

第8回電気泳動シンポジウム (細管・等速電気泳動)

講演要旨集

城西大 小林英三郎

- 主 催 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
共 催 日本化学会, 電気泳動学会, 日本薬学会
日本生化学会, 日本農芸化学会
- 日 時 昭和 63 年 12 月 8 日 (木) 13:00~17:00
昭和 63 年 12 月 9 日 (金) 9:00~16:10
- 会 場 (株)島津製作所研修センター 3F 33号
京都市中京区西ノ京桑原町 1

ELECTROPHORESIS SYMPOSIUM

第8回 電気泳動シンポジウム (細管・等速電気泳動)

講演要旨集

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

第8回 電気泳動シンポジウム (細管・等速電気泳動)

プログラム

第1日目 12月8日(木)

(13:00から) 開 会

- | | | |
|--|--|--|
| 1. 高分子イオンを用いるイオン交換動電クロマトグラフィー | 京大工 | ○伊勢村次秀・寺部 茂 |
| 2. キャピラリーゾーン電気泳動による糖の過ヨウ素酸化分析 | 近畿大薬 | ○本田 進・鈴木健司
掛樋一晃 |
| 3. キャピラリー電気泳動における分子間相互作用の可能性 | 名工大 | ○津田孝雄・小林泰文 |
| 4. 動電クロマトグラフィーによる血漿中薬物の分析 | 京大薬 | ○小田吉哉・中川照真
渋川明正・福田桐子
田中 久 |
| 5. Automation of High Performance Capillary Electrophoresis and Its Application for Neuropeptide | Princeton University
<i>Biochemical</i> | ○N.A.Guzman
L.Hernandez
B.G.Hoebel |
| (15:00から) | | |
| 6. 陰イオン分子のトポロジー指数と移動度の相関について | 山口女子大家政 | ○二五田公俊・有富美代子
大村貴子・井川弘子 |
| 7. PG 微分法による等速電気泳動図の解析 (3) キャリアーアンホライトの分析 | 城西大理 | ○小林英三郎・喜多由華 |
| 8. 等速電気泳動法の分離過程—試料数の増加にともなう分離時間の遅れについて | 広島工大 | ○広川 健・木曾義之 |
| 9. 等速電気泳動法の分離過程—走査型 UV ゾーン検出器の試作 | 広島大工 | ○横田泰朗・広川 健
西山文隆・木曾義之 |
| 10. 核酸の全自動キャピラリー等速電気泳動 | 都立大理 | ○山本秀子・真鍋 敬
奥山典生 |
| 11. 分取用2次元等速電気泳動装置の試作 | 広島大工 | ○前田善治・広川 健
木曾義之 |

懇 親 会

1989年 12月7日(木)

第2日目 12月9日(金)

(9:00から)

- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 12. IP-PIXE 法による YBCO 超伝導体の分析 | 広島大工 | ○池田浩美・広川 健
木村剛二・西山文隆
木曾義之 |
| 13. 細管式等速電気泳動法による鉄(Ⅲ)イオンの分析 | 島津製作所 | ○日根 隆 |
| 14. 等速電気泳動法による合金メッキ皮膜中のリン定量 | 島津製作所・旭化成*
京都市工試** | ○児嶋佳世子・田中哲郎*
篠原長政** |
| 15. 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分離同定 | 共立女子短期大
昭和女子大* | ○津田淑江・福場博保* |
| 16. カテコール誘導体の細管等速電気泳動 | 北大理 | ○金田 隆・田中俊逸
吉田仁志 |

(11:00から)

- | | | |
|--|---------|--------------------------------------|
| 17. インタコフォレシスによる難水溶性試料中の微量陰イオンの分析 | 島津製作所 | ○八木孝夫 |
| 18. DNA-インタカレータ複合体の電気泳動 | 九大工 | ○竹中繁織・高木 誠 |
| 19. 細管式等速電気泳動法によるペニシリン類とカナマイシンとの反応生成物の推定 | 九大医付属病院 | 中島和博・○藤下 修
平川雅章・樋口 駿
大坪健司・青山俊信 |
| 20. 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用(第13報)種々の金属イオンを含むリーディング液を用いる茵陳蒿煎液の分析 | 徳島文理大薬 | ○佐藤英生・赤田良信 |

(13:30から)

特別講演

タンパク質の細管電気泳動—全自動化とデータ評価

都立大理 真鍋 敬

- | | | |
|-------------------------|------|------------|
| 21. 細管式等速電気泳動法によるヒト尿の分析 | 新潟大医 | ○山内春夫・小野政孝 |
|-------------------------|------|------------|

(15:10から)

- | | | |
|---|----------------|----------------------------|
| 22. プロリダーゼ欠損症患者及び正常人の赤血球中のプロリダーゼとプロリンイミノペプチターゼ活性の測定 | 高知医科大化学 | 揚田富子・溝淵詔子
大庭千佐・○児玉裕敬 |
| 23. 植物種子抽出液の沈降素活性と細管式等速電気泳動による植物種子の種属識別について | 専修大法 | 吉田治弘 |
| 24. ヘパリノイド活性を示す緑藻硫酸多糖の細管式等速電気泳動による検索 | 杏林大保健
埼玉大理* | ○平岡 厚・上原 勉*
常見謙史*・前田昌徹* |

閉 会

8TH SYMPOSIUM ON ELECTROPHORESIS

December 8–9, KYOTO JAPAN

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

Program

Dec. 8 Afternoon (13:00)

- | | | |
|---|--|--|
| 1) Ion exchange electrokinetic chromatography with polymer ions | T. Isemura and S. Terabe | Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University |
| 2) Periodate Oxidation Analysis of Carbohydrates by Capillary Zone electrophoresis | S. Honda, K. Suzuki and K. Takehi | Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University |
| 3) Possibility of hydrophobic inter-molecular interactions in capillary electrophoresis | T. Tsuda and Y. Kobayashi | Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology |
| 4) Electrokinetic chromatography for the drug analysis in human plasma | T. Nakagawa, Y. Oda, A. Shibukawa, H. Fukuda and H. Tanaka | Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University |
| 5) Automation of High Performance Capillary Electrophoresis and its application for Neuropeptide | N.A. Guzman, L. Hernandez and B.G. Hoebel | Princeton University |
| 6) Relations between the topological indices and mobilities, R_E values of anions | K. Nigota, M. Aritomi, T. Oomura and H. Igawa | Faculty of Home Economics, Yamaguchi Women's University |
| 7) Analysis of isotachopherogram by PG differentiation (3) Analysis of carrier ampholites | H. Kobayashi and Y. Kita | Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University |
| 8) Separation process of isotachophoresis – Retardation of the resolution time with increase of the number of sample components | T. Hirokawa and Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University |
| 9) Separation process of isotachophoresis – A scanning UV photometric zone detector | Y. Yokota, T. Hirokawa, F. Nishiyama and Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University |
| 10) Fully automated capillary isotachophoresis of Nucleic acids | H. Yamamoto, T. Manabe and T. Okuyama | Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University |
| 11) Preparative Two-dimensional isotachopheretic analyzer | Y. Maeda, T. Hirokawa and Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University |

Dec. 9 Morning (9:00)

- | | | |
|---|--|---|
| 12) Analysis of YBCO superconductor by IP-PIXE method | H. Ikeda, T. Hirokawa, G. Kimura, F. Nishiyama and Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University |
| 13) Determination of Fe (III) ion by capillary isotachophoresis | T. Hine | Tokyo Analytical Applications Laboratory, SHIMADZU Corporation |

- | | | | |
|-----|--|---|--|
| 14) | Analysis for phosphorus in alloy deposit films by isotachopheresis | K. Kojima, T. Tanaka* and N. Shinohara** | Kyoto Analytical Applications Laboratory, SHIMADZU Corporation, Ion Exchange Membrane Division, Asahi Chemical Industry Co. Ltd.*, The Kyoto Municipal Research Institute for Industry** |
| 15) | Separation and identification on antocyanins in foodstuffs by isotachopheresis | T. Tsuda and H. Fukuda* | Kyoritu Women's College, Shouwa Women's University* |
| 16) | Isotachopheresis for catechol derivatives | T. Kaneta, S. Tanaka and H. Yoshida | Faculty of Science, Hokkaido University |
| 17) | Determination of trace anions in water insoluble sample by isotachopheresis | T. Yagi | Tokyo Analytical Applications Laboratory, SHIMADZU Corporation |
| 18) | Electrophoresis of the DNA-intercalator complexes | S. Takenaka and M. Takagi | Department of Organic Synthesis, Faculty of Engineering, Kyushu University |
| 19) | Estimation of the reaction products between penicillins and kanamycin by isotachopheresis | K. Nakashima, O. Fujishita, M. Hirakawa, S. Higuchi, K. Ohtsubo and T. Aoyama | Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Kyushu University |
| 20) | Application of capillary-type isotachopheresis to pharmaceutical analysis (XIII) Determination of ionic components in "INCHIN-KHO" (<i>Artemisia capillaris</i>) decoction make use of leading electrolyte containing various metal ions | H. Satho and Y. Akada | Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University |

Dec. 9 Afternoon (13:30)

SPECIAL LECTURE

- | | | | |
|-----|---|---|--|
| | Capillary electrophoresis of proteins – Full automation and data evaluation | T. Manabe | Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University |
| 21) | Analysis of human urine by capillary-type isotachopheresis | H. Yamanouchi, M. Ono | Department of Legal medicine, Niigata University School of Medicine |
| 22) | Determination of activities of prolidase and prolineiminopeptidase in erythrocytes from patients with prolidase deficiency and normal human | T. Ageta, N. Mizobuchi, C. Oba and H. Kodama | Department of Chemistry, Kochi Medical School |
| 23) | Precipitin activity of plant seed extract and identification of plant seed species detected by capillary isotachopheresis | H. Yoshida | Laboratory of Physiology, Senshu University |
| 24) | Capillary-isotachophoretic analysis of heparinoid active sulfated polysaccharides in chlorophyta | A. Hiraoka, T. Uehara*, J. Tsunemi, M. Maeda* | Kyorin University School of Health Sciences
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Saitama University* |

1 高分子イオンを用いるイオン交換 動電クロマトグラフィー

(京大・工)

○伊勢村 次秀 寺部 茂

1. はじめに

動電クロマトグラフィーとは、キャピラリー電気泳動の手法を利用し、クロマトグラフィーの原理に基づいた分離を行なう方法で、演者らが electrokinetic chromatography に対する日本語として命名したものである。つまり、電荷をもつ分子または分子集合体を、クロマトグラフィーの固定相に相当するキャリアーとして緩衝液に加えて、試料とキャリアーとの相互作用を利用して分離を行なうものである。本研究ではキャリアーとして高分子イオンを用い、試料イオンとのイオン対生成を分配機構とする方法について検討した(1,2)。演者らはこれまでに高分子イオンとしてポリブレンを用いたが、今回、ポリ塩化ジアリルジメチルアンモニウム(DDAC)を用いても同様の結果が得られたので比較を兼ねて報告する。

2. 実験

図1にDDACおよびポリブレンの構造を示す。装置は以前に報告したもの(1,2)と同様で、分離用毛细管には内径0.05 mm、長さ750 mmのフューズドシリカ管を用い、その注入端から500 mmのところ、オンカラム法により210 nmでの紫外吸収を測定し、検出を行った。電気泳動溶液には、50 mMリン酸塩緩衝液(pH 7.0)、このリン酸塩緩衝液にDDACを0.01, 0.03, 0.1, 0.3%溶解したもの、ポリブレンを0.3%溶解したものをを用いた。試料の注入は落差法によった。電気泳動は室温で、20 kV定電圧で行った。

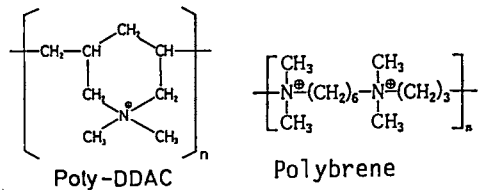


Fig. 1 Structural formula of polymer ions.

3. 結果および考察

各試料の移動速度 V_s と、標準物質として加えた安息香酸の移動速度 V_{BA} との差を、DDACやポリブレンの添加量に対してプロットしたものを図2および図3に示す。図2は1個の安息香酸類似体、図3は2個のイオンについてのものである。電気浸透流は、高分子イオンを溶解しない場合には正極から負極へ、溶解した場合には負極から正極へ向かい、実験の度に若干変化するが、このように差をとると、その影響は相殺される。安息香酸の実際の移動速度 V_{BA}

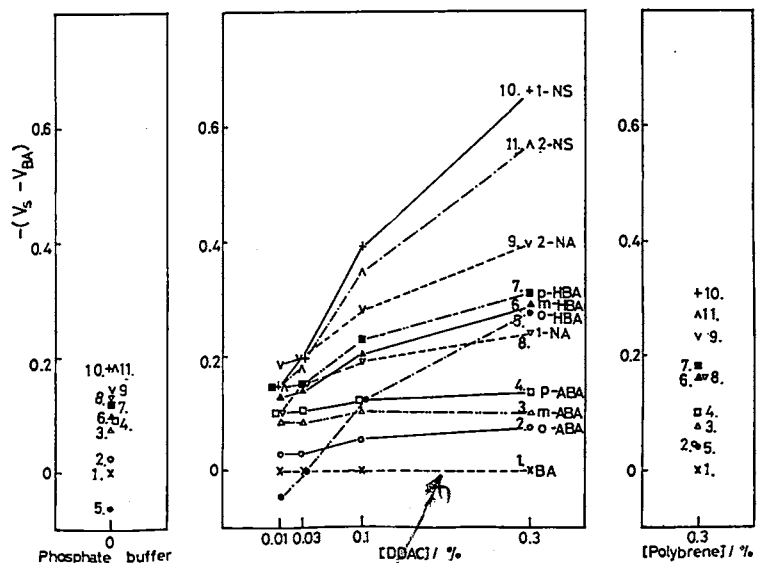
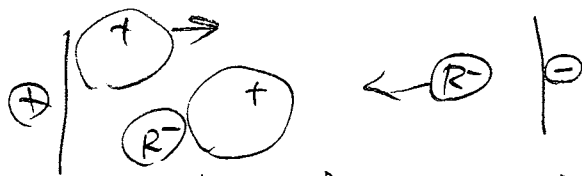


Fig. 2 Dependence of relative migration velocities of benzoic acid derivatives on the concentration of polymer ions: BA, benzoic acid; ABA, aminobenzoic acid; HBA, hydroxybenzoic acid; NA, naphthoic acid; NS, naphthalenesulfonic acid.

