアでは正常に分析が行われないことがある。そこでわれわれはキャリアに有機溶媒を添加した場合に、この有機溶媒の添加が試料成分の分離にどのような効果を及ぼすかについて検討した(2)。

2. 実験方法

装置：島津IP-1B型細管式等速電気泳動装置用の高圧電源装置を用いて印加し、島津SPD-2A型紫外線検出器を改造したのを用い 254 nmにおいてオンカラム検出した。キャピラリー：フューズドシリカ管 (SGE 製, 250 μ m i.d., 80 cm)。試料導入：落差法によった (落差, 5 cm; 導入時間, 5 sec)

3. 種々の溶媒に対する保持時間およびピーク理論段数の比較

TABLE I は o-aminobenzoic acid について種々の有機溶媒を含むキャリアで測定した場合の保持時間と理論段数を比較したものであるが、概してdielectric constantの大きな溶媒ほど小さい保持時間を与え、ピークの理論段数も大きかった。この結果に基づき、保持時間の小さいacetonitrile と methanol に対象を絞り、種々の検討を加えた。

4. 電気浸透流に対する有機溶媒添加効果

有機溶媒濃度を変えて電気浸透係数 μ_{eo} の変化を調べたところ、 μ_{eo} 値は acetonitrile では濃度とともに増加したが、methanolでは減少傾向を示した (Fig. 1)。

5. モノ置換benzoic acidの電気泳動移動度 μ_{ep} に対する有機溶媒添加効果

pH 7.0 において aminobenzoic acid, hydroxybenzoic acid および methylbenzoic acid について各々の o-, m- および p-異性体の移動度

μ_{ep} を種々の濃度の有機溶媒を添加したキャリア間で比較すると TABLE II のようになり、概して methanol 添加では μ_{ep} の変化は見られなかったが、acetonitrile の添加では濃度の上昇とともに μ_{ep} が増加し、特に o-hydroxybenzoic acid では著しい増加が見られた。この μ_{ep} 値の増加は、水分子と結合して移動するこれらの重い carboxylate が溶媒添加によって結合水の1部を失い、軽い

TABLE I Changes of retention time and column efficiency by addition of organic solvent

Organic solvent	Retention time (min)	Number of theoretical plates
Acetonitrile	26.0	41,000
Methanol	32.0	39,000
Tetrahydrofuran	37.2	31,000
Ethanol	37.4	21,000
2-Propanol	38.4	18,000
p-Dioxane	52.0	22,000

Each solvent was added to 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0 to a concentration of 25% (v/v). Applied potential, 100 μ A.

carboxylate になるためと考えられ、この効果により電気泳動効果が増強されるものと推定される。
 o-Hydroxybenzoic acid の μ_{eo} 値が異常増加するのは溶媒添加による分子内水素結合によりこの効果がさらに強められるためと考えられる。

Fig. 2 に aminobenzoic acid と methylbenzoic acid 異性体の分離について溶媒添加の有無を比較する。有機溶媒の添加により分離が大幅に改善されたことが示されている。

このようにキャピラリーゾーン電気泳動において有機溶媒、特に acetonitrile の添加は試料成分の μ_{ep} を増加させ電気泳動効果を強めることによって分離を改善させることが明らかとなった。

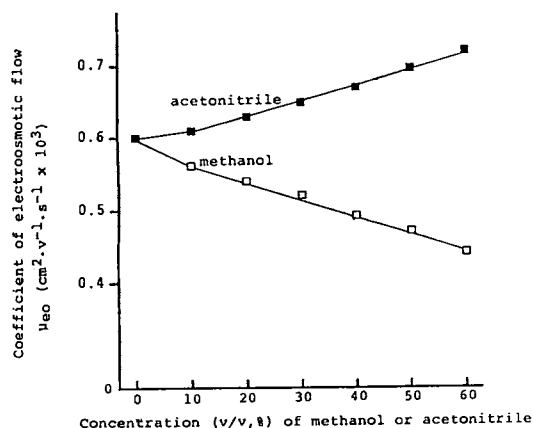


Fig. 1. Effect of the addition of organic solvent on μ_{eo} and column efficiency. Each solvent was added to 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0. Applied potential, 100 μ A.

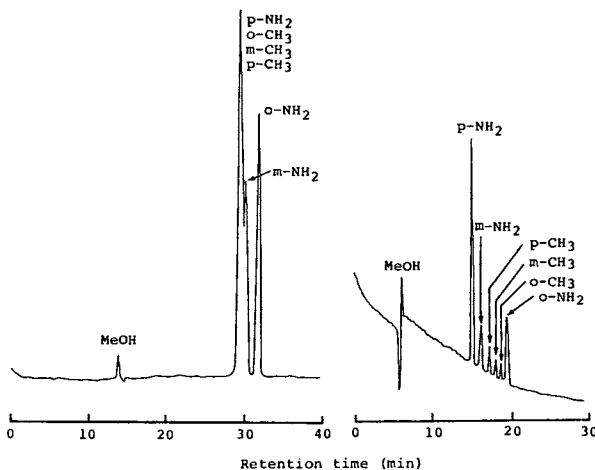


Fig. 2. Separation of isomeric amino- and methylbenzoic acids in 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0 (a) and 0.02 M phosphate buffer, pH 7.0 - acetonitrile (1:1, v/v)(b). Applied potential, 100 μ A.

TABLE II Change of electrophoretic mobility by addition of organic solvent

Compound	Electrophoretic mobility, μ_{ep} ($\times 10^{-3}$, $\text{cm}^2 \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)				
	Aqueous medium	Aqueous methanol		Aqueous acetonitrile	
		25%	50%	25%	50%
Aminobenzoic acid					
ortho isomer	0.36	0.35	0.36	0.39	0.48
meta isomer	0.34	0.33	0.34	0.36	0.43
para isomer	0.34	0.33	0.33	0.35	0.42
Hydroxybenzoic acid					
ortho isomer	0.39	0.38	0.40	0.42	0.53
meta isomer	0.34	0.34	0.34	0.35	0.42
para isomer	0.33	0.33	0.33	0.34	0.40
Methylbenzoic acid					
ortho isomer	0.34	0.34	0.35	0.38	0.47
meta isomer	0.34	0.33	0.34	0.37	0.46
para isomer	0.34	0.33	0.34	0.37	0.45

The experimental conditions were the same as those in Fig. 1.

文献

- (1) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verhaggen, J. Chromatogr., 169, 1, (1979).
- (2) S. Fujiwara and S. Honda, Anal. Chem., 59, 487 (1987).