いせむら つぐひで てらべ しげる

DDAC MW (Gel filtration) ~27 }
polybrene }
- 1 - }
依り対の交換速度

intra molecular Hydrogen bond
0.1 → 0.6% DDAC



ph. DDAC addition
eff. of
± 10% 移動

△ 解離・相互作用力

は、リン酸塩緩衝液のみの場合で約0.7 mm/s、0.01~0.3% DDACを溶解したとき約2.0 mm/s、0.3%ポリブレンの場合で約1.7 mm/s程度であった。図2において、Vsはアミノ安息香酸、ヒドロキシ安息香酸またはナフトエ酸、ナフタレンスルホン酸の順に、DDACの濃度増加に従って安息香酸の移動速度に対して相対的に遅くなっている、つまり、DDACとの相互作用が強くなっている。o-ヒドロキシ安息香酸がDDACが低濃度のとき速く動くのは、分子内水素結合の影響と考えられる。それとアミノ安息香酸以外は、DDACの増加とともに異性体間の差も広がる。0.3% DDACの時のクロマトグラムを図4に示す。

安息香酸の理論段数は約25万段であった。ポリブレンを0.3%溶解した場合の結果は、図2のプロットで約0.06% DDACのときの相対移動速度に、かなり良く一致する。

次に、図3は、2価の試料について同様に示したものであるが、高分子イオンの添加効果はより顕著に現れている。つまり、リン酸塩緩衝液のみの場合には殆んど同じ保持時間に溶出し、分離されなかった試料が高分子イオンの添加で分離され、DDAC濃度が増すにつれて移動速度の差が

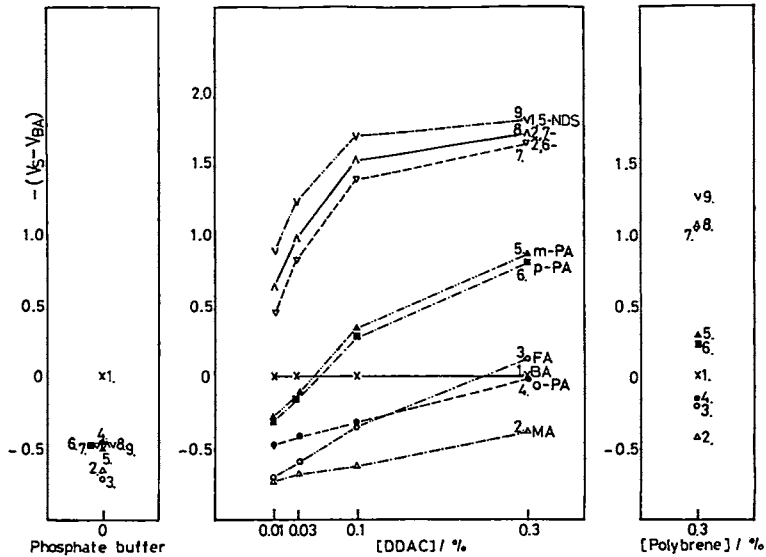


Fig. 3 Dependence of relative migration velocities of bivalent ions on the concentration of polymer ions: BA, benzoic acid; MA, maleic acid; FA, fumaric acid; PA, phthalic acid; NDS, naphthalenedisulfonic acid.

広がり、安息香酸に対する相対移動速度が小さくなった。図2と同様に、図3でもポリブレン0.3%添加効果は、DDAC 0.06%添加効果に相当した。このように、ポリブレン0.3%とDDAC 0.06%では相対移動速度に同じ効果を示し、各溶質の溶出順が同じであった。DDACの方が低い濃度で同じ効果を示すのは、アンモニウムイオン1個当たりの分子量では、DDACが約162、ポリブレンが約187で大差ないが、DDACでは主鎖から環状に突き出たアンモニウムイオンがあり、立体的にイオン対を生成しやすいことによると考えられる。

以上のように、高分子イオンを利用する動電クロマトグラフィーでは、試料イオンと高分子イオンのイオン対生成を利用することで、単なる電気泳動では分離不可能なイオンをうまく分離できることが明らかとなった。

- 1) 伊勢村、寺部、第31回液体クロマトグラフィー研究会講演要旨集、p.123 (1988)
- 2) 伊勢村、寺部、第49回分析化学討論会講演要旨集、p.199 (1988)

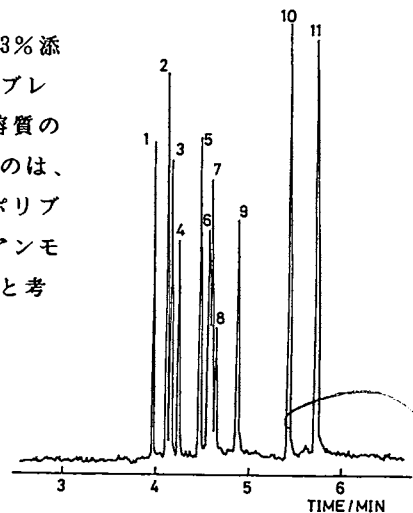


Fig. 4 Separation of benzoic acid derivatives. Electrophoretic solution, 50 mM phosphate buffer containing 0.3% DDAC: 1, BA; 2, o-ABA; 3, m-ABA; 4, p-ABA; 5, 1-NA; 6, o-HBA; 7, m-HBA; 8, p-HBA; 9, 2-NA; 10, 2-NS; 11, 1-NS.

1個 < 2個
DDAC 添加効果大

TPH 25302

2 キャピラリーゾーン電気泳動による 糖の過ヨウ素酸酸化分析

(近畿大・薬) 本田 進、鈴木健司、掛樋一晃

【はじめに】

キャピラリーゾーン電気泳動 (capillary zone electrophoresis, CZE) は、中空キャピラリー中で行う電気泳動であり、通常支持体を用いず直接キャリアー液中で試料成分の分離を行う方式をとる。この状態では、キャピラリー中に電気浸透流が発生し、試料成分はこのキャリアーの流れと電荷および分子サイズに見合った静電的効果 (狭義の電気泳動) の両者の相加的効果により、分離されながら導入点から検出点まで移動する。フューズドシリカ管を用いる通常の分析においては、電気浸透流速 V_{eo} が電気泳動速度 V_{ep} より大きく、陽極側から導入された試料の成分イオンは電気泳動により陽極側へ引き戻されながら電気浸透流によって陰極へ移動する。しかし、無機イオンの中には、 V_{ep} が V_{eo} を上回る、極めて大きな値をもつ場合がある。本演題においてはこのような例として 10_4^- および 10_3^- の分析をとりあげる。

10_4^- および 10_3^- は糖の過ヨウ素酸酸化に関する主要イオンであり、両者の同時分析は、糖の過ヨウ素酸酸化分析による定量や構造解析につながる。このような観点から CZEによる糖の過ヨウ素酸酸化分析についても基本的な検討を行った。

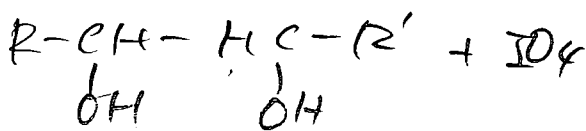
【実験方法】

電源：松定プレジジョン HER-30P1 型装置 (定電圧で 30 KV まで印加可能)。検出器：日本分光 UVIDEC 100-VI 型高速液体クロマトグラフィー用紫外検出器のセルブロックを改造して使用し、222 nm における吸収をオンカラム方式により測定した。キャピラリー：Scientific Glass Engineering 製フューズドシリカ管 (内径 50 μm , 長さ 80 cm)。試料導入：手動落差法 (落差 5 cm, 導入時間 5 sec)。糖の過ヨウ素酸酸化：糖試料 2 μmol をメタ過ヨウ素酸ナトリウムを 20 mM 濃度で含む pH 4.5 の 100 mM 酢酸緩衝液 (1 ml) に溶かし、25°C で反応させ、反応液を直接キャピラリーに導入して 10_4^- および 10_3^- を分析した。

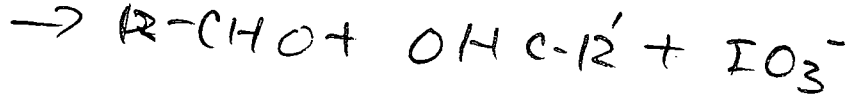
【結果】

分析条件 糖の過ヨウ素酸酸化分析は非 Malaprade 酸化による妨害を除くため、通常 pH 4-5 で行われる。したがって酸化反応液を直接キャピラリーに導入して分析を行うためにはキャリアーの液性を弱酸性にすることが望ましい。しかしながら弱酸性領域ではフューズドシリカ表面の電離が抑えられる結果と電位が減少して電気浸透流は小さくなり、電気泳動速度の方が大きくなるので、 10_4^- や 10_3^- は陰極から陽極へ移動することになる。このため本研究では陰極側から試料を導入した。この状態での CZE の様子を Fig. 1 に示す。なお、hydroxypropylcellulose 等を用いて電気浸透流を抑え電気泳動のみの効果で分析を行うことについても検討したが、分析時間が長くなり過ぎたので、この措置は行わなかった。

10_4^- および 10_3^- の保持時間は pH の上昇とともに増加し、これに伴って両者の間の分



5 ~ 100 μ moles



{
R₂H
-COOH
=CO

離度も上昇した。しかし、両イオンの移動度は pH に依存せずほとんど不変で、電気浸透係数が pH とともに増加するという現象がみられた。一方、 IO_4^- および IO_3^- の保持時間は酢酸濃度の増加とともにやや増加し、両者間の分離度も僅かばかり増加した。

分離の状況 この条件下で IO_4^- および IO_3^- の等モル混合物の電気泳動図は Fig. 2 のようになった。

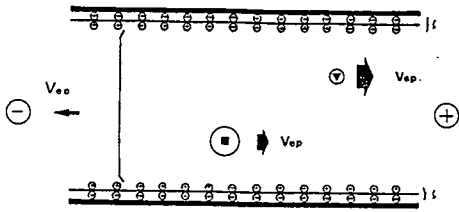


Fig. 1. CZE of IO_4^- and IO_3^- .

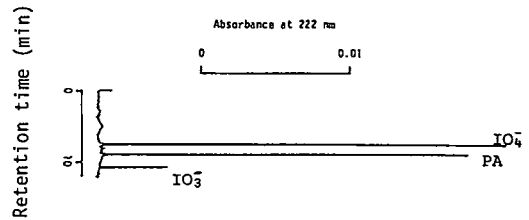


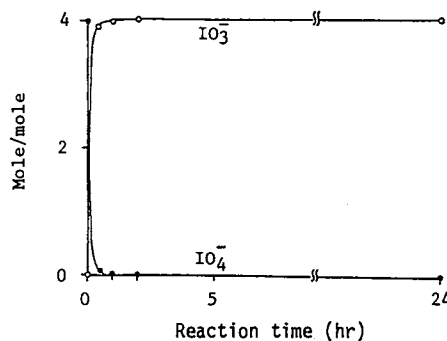
Fig. 2. Separation of IO_4^- and IO_3^- .
PA: pyromellitic acid (internal standard)

内部標準としては pyromellitic acid (1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid, PA) が適切であった。 IO_4^- 、PA および IO_3^- の理論段数はそれぞれ 40,000、80,000 および 190,000 であった。分離度は IO_4^-/PA が約 14、 PA/IO_3^- が約 9 で、これらは互いによく分離された。

定量 PA を内部標準としてピーク面積比法で測定した場合、 IO_4^- および IO_3^- はいずれも、少なくとも 1-20 mM の濃度範囲で直線性の良い検量線を与え、定量の再現性も良好であった。

糖の過ヨウ素酸酸化生成物の分析 試料を、キャリアーにメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液を溶かした溶液で酸化し、反応液を直接キャピラリーに導入して分析した結果、消費された IO_4^- および生成した IO_3^- の分析は共存物によって何ら妨害を受けず、例えば、xylitol の酸化の経時変化 (Fig. 3) にみられるように IO_4^- 消費量ならびに IO_3^- 生成量は、いずれも理論値によく一致した。他の種々の糖の酸化についても同様の結果が得られた。

Fig. 3. Time course of periodate oxidation of xylitol.



【結論】

上述のように本法は IO_4^- および IO_3^- の同時定量法として優れていることが示された。本法は迅速・簡便であるため、糖の過ヨウ素酸酸化生成物の分析には好適であると考えられる。

3 キャピラリー電気泳動法における分子間相互作用の可能性

(名工大) ○津田孝雄、小林泰文

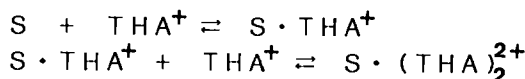
Possibility of hydrophobic inter-molecular interactions
in capillary electrophoresis.

TAKAO TSUDA and YASUFUMI KOBAYASHI: Nagoya Institute of
Technology

1. 自由溶液を用いた電気泳動法における添加剤は、
 - (A) 溶質に素材（中空キャピラリー管の内壁）への吸着を防ぐ効果
 - (B) 媒体中での添加剤による溶質と溶媒の解離平衡への関与
 - (C) 媒体中での添加剤と溶質の相互作用
 - (D) 添加剤を加えることによる媒体の特性の変化（粘性・pH etc.）、それに基づいた溶質の解離平衡の変化、及び溶質との相互作用の変化
 - (E) 等速電気泳動については、境界面を鋭く形成する
 - (F) 電解質、及び界面活性剤の素材表面への吸着に基づく素材表面の電気量の変化、これに基づいた電気浸透流速の変化
 - (G) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)などのミセルへの分配の成立
 - (H) 壁面での吸着層の形成
 - (I) 電解質の添加にともなう浸透流の抑制など添加剤の影響をあげることができる。

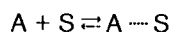
2. キャピラリー電気泳動における溶液中での添加剤(A)と溶質(S)の弱い会合についてテトラヘキシルアンモニウム過塩素塩(THA)を用いた報告(1)がある。

彼らは、溶液中で、



のような平衡を考えている。

本報告では、添加剤(A)と溶質(S)の分子相互が互いに近づき発生するような会合が存在するのではないかと考えて実験を行なった。すなわち、



Aは中性であっても電荷をもっていてもよい。A \cdots Sの相互作用は、ここでは主にアルカン-アルカン、アルカン-ベンゼンのような親油性の官能部位の相互作用と考える。

3. Aとして、エチレングリコール、エチルベンゼンスルホン酸、1-ナフタレンスルホン酸、1,5-ナフタレンジスルホン酸、アルキルスルホン酸、等を用い、Sとして、スベルミジン、アトレッシンのフォレスカミン誘導体やフェノールレッド、ベンゼン、等を用いた。結果を表1, 2, 図1に示した。これらの作用を移動度差をもたらすものとして考えている。

(1)Y. Walbroel, J. W. Jorgenson, Anal. Chem. 58, 479-481(1986)

月給面以之 → 16 fold // A 4 fold

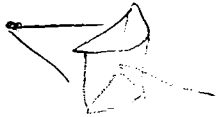


表 1

Molecular Interaction with EG

Additive	Non-Ethyleneglycol *1			5% Ethyleneglycol *2			$\Delta v(EG) - \Delta v(\text{Non-EG})$
	v(osm)	v(app)	$\Delta v(\text{Non-EG})$ *3	v(osm)	v(app)	$\Delta v(EG)$ *3	
spermidine*4	7.01	3.92	-3.09	5.71	2.97	-2.75	+ 0.35
putrescine*4	7.26	3.99	-3.27	5.83	2.99	-2.85	+ 0.42
Phenol Red	7.75	4.75	-3.01	6.53	3.89	-2.64	+ 0.36
Benzene	7.86	2.48	-5.38	6.42	2.17	-4.25	+ 1.14

Experimental Conditions

- *1 Borate-KCl-NaOH 5mM, 1,5-Naphthalenedisulfonic Acid Disodium Salt 38mM
Adjusted with 1N NaOH to pH7
- *2 Borate-KCl-NaOH 5mM, 1G5%, 1,5-Naphthalenedisulfonic Acid Disodium Salt 38mM
Adjusted with 1N NaOH to pH7
- *3 $\Delta(v(\text{app}) - v(\text{osm}))$
- *4 Fluorescamine derivation

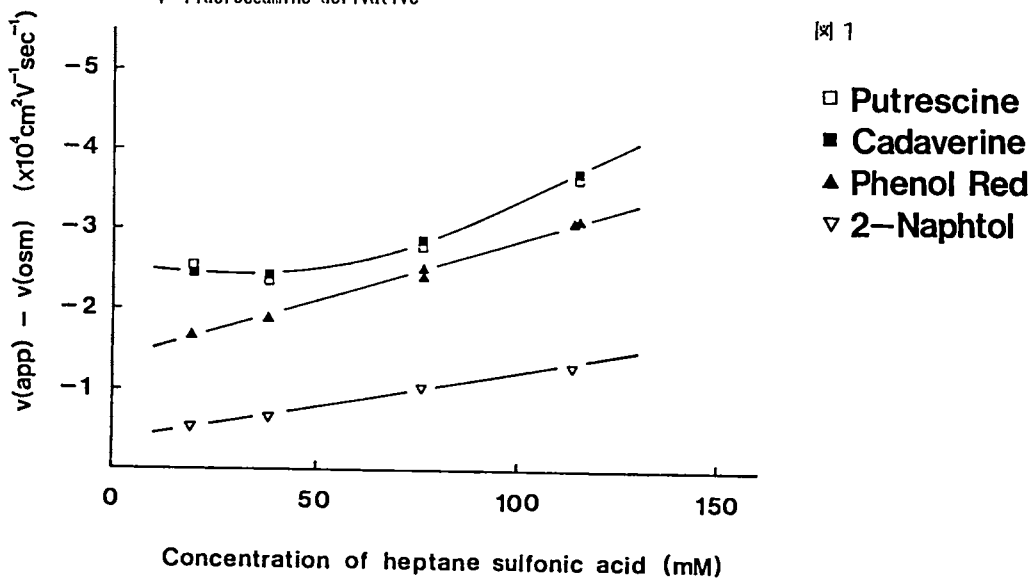
表 2

Effect of Different Mobilities

Additive	1-Naphthalenesulfonic Acid Sodium Salt*1 x10			1,5-Naphthalenedisulfonic Acid Disodium Salt*2 x10			$\Delta v(1,5\text{-NA}) - \Delta v(1\text{-NA})$
	v(osm)	v(app)	$\Delta v(1\text{-NA})$ *3	v(osm)	v(app)	$\Delta v(1,5\text{-NA})$ *3	
spermidine*4	5.48	3.12	-2.36	5.71	2.97	-2.75	-0.39
putrescine*4	5.48	3.04	-2.44	5.83	2.99	-2.85	-0.41
Phenol Red	5.87	3.62	-2.25	6.53	3.89	-2.64	-0.39
Benzene	—	—	—	6.42	2.17	-4.25	—

Experimental Conditions

- *1 Borate-KCl-NaOH 5mM, 1G5%, 1-Naphthalenesulfonic Acid Sodium Salt 38mM final pH7
- *2 Borate-KCl-NaOH 5mM, 1G5%, 1,5-Naphthalenedisulfonic Acid Disodium Salt 38mM
Adjusted with 1N NaOH to pH7
- *3 $\Delta(v(\text{app}) - v(\text{osm}))$
- *4 Fluorescamine derivative



(京大薬) 中川照直、○小田吉哉、渋谷明正、福田桐子、田中久

1、緒言

Mikker¹⁾, Jorgenson²⁾らによって開発された毛細管ゾーン電気泳動法(CZE)と、CZEの支持電解質溶液中に添加されたキャリアーへの試料の分配現象とを組み合わせた動電クロマトグラフィー(Electrokinetic Chromatography; EKC)が寺部ら³⁾によって開発された。キャリアーとしてイオン性界面活性剤を用いれば無電荷の物質もミセルへの可溶化の程度に応じて分離される。一方、血中薬物濃度のモニタリングは薬物の合理的投与設計を行う上で重要な課題である。そこで動電クロマトグラフィーを血中薬物の分析に適用する際、どのような長所や問題点があるのかを調べた。

2、実験方法

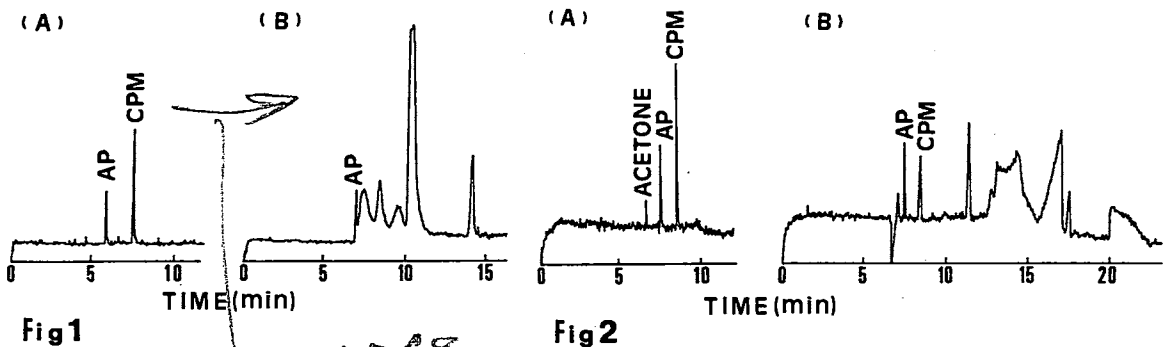
支持電解質溶液を満たした内径50 μm 、全長50~75 cmのフューズドシリカ毛細管の正極端にサイホン法で試料を導入し、高電圧を印加して試料を分離し負極端から20 cmの位置でオンカラム方により紫外吸収検出した。支持電解質溶液として0~100 mMのSDSを含むリン酸緩衝液を用いた。試料薬物としてセファロスポリン系抗生物質であるセフピラミド(CPM)、セフトジジム(CAZ)、アズトレオナム(AZT)を、内標準物質として血漿蛋白結合率の低いアンチピリン(AP)、またはイソニアジド(IA)を用いた。試料溶液は各薬物及び内標準物質をヒト血漿或は緩衝溶液に溶解して用いた。実験終了後、毛細管内の支持電解質溶液をマイクロシリンジで1規定の水酸化ナトリウムに置換して一晩放置した。実験開始前に蒸留水でこの水酸化ナトリウムを押し流した後、支持電解質溶液に再置換して使用した。

3、結果

Fig 1 にpH8、イオン強度0.05、SDS無添加のリン酸緩衝液を用いて、印加電圧15 kV、検出波長280 nmで、(A)緩衝溶液試料(B)血漿溶液試料[A, BともにAP 100 $\mu\text{g/ml}$ 、CPM 100 $\mu\text{g/ml}$ を含む]の分離例を示した。SDSを加えないCZEモードでも(A)のようにCPMとAPは約7分で良好に分離されたが、(B)の血漿試料では血漿蛋白質との結合率が低い(18%) APのピークは認められたが、血漿蛋白結合率が高い(98%) CPMのピークは蛋白質のピークと重なり観測されなかった。これは、CPMが蛋白質から遊離していないためであると思われる。またAPの保持時間は緩衝溶液試料(A)に比べて血漿試料(B)の方がやや長くなっている。これは毛細管内壁に血漿蛋白質が吸着されたためではないかと考えられる。次に、同じ支持電解質溶液にSDSを10 mM添加した結果をFig 2 に示した。SDSの添加によりAP及びCPMのピークを血漿成分のピークから8分で分離することができた(Fig. 2(B))。薬物ピーク溶出後、電圧の印加を止めて毛細管内に残存した蛋白質を、マイクロシリンジで洗浄液を注入することにより押し流した。Fig 2のピーク幅は、APでは緩衝溶液試料(A)と血漿試料(B)の場合でほぼ同じであったのに対して、CPMでは(A)に比べて(B)ではかなり広がった。これはCPMがAPより蛋白結合

おた よしや

率が高いことによるものと考えられる。しかしAP及びCPMの保持時間は(A)と(B)とあまり変わらなかった。次にCPMの臨床治療濃度の範囲(10~300 μ g/ml)で緩衝溶液試料と血漿試料について、それぞれ検量線を作成したところ両者は一致した。このことから本法によって血漿中のCPMの全濃度が測定できることが判った。なお検出限界はS/N比3で5 μ g/mlであった。また支持電解質溶液のpHおよびSDS濃度、試料注入量、薬物ピーク溶出後の毛細管の洗浄方法等の保持時間や理論段数及びそれらの再現性への影響についても述べる。



手記

4. 結論

本法は血漿中薬物の分析に応用するとき、(1)除蛋白操作なしに直接分析が可能である、(2)従来のHPLCの10倍以上の理論段数が得られる、(3)分析時間が短い、(4)必要試料が十数 μ Lと極微量であるなどの特徴を持っている。また支持電解質溶液へのSDS添加によって(a)血漿蛋白質の保持が大きくなり薬物と分離される、(b)蛋白質の毛細管への吸着が減少する、(c)薬物を血漿蛋白質から遊離させるなどの効果があることが判った。今後、試料導入法の改良や検出方法の改良により、本法はHPLCに優る実用分析法になると思われる。

5. 参考文献

- 1) F.E.P.Mikkers, F.M.Everaerts and Th.P.E.M.Verheggen, J.Chromatogr., 169, 11(1979).
- 2) J.W.Jorgenson and K.D.Lukacs, Anal.Chem., 53, 1298(1981).
- 3) S.Terabe, K.Otsuka, K.Ichikawa, A.Tsuchiya and T.Ando, Anal.Chem., 56, 111(1984).

5 NORBERTO A. GUZMAN, and LUIS HERNANDEZ. Protein Research Unit, Princeton Biochemicals Inc., Princeton, New Jersey 08543, U.S.A.
Two Practical Methods to Measure the Electroosmotic Flow Generated in High Performance Capillary Electrophoresis

One of the main characteristics of open-tube capillary electrophoresis is the existence of a buffer-electrolyte movement. This movement is referred to as electroosmotic (electroendosmotic) flow. In addition to the bulk flow of the electrolyte present in the buffer, electrophoresis also takes place. However, in most cases, the rate of electrophoretic flow is less than the rate of electroosmotic flow. Consequently, all species in the injected sample normally travel in one direction, the direction of the electroosmotic flow. Therefore, it is critical to measure the electroosmotic flow for every capillary column and every set of conditions necessary for separation of a group or family of components.

We report in this work the development of two practical methods to measure the electroosmotic flow (both methods are based on the use of the porous glass joint assembly developed for electrochemical detection¹: a) The first method is based on the measurement of the time necessary to generate a drop at the tip of the detection capillary. Then under a microscope the drop is aspirated by capillarity into a piece of capillary column. Since the distance between the two menisci formed can be measured by a caliper, the total volume loaded into the piece of capillary column can now be calculated with the formula of the volume of a cylinder. Knowing the time needed for the drop to form, the volume of the drop, and the size of the detection capillary it is possible to calculate the rate of electroosmotic flow in terms of nl/mm/sec; b) The second method is based in the use of a powerful magnifying glass and a graduated scale near the end of the detection capillary. This makes it possible to measure the distance needed for a meniscus to travel between two points during a fixed, determined time. Since the volume of the capillary is known it is possible to calculate the electroosmotic flow at set voltages maintaining constant temperature and buffer concentrations.

(1). R.A. Wallington, and A.G. Ewing, Anal Chem., 59: 1762-1766 (1987).

1. 關於本會之組織及職權範圍，業經本會第一屆會員大會通過，並經內政部備案在案。

2. 本會之宗旨，在於維護會員之合法權益，並促進會員間之合作與互助。

3. 本會之組織，由會員大會、理事會及監事會組成。

4. 本會之職權範圍，包括：

- (一) 召集會員大會，並報告業務執行情形。
- (二) 制定及修改本會章程。
- (三) 選舉及罷免理事、監事。
- (四) 審核會員入會申請。
- (五) 管理會員名冊及會費。
- (六) 處理會員之投訴及申訴。
- (七) 其他依章程規定之職權。

5. 本會之經費，由會員繳納之會費及社會捐助等項充實。

6. 本會之辦事處設於本市中山路123號。

7. 本會之秘書長由理事會聘任，負責處理會務。

8. 本會之財務狀況，應定期向會員大會報告。

9. 本會之決議，應以出席會員之過半數為有效。

10. 本會之章程，自通過之日起施行。

中華民國 100 年 1 月 1 日

秘書長 張三 啟

(山口女子大学家政) 二五田公俊、有富美代子、大村貴子、井川弘子

1. 等速電気泳動法 (IP) による試料の分離は混合ゾーンにおける試料成分の移動度の差に基づく。IP による試料の分離分析の成否は混合試料イオンの移動度の差が大となるようなリーディング液 (L液) とターミナル液の選択に掛かる。分子構造は既知であるが、電気泳動的挙動の知られていない試料成分を IP により分離しようとするとき、任意の pH での移動度ないし定性指標 Re が推測できれば、実験条件の設定が容易となる。藤下ら^{1a, b)}は有機系イオン性物質の分子体積を用いて、絶対移動度 Mo および Re を求める相関式を導いた。今回われわれは、分子体積に代わるものとして、トポロジー指数の導入を試みた。トポロジーに基礎をおいた化学的予測の目的で導入された指数の種類は多い。その中で応用例が多く、多様性からみて、最も有用性の高いものとされているランディスの分子連結指数を用いることとした。化学グラフでは、水素原子は分子の構造の決定にあまり重要でないとして省略されるケースが多い。²⁾ここでは省略した場合の指数と水素または二重結合をも考慮した場合のそれぞれについて、ランディスの方法で各点に "度" を定義し、線の "値" の和として算出した指数 (R_i, H_i, D_i) とカルボン酸の Mo および Re の相関を検討した。また L液および試料層での、任意の電荷 Z における Re をトポロジー指数より求める関係式を導くことを試みた。

2. (1) 飽和モノカルボン酸のトポロジー指数と Mo との相関

図1に飽和モノカルボン酸 (C_1-C_{10}) について得られた D_i と Mo との相関を示す。カブリン酸のみは最小二乗法による一次相関より大きく外れる結果を得た。 H_i との相関の場合も、 D_i の場合とほぼ同様の結果が得られたが、 R_i ではギ酸とカブリン酸が一次式より外れる。 R_i についてはギ酸とカブリン酸を、 H_i と D_i ではカブリン酸のデータを除いた点の一次相関より、 Mo にたいする R_i, H_i および D_i の相関式として、次の結果を得た。 $Mo=19.06+40.66*|Z|/R_i$ ($r=0.9993$); $Mo=20.07+81.57*|Z|/H_i$ ($r=0.9987$); $Mo=21.53+67.13*|Z|/D_i$ ($r=0.9992$)。カブリン酸が直線より外れるのは水にたいする溶解度が小さく、実験的取扱が困難であり、 Mo の文献値が真の値よりずれているためであろうか。今後の再実測に待ちたい所であるが、カブリン酸の Mo として、 $26.1(R_i), 26.1(H_i), 26.6(D_i)$ が相関式より算出された。

(2) アミノ酸の Mo とトポロジー指数との相関

飽和モノカルボン酸よりえた指数 (R_i, H_i, D_i) についての相関式を、22種のアミノ酸に、それぞれ適用して算出した Mo の値を表に示した。表中に、分子体積より求められた藤下ら^{1b)}の成績も参考表示した。いずれの指数を用いても、チロシンを除いて、文献値に比して、凡そ +5% の精度で Mo を求め得た。チロシンは、文献値に比べて、 R_i よりの算出値では 26.6% の、 D_i では 39.9% の高値が得られ、文献値を大きく逸脱する結果が得られた。このことは各トポロジー指数に対してプロットしたアミノ酸の Mo の分散図 (図2) にも見る事ができる。図2中の直線は飽和モノカルボン酸についてえた D_i にたいする一次相関直線を示す。

3. アミノ酸の Re とトポロジー指数との相関

イオンの平均電荷とトポロジー指数より、塩化物イオンをリーディングイオンとするときの Re を求め得るならば、任意の電荷を与えて算出した Re を検討することによって、L液の最適の pH の設定が容易に行えるものと思われる。図3, 4に D_i を用いて、それぞれL液の pH 7.0 における Z およびサンプル層の pH 7.0 における Z と Re の相関式を求めるために試みたプロットの例を示す。 R_i, H_i, D_i それぞれについて同様の処理を行い、次の関係式を得た。

$$\begin{array}{lll} \text{L液層} & \text{---} Re=1.524*1/|Z|*R_i^{0.438} & Re=1.045*1/|Z|*H_i^{0.450} & Re=1.134*1/|Z|*D_i^{0.418} \\ \text{サンプル層} & \text{---} Re=1.523*1/|Z|*R_i^{0.434} & Re=1.048*1/|Z|*H_i^{0.446} & Re=1.141*1/|Z|*D_i^{0.414} \end{array}$$

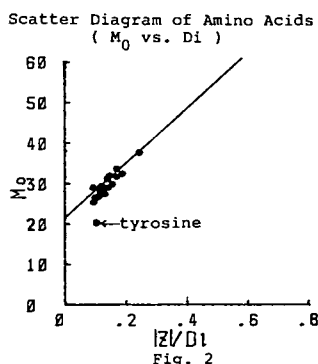
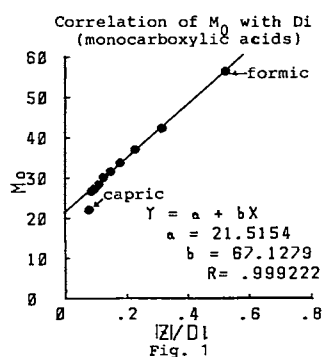
これらの関係式より算出した Re 値を文献値と比較すると、チロシンを除くほとんどのアミノ酸についてかなりよく一致する結果が得られた。ヒスチジンとチロシンの例を、図5および図6にそれぞれ示した。

トポロジー指数の計算は、水素を無視する R_i による方が、その他の場合に比べてはるかに容易である。しかも、かなり文献値に近い Mo 値あるいは Re 値の推測が可能であるが、しかしこの場合はギ酸のように低分子の化合物には適

にごた きみとし、ありとみ みよこ、おおむら たかこ、いがわ ひろこ

用できない。また、不飽和結合を有する化合物でも、それと同じ炭素数を有する飽和化合物と同じ指数が与えられることとなり、相関直線より逸脱する結果となる。Di の場合のように、水素および不飽和結合数を”度”に加えることは、原子の種類を問わず、分子中の各原子の化学原子価を各点の”度”（トポロジー次数）とすることに等しい。このように定めた”度”の平方根の逆数の積を、線の”値”とし、その”値”の総和を指数とする Di による方が、Ri や Hi によるよりも、広くカルボン酸一般に適用する相関式としてはよいように思われる。

今回用いたデータ（文献値）はすべて広島大学工学部 木曾義之、広川健 両博士の御好意により提供された文献³⁾およびSIPSプログラムに収録されたものによった。記して、両氏に深甚なる謝意を表す。

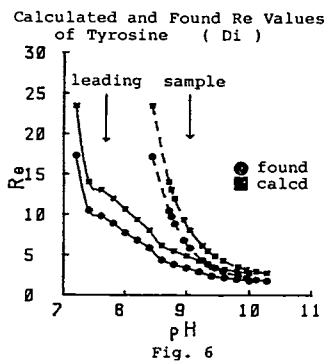
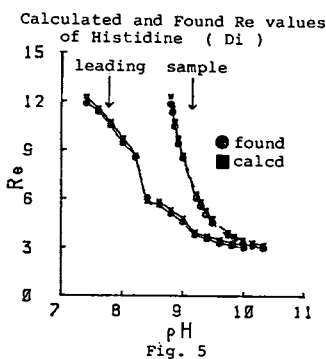
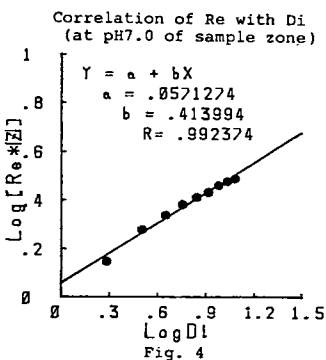
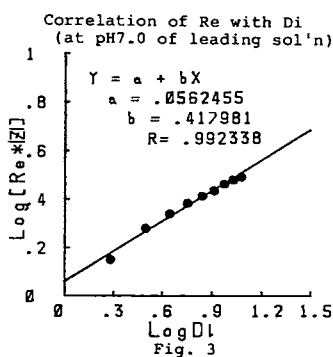


No	amino acids	M ₀ (V ₀)	M ₀ (W ₀)	M ₀ (Lit)	M ₀ (Ri)	M ₀ (Hi)	M ₀ (Di)
1	Glycine	43.0	40.9	37.6	37.0	38.5	37.8
2	Alanine	38.2	41.6	34.4	33.7	34.4	34.1
3	Valine	32.2	34.5	28.6	30.5	30.0	30.0
4	Leucine	30.2	33.6	26.8	29.2	28.7	28.9
5	Isoleucine			27.3	29.0	28.7	28.9
6	Serine			33.6	31.8	33.1	32.9
7	Threonine			31.2	30.5	31.0	30.9
8	Cysteine			31.7	31.8	33.1	32.9
9	Cystine			29.0	25.4	27.2	27.7
10	Methionine			29.4	28.8	29.5	29.6
11	Phenylalanine			27.0	26.2	28.0	28.9
12	Tyrosine	27.5	30.9	20.3	25.7	27.6	28.4
13	Tryptophane			25.4	24.7	26.8	27.8
14	Asparagine	32.6	36.1	31.8	29.1	30.9	31.3
15	Glutamine			28.9	28.0	29.4	29.8
16	Aspartic acid	33.2	37.1	29.8	29.1	31.5	31.8
17	Glutamic acid	30.9	34.4	27.4	28.9	30.1	30.2
18	Lysine			26.5	27.7	27.9	28.2
19	Arginine			26.5	29.5	27.6	28.1
20	Histidine			28.5	28.9	29.1	29.8
21	Ornithine			28.5	28.8	29.0	29.2
22	Proline			29.0	29.8	31.1	31.0

$$M_0(Ri) = 19.06 + 40.66 \cdot |Z|/Ri$$

$$M_0(Hi) = 20.07 + 81.57 \cdot |Z|/Hi$$

$$M_0(Di) = 21.52 + 67.13 \cdot |Z|/Di$$



1. a) 藤下ら, 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) 藤下ら, 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. D.H.ループレイ, サイエンス, 1986年11月号, pp.66-75.
3. T.Hirokawa et al., J. Chromatog., 271, D1-D106(1983)

7 P G 微分法による等速電気泳動図の解析

(3) キャリヤーアンフォライトの分析

城西大学・理・化学 ○小林 英三郎・喜多由華

『緒言』

タンパク質の電気泳動法において、等電点電気泳法 (IEF) では、多成分系両性電解質キャリヤーアンフォライトにより pH 勾配を形成させ、タンパク質の等電点の測定や分離、分析に広く用いられている。一方、等速電気泳動法 (ITP) ではキャリヤーアンフォライトをスペーサーとして用いタンパク質の分析が行われている。

この二つの分離、分析法においてはキャリヤーアンフォライトの成分分布、および成分量が分離能を決定している。しかしながら、市販のキャリヤーアンフォライトは、形成される pH 範囲、およそその分子量等が知られているのみであり、その両性電解質の成分についても、分析方法は明かでないが、単位 pH あたり 40 成分から 1000 成分にもおよぶといわれている。

今回、我々は細管式等速電気泳動 (CITP) により市販のキャリヤーアンフォライトを分析し、各社製品の成分分布と組成についての知見を得た。また IEF により形成された pH 勾配をもつポリアクリルアミドゲルからキャリヤーアンフォライトを抽出し CITP を行い両性電解質の成分について分析した。これらの結果に基づき、キャリヤーアンフォライトの成分組成の不均一性がタンパク質の分析に与える影響について検討した。さらに、等電点電気泳動におけるキャリヤーアンフォライトの選択と、等速電気泳動におけるスペーサーイオンの組合せを設計する手がかりを得た。

『dPG イソタコフェログラム』

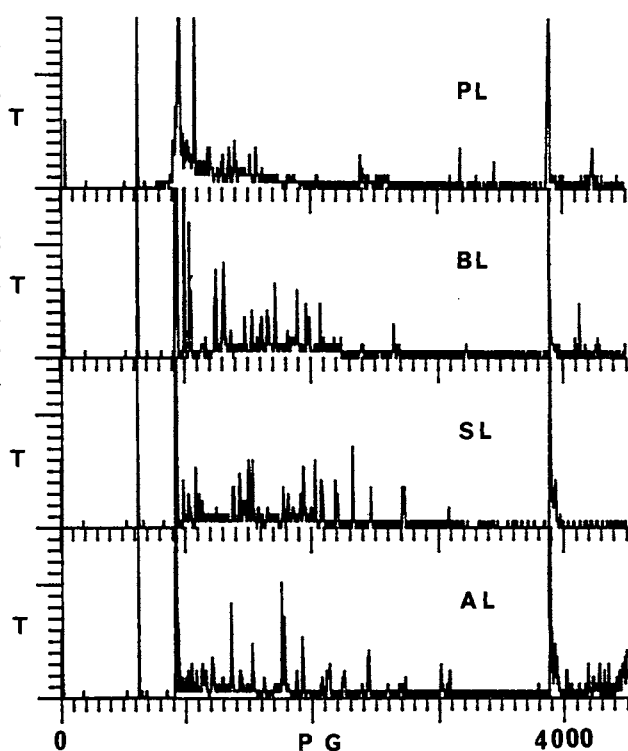
細管式等速電気泳動法 (ITP) において、PG 信号の微小変化 ΔPG に属するゾーン長 (t)、およびこのゾーンに含まれる物質の UV 吸収量 (A) を、PG 値に対してプロットすれば『dPG イソタコフェログラム』を得ることが出来る。1)~6) 従って、UV 信号は常に物質固有の電気泳動的性質を反映する PG 値への帰属が出来るので、試料およびスペーサーの組成が異なっても、PG 値に基づき RE 値を定性指標として再現性が高いより詳細な解析が可能である。

『結果および考察』

1) キャリヤーアンフォライトの分析:

Parmalyte pH 3-10 (PL), Bio-Lyte pH 3-10 (BL), SEPALINE pH 3.5-10 (SL) および Ampholine pH 3.5-10 (AL) の各キャリヤーアンフォライトは含量表示に従い 0.4 % 溶液を調製し 6 μ l 分析したが、炭酸イ

FIG 1

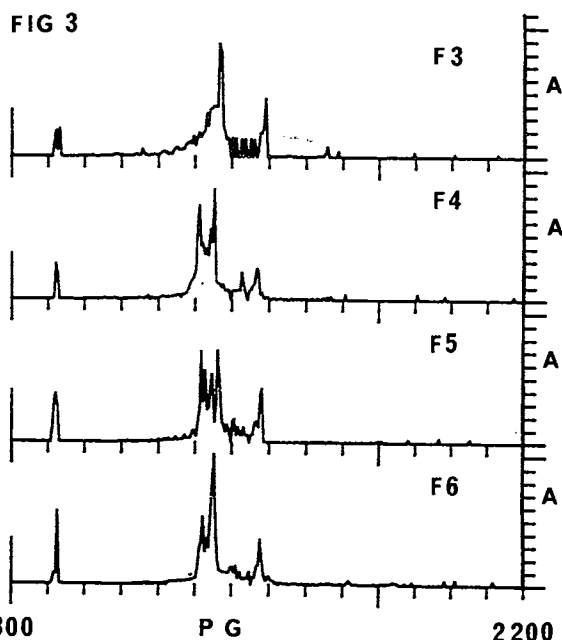
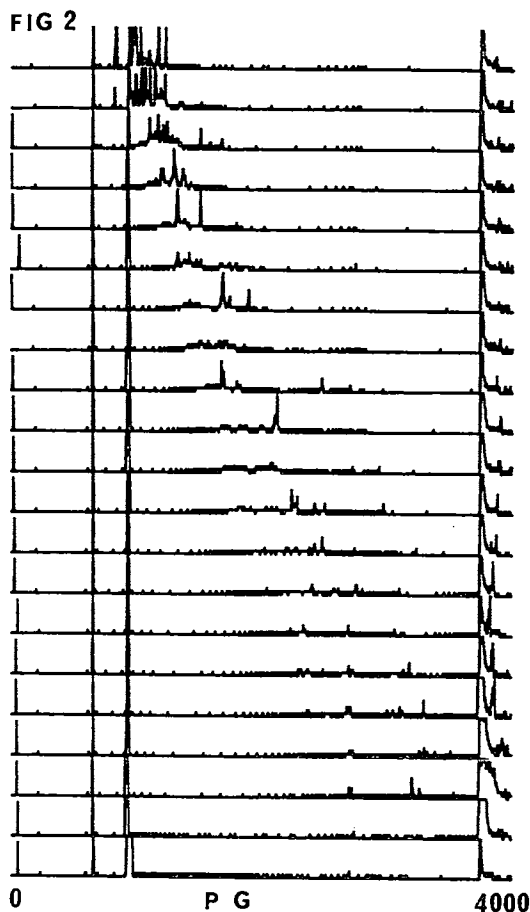


こばやし ひでさぶろう、きた ゆか

オンとターミナルイオン間の泳動時間がそれぞれ異なるので、表示されている重量組成とは異なるイオン成分で構成されていると思われる。ここでは原液をALとSLは1/100 BLは1/50 またPLは1/40に希釈し標品とし泳動時間が同一になる条件で分析した。PLとBLは炭酸イオンに近接した位置にピークがあり、特にPLは炭酸イオンより低いPG値のものが存在しているので無機イオンを含んでいると思われる。各標品は全領域にわたって均一でなく特定の成分が多く存在しており、酸性から中性領域であるPG値の低い範囲には各標品とも成分が多い。しかしながら、塩基性領域であるPG値の高い範囲では各標品とも成分種、量がともに少ない。

2) IEFで形成されたpH勾配をもつゲルのキャリアアンフォライトの分析:
 キャリアアンフォラン1.5%、6.8%ポリアクリルアミドゲルで等電点電気泳動を行ったゲルは電極間を21分画し、各分画(18mm×5mm)にそれぞれ0.5mlの純水を加えキャリアアンフォライトを抽出した。最上段カラムは陽極、最下段カラムは陰極を示す。(FIG.2)各分画の主成分はPG値の低いものから高いものへ移行していることが明確に分析できた。陽極側第1分画から第5分画は成分数、量ともに多いが、陰極側では少ないことがわかる。等電点ゲル電気泳動のキャリアアンフォライトの各成分はpKの大きさの順序に泳動されており、この結果としてpH勾配が形成されると考えられる。

3) ゲル分画標品によるBSAの分析:
 2)で得られた陽極側第3から第6分画標品をスペーサーとして市販のBSAを分析した。(FIG.3)スペーサーの成分組成によりBSAの分離パターンが異なることは明確であり、分析結果の解析にはスペーサーの成分を考慮する必要がある。



- 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)

(広島大工) O 広川健、木曾義之

1. 3成分混合試料系(S-M-P)の等速電気泳動分離における分離時間を等量のS-MまたはM-P 2成分混合試料の分離時間と比較すると、3成分系の方がかなり遅れて分離される(成分がS、M、Pの順に分離検出される場合)。この事は一般的により多成分系の場合でも成立する。一見当然のようでもあるが、何故このような遅れが起こるのかを明確にする事は分離条件の最適化を行なう上で重要であると考えられる。本講演ではこの遅れに関して分離過程の測定結果およびシミュレーションから得られた知見について報告する。

2. 分離過程の測定装置としては第7回等速電気泳動シンポジウムに於て報告した3チャンネルUV検出器を使用した¹⁾。使用したリーディング電解液(L)は5mM HClで、緩衝剤としてはβ-アラニン(pH=3.6)を使用した。ターミナル液(T)としては10mM カブロン酸を使用した。試料としてはSPADNS(S)、モノクロ酢酸(M)、ピクリン酸(P)の等量混合液を上記の緩衝剤でpH調整して使用した。

第7回等速電気泳動シンポジウムで報告した分離過程のモデルでは、わずかではあるが実験的に認められた分離時間の試料溶液のpH依存性をシミュレートできなかったが、今回は泳動初期における試料溶液のpH変化を考慮したモデル(MSPR)を使用した。

3. 図-1はSMP 3成分系の分離過程の模式図である。試料の実効移動度は次の順になっている。
 $\bar{m}_S > \bar{m}_M > \bar{m}_P$ 1)

これらの試料中例えばSMの分離時間 $t_{res, SM}$ は次式で表わすことができる。

$$t_{res, SM} = l_S / (V_{IP} - V_{S/SM}) \quad 2)$$

ここで l_S は定常状態における試料Sのゾーン長、 V_{IP} は等速電気泳動速度(L/S界面の速度)、 $V_{S/SM}$ はS/SM界面の速度である。これらの速度は次式で表わすことができる。

$$V_{IP} = E_L \cdot \bar{m}_L, \quad V_{S/SM} = E_{SM} \cdot \bar{m}_{M, SM} \quad 3)$$

ここに E_S 、 E_{SM} はS、SMゾーンの電位勾配、 \bar{m}_S 、 \bar{m}_M はS、Mイオンの各ゾーン内での実効移動度である。分離時間が成分数によって異なるのは結果的に3式の $V_{S/SM}$ が成分数に依存するためである。図-2は3および2成分系の分離時間のシミュレーションの結果を示したものである。明らかに3成分系の方が分離時間が遅れており、この計算結果は実測結果とよく一致した。このような遅れが生じるためには移動度または電位勾配、あるいはその両方が成分数により変化することが必要である。このような観点から2および3成分系のシミュレーションの結果をまとめると次のようになる。以下2成分系を(2)で3成分系を(3)で表わした。

①混合ゾーンのpHはどちらの系でもほぼ同じである。②混合ゾーン内の試料イオンの実効移動度も成分数によりあまり変化しない。③混合ゾーン内の試料濃度は大きく変化する。これらの濃度の試料pH依存性を図-3に示した。

$$SM : C^{t, S, SM(2)} > C^{t, S, SM(3)}, \quad C^{t, M, SM(2)} < C^{t, M, SM(3)} \quad 4)$$

$$MP : C^{t, M, MP(2)} < C^{t, M, MP(3)}, \quad C^{t, P, MP(2)} > C^{t, P, MP(3)} \quad 5)$$

SM混合ゾーンでは3成分系の場合移動度の大きいSの存在比が増え移動度の小さいMの存在比が減少する。またMP混合ゾーンでは3成分系の場合移動度の大きいMの存在比が増え移動度の小さいPの存在比が減少する。この事より次の関係が成立する事が明かである。

$$\textcircled{4} \text{混合ゾーンの電位勾配} \quad E_{SM(2)} < E_{SM(3)}, \quad E_{MP(2)} > E_{MP(3)} \quad 6)$$

⑤以上の事から界面速度の間には次の関係が成立する。

$$V_{S/SM(2)} < V_{S/SM(3)} < V_{IP} < V_{MP(3)/P} < V_{MP(2)/MP} \quad 7)$$

$$\bar{m}_{M, SM(2)} E_{SM(2)} < \bar{m}_{M, SM(3)} E_{SM(3)} < V_{IP} < \bar{m}_{M, MP(3)} E_{MP(3)} < \bar{m}_{M, MP(2)} E_{MP(2)} \quad 8)$$

ひろかわ たけし, きそ よしゆき

→ 5成分 - simulation → 10成分
 移動度の差
 → 分離時間
 10mM 100μA
 10⁻⁵ cm²/Vs sec
 180
 150

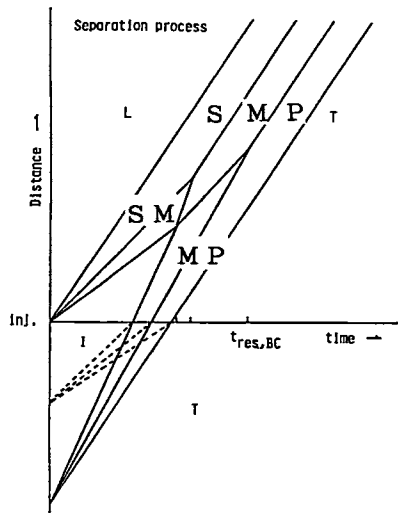
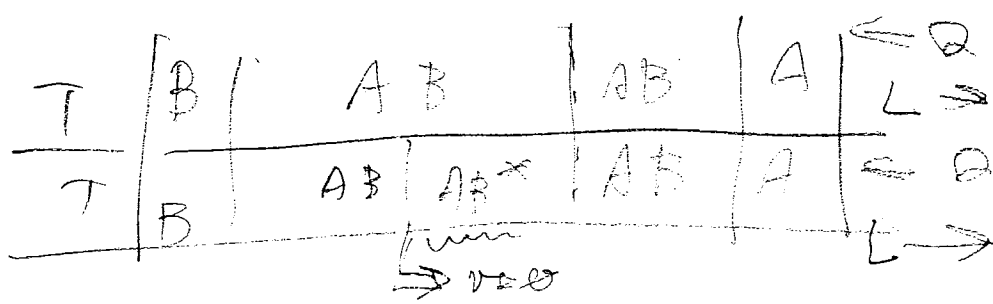


図-1 3成分系の分離過程

L : リーディングゾーン、
 S、M、P : 試料ゾーン
 SM、MP : 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

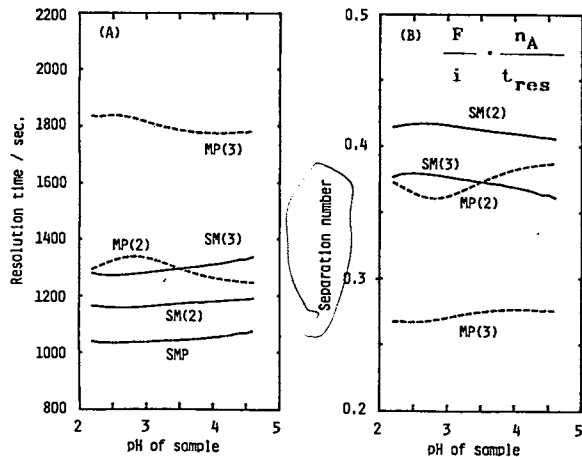
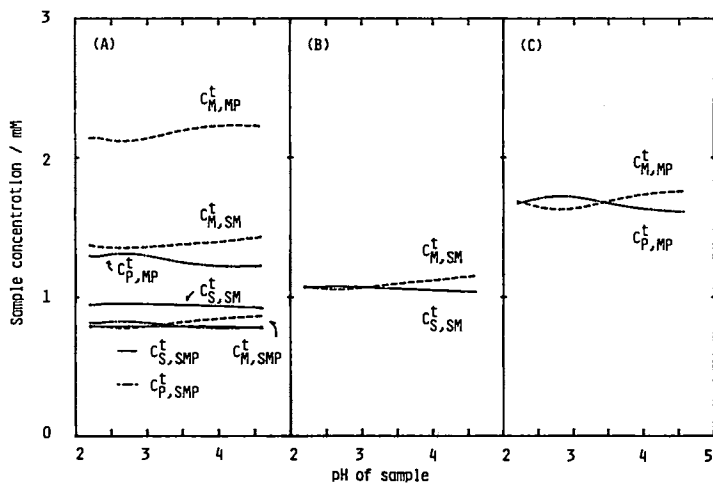


図-2 SMP 3成分系および
 2成分系の分離時間のシミュレ
 ーションおよび Separation
 numberの試料 pH 依存性
 試料各 2.5 nmol、50 μA
 (分離用細管内径 0.5 mm)



F ; Faraday constant
 i ; migration current
 n_A ; sample amount of chlorate
 t_{res} ; the resolution time

図-3 混合ゾーン中の試料濃度
 の試料 pH 依存性 (試料等モル)
 SMP 3成分系 (A)
 SM、MP 2成分系 (B, C)

従って2)式から

$$t_{res, SM(2)} < t_{res, SM(3)} \quad , \quad t_{res, MP(2)} < t_{res, MP(3)} \quad 9)$$

となり、試料が等量であっても3成分系の方が2成分系よりも分離に時間がかかることになる。

以上まとめると、このおくれは2成分混合ゾーン中の試料の濃度比の違いが主な原因であり、そのため2成分混合ゾーンの電位勾配に違いが生じ、3成分系の界面速度が2成分系よりも等速電気泳動速度に近づくことによる。

1) 中原清、広川健、木曾義之、第7回細管・等速電気泳動シンポジウム(東京、1986)。

→ pH差 ← 濃度比

0.13 mm/data

2800/32 cm

3.6 sec/1 bit

BQJFACG

家

9 等速電気泳動の分離過程 - 走査型UVゾーン検出器の試作

(広島大工) ○横田泰朗、広川健、西山文隆、木曾義之

1. 演者らは第7回等速電気泳動シンポジウムに於て32チャンネルUV検出装置の製作と解析例について報告したり。その装置では各検出器の間隔は約5mmで分離用細管(内径0.5mm)に対して固定されており、16cmの範囲での分離過程を追跡するものであった。一方試料の成分が多い系の分離過程を解析しようとするより長い泳動距離に渡って分離過程を追跡する必要がある。しかし従来の方式を踏襲するとアンプその他の電気回路が非常に複雑になり、実際問題として保守が困難になる。今回我々はこの問題を解決するため、光源および検出器を一体としてリニアヘッドに取り付けパルスモーターで駆動し、32cmの範囲で細管を走査する新方式(走査型UV検出方式)を採用した。その結果、実用化の見込みがあったので、問題点を含め試作機の性能、測定例について報告する。

2. 装置の概略図を図-1に示した。検出部以外には島津製作所IP-1Bの部品を使用し、分離用細管としてはPCTFE(1.0x0.5mm)を使用した。本装置で使用したリニアヘッドは約32cmの範囲で細管を走査できる(オリエンタルモーター、UPH566LB3-A)。走査に要する時間は約1.8秒で、この間に約1600のUV信号を取り込み、リニアヘッドが戻る間にディスプレイに表示した後、RAMディスクにデータを書き込む。細管方向の長さの分解能は0.2mmとなり実用上十分な値を得ている。パルスモーターの制御およびデータ取り込みにはPC-9801E及び専用インターフェイスを用いた。なおUV光源としては重水素ランプを使用した。フィルターのλmaxは330nmである。

実験に使用したリーディング電解液(L)は5mM HClで、緩衝剤としてはβ-アラニン(pH=3.6)を使用した。ターミナル液(T)としては10mMカブロン酸を使用した。試料としてはSPADNS(S)、モノクロ酢酸(M)、ピクリン酸(P)の1:2:1混合液を使用した。

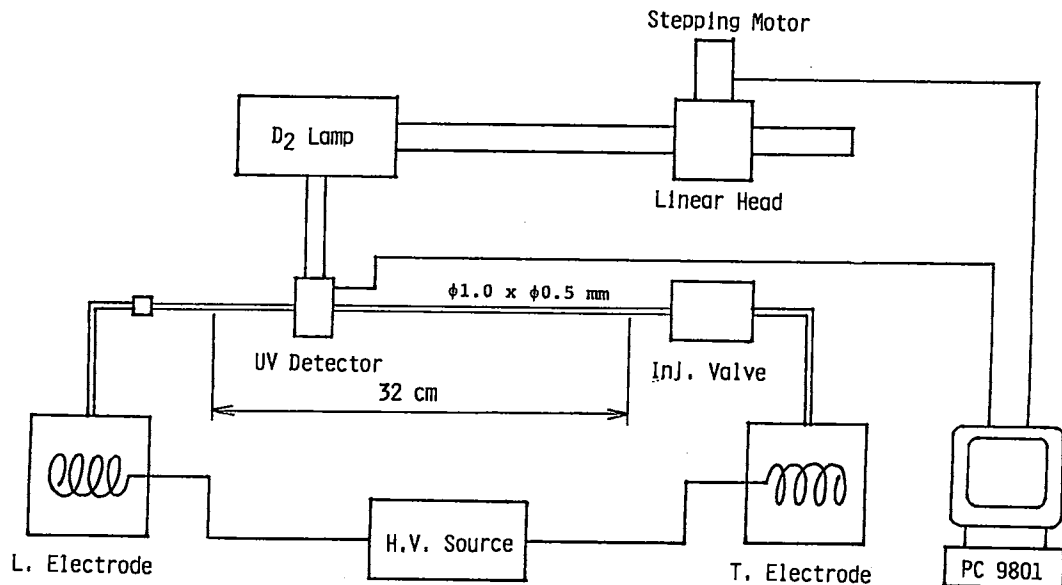


図-1 走査型UV検出器を備えた等速電気泳動装置

よこたやすろう・ひろかわたけし・にしやまふみたか・きそよしゆき

Sample window
 Waving.

走査 → 分離能
 モデル =

3. 本装置の実用化における問題点は細管の不均一性によるバックグラウンドも含めいかにしてS/Nを上げるかという点である。本方式における雑音発生源としては1)光源、検出部が分離用細管に対して常に移動しているため検出部と細管の接触状態が変化する事、2)駆動源がパルスモーターであるため微少な衝撃が連続的に光源、検出部に加えられる事などが考えられる。現在のところ細管と検出部の構造、細管の設置法を検討してかなり雑音を低減できている。例えばピクリン酸のように強いUV吸収を持つ物質については雑音は無視できるところまで到達しているが、今後はUV吸収の弱いものについても測定可能となるよう更に検討を重ねる必要がある。

これらの影響をなるべく抑えてゾーン界面の動きを精度良く測定するため、図-2に示すように差分スペクトルをとる方法を考案した(一回前の走査で得た位置スペクトルとの差分を計算する)。試料の界面は正負のピークとして観測される。正のピークがUV吸収帯(ゾーン)の始めに、負のピークが終わりに対応している。

図-3はSMP3成分(各24.5、50、23.3 nmol/10μl)の分離過程の差分スペクトルである。L/S界面の位置を揃えて示した。図のように差分フェログラムのS/N比はかなり良好である。SMP、MP、SMの各混合ゾーンをはじめ、全ゾーンが検出されている。なお一部ずれたピークがあるがこれらはリニアヘッドの立ち上がり時(加速中)に得られたものである。界面速度等の解析には走査の時間差などを考慮する必要があるが、詳細は講演で報告する。

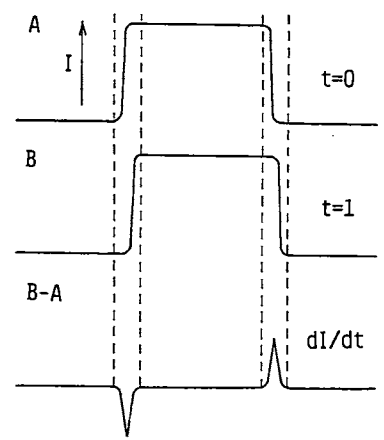
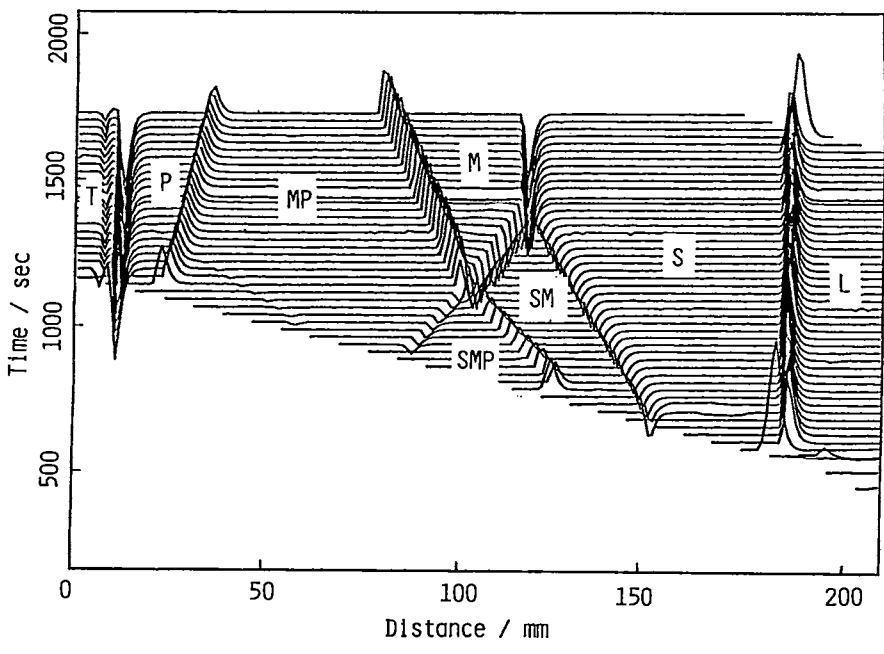


図-2 泳動ゾーンの差分UVスペクトル



L:5mM HCL
 pH 3.6 (β-Ala)
 0.2% HPC
 T:10mM Cap.
 0.2% HPC
 S:SPADNS
 M:monochloroacetic acid
 P:picric acid
 SMP,SM,MP:mixed zone

図-3 SMP3成分系の分離過程における差分UVスペクトル

1) 中原清、広川健、木曾義之、第7回細管・等速電気泳動シンポジウム(東京、1986)。

10 核酸の全自動キャピラリー等速電気泳動

○山本 秀子、真鍋 敬、奥山 典生（都立大・理・化）

はじめに

核酸の分析は、主にアガロースゲル電気泳動により行われている。しかし15~20K b. p. を越える大きさのものになると、アガロース分子のつくる網目構造を通過できなくなり、分離が困難になってくる。また、それ以下の大きさのものであっても、電気泳動の操作や染色操作が繁雑であるという問題点がある。キャピラリー電気泳動法は、支持体を用いていないことから試料の分子量に関する制限がない。さらにゲル作製や染色などの操作も必要なく、検出はUV検出器により泳動中に行うことができる。そこで、核酸のキャピラリー電気泳動法による分析について検討を行った。

実験方法

装置： 演者らが、すでに報告した全自動キャピラリー電気泳動装置を用いた。装置の模式図を図1に示す。電極槽液の交換は、2台のペリスタポンプにより行い、試料はオートサンプラーからペリスタポンプで添加される。試料添加、通電、UV吸収データと電位勾配データの取り込み、通電終了、電極槽液の交換の全過程のタイミングをマイクロコンピュータで制御する方式の装置である。泳動管は、内壁をH PMCで被覆したP F E P細管(0.5mm I.D x 230mm long)を用いた。

電気泳動： 演者らがこれまで行ってきたタンパク質の等速電気泳動の条件をそのまま用いた。すなわち、先行液は、5mM HCl - 10mM 2-amino-2-methyl-1-propanol、終末液は、50mM Tranexamic acid - 15mM KOHを用いた。泳動は、150 μ A 定電流で約5分間初期泳動を行った後、50 μ A 定電流で計16分間泳動を行った。核酸の検出は、254nmのUV検出器により行った。

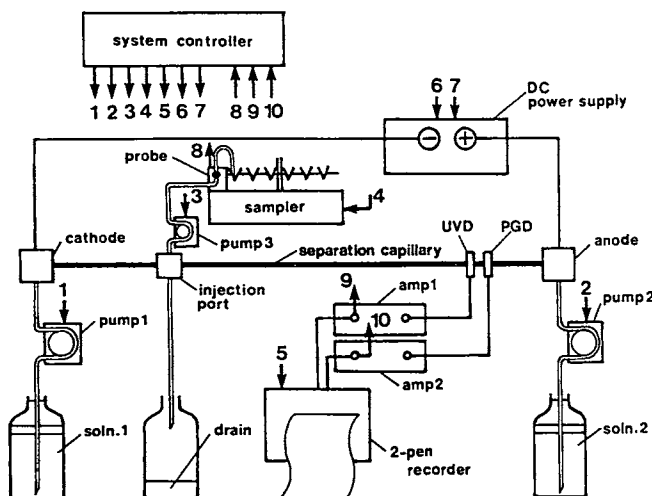


図1 全自動キャピラリー電気泳動装置の模式図

2 μ g / Ampholine

10 p.m.u.s

試料： 核酸塩基類（アデニン、グアニン、ウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン）、アデノシン、アデノシン-5'リン酸（AMP）、ATP、合成一本鎖DNA（25bases、43bases、67bases）、鮭精子DNA、ウシ胸せんDNA、ウシ肝臓RNAを用いた。これらの試料溶液を、両性電解質混合物溶液（0.25% Ampholine(pH 3.5-10) - 0.00625% azide) 400 μ l に最大 20 μ l 混合し試料とした。

結果

本法において、用いた核酸および核酸関連物質は、全てアジドイオンから終末イオンまでの電位勾配値の範囲内に検出され、核酸と核酸関連物質では異なる電位勾配値の範囲内に検出された。その結果をまとめたものを図2に示す。すなわち、核酸塩基は全て、Ampholineによって形成された連続的なpH勾配の範囲内に泳動され、かつ互いに異なる電位勾配の位置に泳動された。また、アデニンとアデノシンは異なる位置に検出され両者の電位勾配値の差から、多くのヌクレオシドもこの範囲内に泳動されると予想された。合成一本鎖DNA 3種類は全て炭酸イオンとAmpholineの境界となる電位勾配の位置に検出された。分子量の大きいDNAおよびRNAは、より移動度が大きく炭酸イオンのゾーンと一部混合ゾーンを形成した。

本法では核酸と核酸関連物質の相互分離が可能であり、特に核酸関連物質については、Ampholineを用いることによって単一のUV吸収ピークに相互分離することができた。また核酸については、分子量の大きさの違いによってある程度分離することができたが、さらに分離するためには、核酸分離のための条件の検討が必要であった。

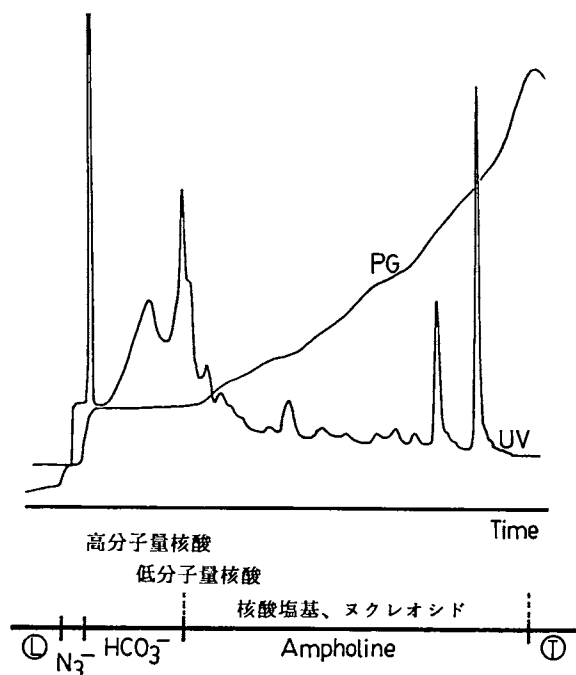


図2 鮭精子DNAの等速電気泳動図

*UV吸収記録と電位勾配(PG)記録を対応づけて示してある。

(広島大工)○前田善治、広川健、木曾義之

1. 比較的多量の試料を連続して分取する free-flow の電気泳動装置は種々報告されている¹⁾。今回我々は100%カウンターフローによる2次元の等速電気泳動装置のプロトタイプを製作した。従来カウンターフロー率を上げると細管中でも分離パターンがかなり乱れるとされているが、溶液の粘度を上げ、分取位置をモニターして電源電圧を自動制御する事により良好な分取結果を得ることができたので報告する。

2. 装置の概略図を図-1に示した。

2. 1. 装置本体

本装置は分離槽(板厚1mmのガラス製、110mm x 200mm、間隔0.5mm)およびリーディング電解液槽、ターミナル電解液槽からなっている。分離槽と電解液槽はセロファン膜で隔たれている。分離槽下部には分取用細管94本(1mm x 0.5mm、PTFE)を密着して並べている。

本装置は試料ゾーンの位置をモニターする走査型位置検出器を備えている。これは可視光源、検出器を一体とし、交流モーターのリニアヘッドに装着したもので、検出器の信号を25秒毎にマイクロコンピュータに取り込み、界面位置を算出し、結果を高電圧電源にフィードバックして泳動ゾーンが定位置で分取されるように自動制御した。典型的な実験例において、電源電圧は500V、電流は7mAであった。運転が定常状態になるとこれらの値はあまり変化しない。

2. 2. 電解液系、注入

使用したリーディング電解液(L)は10mM HClで、緩衝剤としてβアラニンを使用しpH=3.6に調整した。ターミナル液(T)としては10mM カブロン酸を使用した。LおよびT液にはイオン交換樹脂により精製したHPC1%を添加した。この装置ではHPCは単に分離ゾーンに対する熱対流の影響、カウンターフローの影響を抑えるだけでなく、分離槽滞留時間調節の役目も果たしている。

装置運転中、L及びT液はベリスタポンプにより共にわずかずつ注入排出し(0.6ml/分)できるだけ電解液の組成が一定に保たれるようにした。

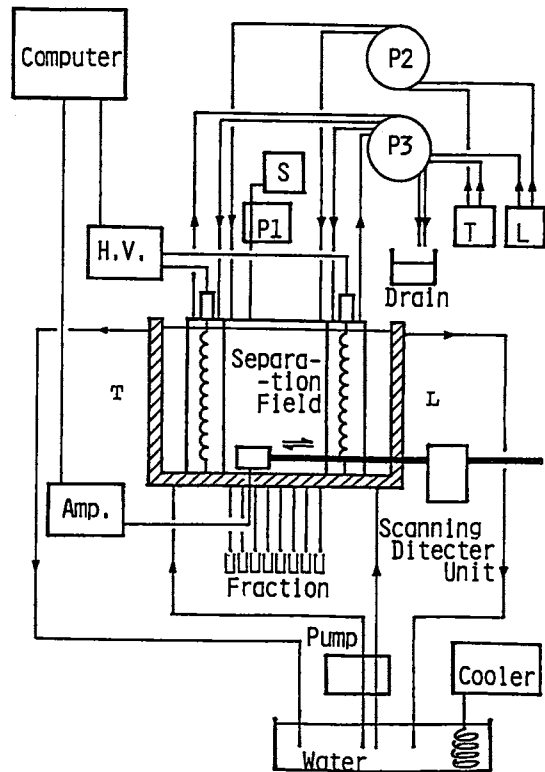


図-1 装置概略図

- | | | | | | |
|--------|---|------------|---|---|---------|
| P1 | ; | ブランジャーポンプ | S | ; | 試料 |
| P2, P3 | ; | ベリスタポンプ | L | ; | リーディング液 |
| H.V. | ; | 高圧電源 | T | ; | ターミナル液 |
| Amp. | ; | オペレーションアンプ | | | |

まえだ よしはる、ひろかわ たけし、きそ よしゆき

電気泳動

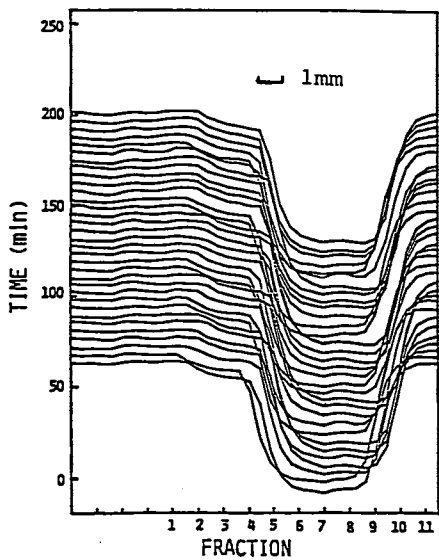


図-2 約4分毎の可視スペクトルの推移

2. 3. 試料の注入

試料はSPADNSとピクリン酸の混合液（各2 mM）とし、毎分95 μ lの速度で泳動槽上部に注入した。

3. 結果

本装置の走査型位置検出器を使用して得られた可視スペクトルを図-2に示した。これらは分取開始より連続5時間の運転時に得られたもので、約4分毎のパターンである。試料ゾーンの位置及び幅の変動は ± 1 mmに納まっている（分取用細管の1.5本分）。本装置を使用して得られた分取液（総計約37 ml）を各フラクション毎に等速電気泳動法により分析して得られた試料濃度を図-3に示した。等速電気泳動法のシミュレーションの結果によるとピクリン酸およびSPADNSの濃度はそれぞれ6.3 mM、2.9 mMで実測結果はこれらに誤差範囲で一致したことから、試料が等速電気泳動平衡に達している事が確認された。

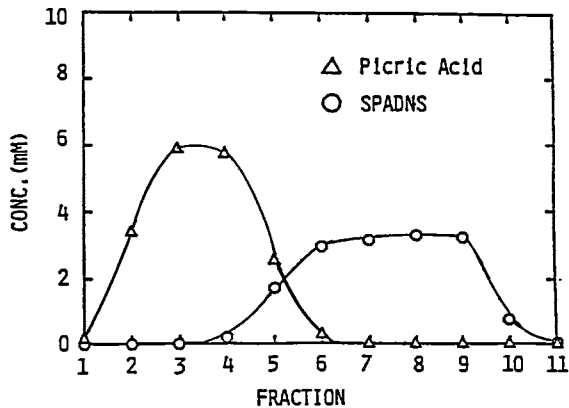


図-3 各フラクションにおける濃度

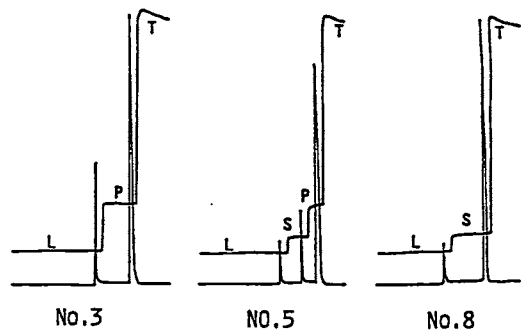


図-4 イソタコフェログラム

試料の総処理量は約110 μ molで、毎分約370 nmolが分離できた事になる。回収率はピクリン酸96%、SPADNS96%、試料の混合が見られたフラクションNo. 2、4、5、6、10を除くと各30%、61%であった。フラクションNo. 3、5、8のイソタコフェログラムを図-4に示した。図-3、4より明らかなように分離は良好であり、本実験で使用した試料については100%カウンターフローでも十分実用的な分取が行えることが明らかになった。

文献

1) 例えばZ. Prusik、J. Chromatogr.、91(1974)867.

エスカー

Samples on Polycarbonate thin layer

12 IP-PIXE法によるYBCO超電導体の分析

(広島大工) 池田浩美、木村剛二、広川健、西山文隆、木曾義之

1. 第6回等速電気泳動シンポジウムで演者らは新しいタイプの分取装置について報告した¹⁾。報告した装置では分離した試料ゾーン全体を微量の液滴として分取できるため回収率が良くまた分取した液滴はそのまま他の分析法の試料とする事ができる。一方PIXE法は加速したプロトンなどを試料に照射し内殻電離により発生する特性X線のスペクトルを解析して定性、定量を行う分析法である。非破壊で微量分析が可能であるという利点があるが、X線分析で常に問題となる吸収効果などの影響により分析精度の点でやや劣る事は否定できない。特にYBCO超電導体の場合、Y、Ba、Cuの特性X線は4KeV~16KeVの広い領域に現れ、特にBaのX線エネルギーが低いため共存元素により減衰しやすい。このような場合、減衰量を計算で見積る事になるが、精度の高い補正は難しい事が多く、何等かの前処理により試料が分離してあると都合がよい。今回分取前の試料と分取後の試料についてPIXE法の結果を比較したところ、特にBaの定量についてかなり異なる結果を得た。また分取した試料についてのPIXE分析の結果はIP分析の結果とよく一致したので報告する。

2. 図-1に分取用IP装置の概略図を示した。試料が大量の場合はinj1より、比較的小量の場合はinj2より注入する。分離された試料は、微量シリンジポンプによるリーディング電解液のカウンターフローによりB3部で、ターゲットホルダー上に滴下させる(一滴約6 μ l)。カウンターフローの線速度は等速電気泳動速度の約4倍(約11 μ l/分)、泳動電流は150 μ Aとした。試料注入から分取終了までに要する時間は約45分であった。使用したリーディング電解液(L)は19mMNH₄OH(KOH1mMを含む)で、緩衝剤として酢酸を使用しpH=4.8に調製した。KはPIXEスペクトルにおいて極めて感度が高いため、多すぎると測定器系の妨害になる事がある。このため移動度がほぼ同じで、PIXEでは検出できないNH₄⁺イオンで希釈している。なおターミナル液(T)としては10mM塩酸カルニチンを使用した。

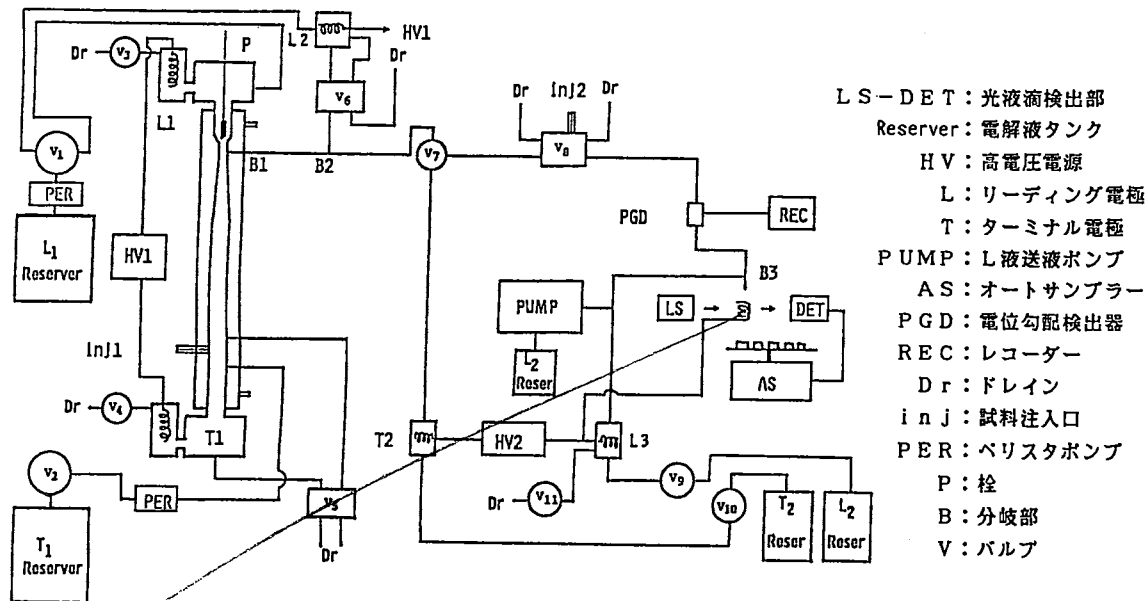


図-1 分取用IP装置の概略図

○いけだ ひろみ・きむら ごうじ・ひろかわ たけし・にしやま ふみたか・きそ よしゆき

≒ Loading potential
~ 10KV

試料のYBCOは電総研よりいただいた。文献2)の方法により溶解させた後分取開始のマーカとしてアストラゾンピンクを微量加えた。分取した試料はそのままデシケター中で乾燥させ、PIXE分析のターゲットとした。PIXE分析には本学工学部のVan de Graaf型加速器(日新ハイボルテージ製AN-2500型)を使用した。

3. 試料12.9 μg / 5 μl を分離分取した。分取直前のイソトコフェログラムを図-2に、分取した試料をPIXE分析した結果、およびカウンターフロー中のKの分析結果を図-3に示した。図-3より明らかなように本法では原理上隣あった試料の混合を避けることはできないが(No. 8, 10)、他のフラクションについてはほぼ純粋な成分が分取できている。またフラクション毎の分取精度も良く例えばCuではNo. 11~15の偏差は2.8%、Kについては2.1%であった。なおこの実験ではフラクション総数は17であったが、カウンターフローの速度を調整することにより更に高分離能の分取を行なう事も可能である。

表-1にIP法、PIXE法、IP-PIXE法の分析結果を示した。表-1より明らかなようにIP法とIP-PIXE法の結果は良く一致しているが、PIXE法の結果は特にBaが過小評価されており、注意が必要であることがわかる。

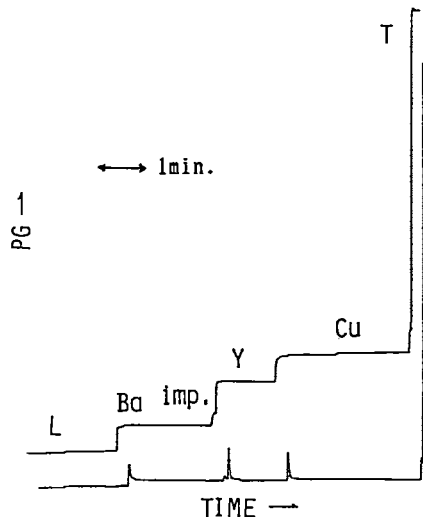


図-2 分取直前のイソトコフェログラム
(imp. = L液中の不純物Na)

表-1 各法による組成比分析の結果

	Y	: Ba	: Cu
PIXE法	0.992 ± 0.03	1.79 ± 0.01	3
IP法	1.09 ± 0.01	2.15 ± 0.03	3
IP-PIXE法	1.04	2.13	3

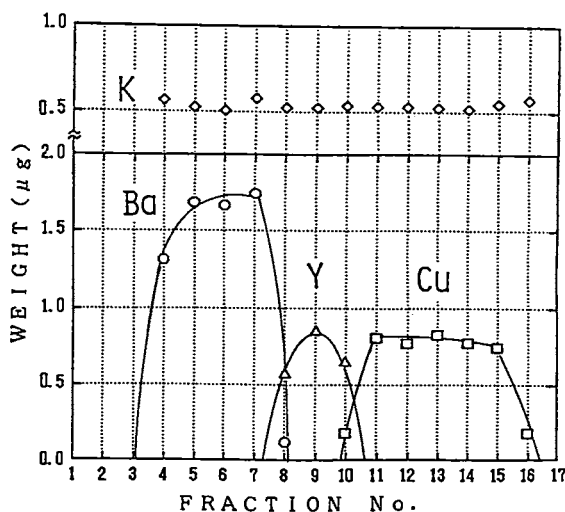


図-3 分取結果-各フラクションの組成

文献

- 1) 広川健、西山文隆、岩本一範、木村剛二、三好辰男、木曾義之、第6回細管・等速電気泳動シンポジウム(名古屋、1986)。
- 2) 金子啓二、金子浩子、第7回細管・等速電気泳動シンポジウム(東京、1987)。

13 細管式等速電気泳動法による鉄(Ⅲ)イオンの分析

備島津製作所 応用技術部

日根 隆

1. はじめに

金属イオンは有機酸などと共に、細管式等速電気泳動装置(CITP)が開発された当初から格好の試料として検討がなされてきた¹⁾。CITPによる金属イオンの主な分析法としては、陽イオンとして直接分析する方法と、分析する前にあらかじめ金属キレート形成させ陰イオンとして分析する方法とが試みられている。前者の手段としては、金属イオンと弱い錯体を形成する有機酸をリーディング電解液のカウンターイオンとして用いたり²⁾、リーディング電解液の溶媒の種類を換えるなど³⁾して金属イオン同士の分離がなされている。後者は、試料にEDTAなどのキレート化剤をあらかじめ添加しておき、金属キレートに変えて分析する⁴⁾方法が報告されている。

鉄イオンについて見れば、鉄(Ⅱ)イオンは前述のいずれの手段によっても分析が可能であるが、鉄(Ⅲ)イオンは水溶液中では水和物を形成しやすく移動度が極端に小さくなり、陽イオンとして直接検出することが困難である。このため分析する前に、鉄(Ⅱ)イオンに還元させたり、あるいはキレート化剤を添加して陰イオンである鉄キレート錯体を形成させて分析するのが一般的である。しかしながら、これらのいずれの方法も分析前に処理が必要なこと、鉄(Ⅲ)イオンの濃度によって添加する試薬量が定まらないなどの問題点があった。

今回これらの問題を解決するために、あらかじめ鉄(Ⅲ)イオンと強い錯体を作るキレート化剤をターミナル電解液に添加しておく方法<条件1>と、鉄(Ⅲ)イオンを鉄(Ⅱ)イオンに還元することのできる還元剤をリーディング電解液に添加しておく方法<条件2>の二条件について検討をおこなった。その結果、鉄(Ⅲ)イオンを前処理なく直接CITPに導入し検出することができた。

2. 実験

装置は島津細管式等速電気泳動装置：IP-3A型、データ処理装置：ITP-R5A型を用いた。検出器はPGDとUVD(波長254nm)を使用した。泳動チューブは内径0.7mm、長さ80mm(PTFE製)と内径0.5mm、長さ160mm(FEP製)とを直列に接続した。

<条件1> リーディング電解液は10mMヒスチジン-塩酸塩水溶液、ターミナル電解液は10mMn-カプロン酸ナトリウム水溶液にEDTA・2ナトリウムを添加して使用した。鉄(Ⅲ)イオンは陰イオンに変えて泳動させた。

<条件2> リーディング電解液に10mM水酸化カリウム、アスコルビン酸(pH5.2)水溶液、ターミナル電解液に10mMアスコルビン酸水溶液を選択した。鉄(Ⅲ)イオンは陽イオンとして泳動させた。

試料は塩化第一鉄、塩化第二鉄水溶液およびEDTA・鉄標準溶液を用いた。

ひね たかし

3. 結果および考察

<条件1> 注入された鉄(Ⅲ)イオンは、移動度が小さいためほとんど泳動せずに試料注入口付近にとどまっている。一方、ターミナル電解液に添加されているEDTAは、鉄(Ⅲ)イオンのゾーンに向かって泳動する。このとき鉄(Ⅲ)イオンはEDTA・鉄となり、陰イオンとして泳動するようになる。EDTA・鉄はターミナルイオンのn-カプロン酸イオンよりも十分移動度が大きいので、等速泳動し検出される。

ターミナル電解液に0.6mMのEDTA・2ナトリウムを加えたときのブランク泳動図を図1に、この条件下で1μgの鉄(Ⅲ)イオンを分析した結果を図2に示した。検量線は、0.1~1.0μgまで良好な直線性が得られ、EDTA・鉄標準試料とも相関を得た。

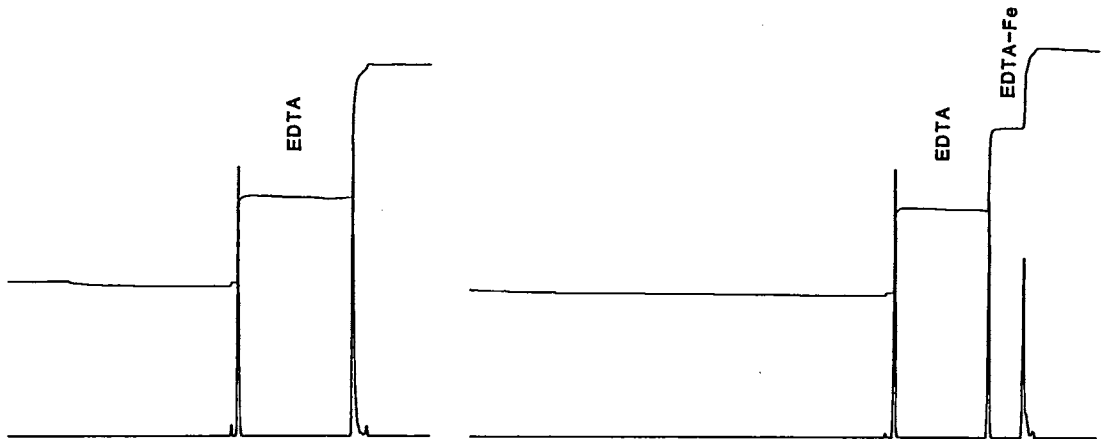


図1 ブランク泳動図

図2 鉄(Ⅲ)イオンの泳動図

<条件2> 注入された鉄(Ⅲ)イオンは、アスコルビン酸の還元力によって鉄(Ⅱ)イオンに還元される。このため、試料中の鉄(Ⅲ)イオンと鉄(Ⅱ)イオンの総量を同時に分析することができる。図3にブランク泳動図を、図4に0.5μgの鉄(Ⅲ)イオンの泳動図を示した。

以上二条件の検討の結果、極性を切替えず、陰イオンの影響が少ない<条件2>の方が、実試料への適用が容易であった。

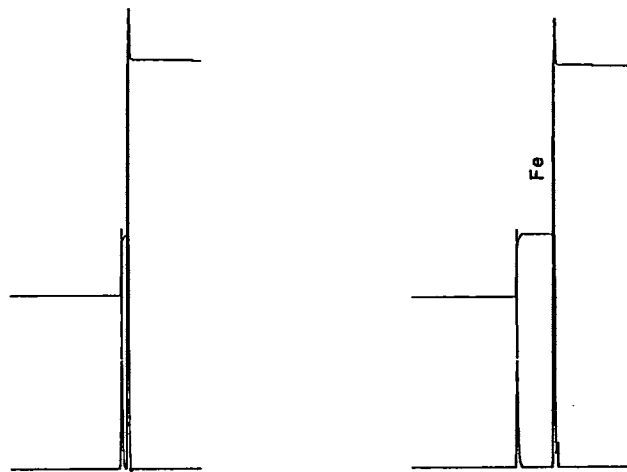


図3 ブランク泳動図

図4 鉄(Ⅲ)イオンの泳動図

◇◇参考文献◇◇

- 1) J. L. Beckers, F. M. Everaerts: J. Chromatogr., 68, 207, (1972)
- 2) I. Nukatsuka, M. Taga & H. Yoshida: J. Chromatogr., 205, 95, (1981)
- 3) J. L. Beckers, F. M. Everaerts: J. Chromatogr., 51, 339, (1970)
- 4) 福士恵一, 日色和夫: 島津科学器械ニュース, 27, [3], 7, (1986)

14 等速電気泳動法による合金めっき皮膜中のリンの定量

島津・応技 ○児嶋佳世子, 旭化成・KS交換膜 田中哲郎
京都市工試 篠原長政

1. はじめに Ni-PやCo-Pの合金めっき皮膜は機能性皮膜として幅広い分野で用いられている。この無電解Ni-P合金めっきは皮膜中のP含有率による結晶構造の変化に対応して、引張強さ、延性、内部応力なども変化する¹⁾。また、次亜リン酸を還元剤とする無電解CoめっきではP含有率により磁気特性が変化する²⁾。

これまでめっき皮膜中のP含有率については主として、ISO/TC 107/SC 3 Document No. 110の方法で測定されてきたが、この方法は処理が繁雑で時間がかかる上に再現性が良くない。その他、蛍光X線分析法などの機器分析もあるが、めっき皮膜の状態によっては分析精度に問題のあることが多い³⁾。

そこで、これまでめっき浴分析に用いられてきた等速電気泳動法⁴⁾⁻⁷⁾を用いて、めっき皮膜溶解物中のPの含有率測定を検討した。なお、一部の皮膜についてはISO法ならびに蛍光X線法との比較検討も行った。

2. 実験 ①装置：島津キャピラリー等速電気泳動分析装置IP-3AD, 検出器：PGD, 脱塩装置：旭化成卓上型脱塩装置マイクロアシライザーG-1100, アシプレックスカートリッジ：AC-110-10 ②めっき液：無電解Ni次亜リン酸浴, 無電解Co次亜リン酸浴, 無電解Ni-Mo次亜リン酸浴, 電気Ni-P浴(ワット浴に並リン酸添加浴) ③無電解めっき条件：Al, Pt並びにポリエステル布, 綿布, ろ紙に超分散パラジウムコロイドを付与したものを60℃(Ni)もしくは90℃(Co)で30分間めっき ④電気めっき条件：Ptに電流密度500A/m², 室温で30分間めっき ⑤皮膜処理法：ISO法に従い, 40% HNO₃で煮沸溶解後, 0.1N KMnO₄で煮沸酸化。過剰のMnO₄⁻を亜硝酸で還元したものを。

3. 結果, 考察 皮膜処理によりNO₃⁻が多量に混入し, 直接IPで分析すると移動度の大きなNO₃⁻のために多大の分析時間を必要とする。そこで脱塩装置を用いて電気透析によりこのNO₃⁻の大部分を除いた。4V定電圧の脱塩において最終設定電流値を0.25Aにしたとき, 硝酸は95%脱塩され, リン酸は85%回収できることがわかった。処理液5mlの脱塩所要時間は20分であった。

Ni-Mo-P合金めっき皮膜抽出物中のPO₄³⁻, MoO₄²⁻分析のイソタクフエログラムを図1に示す。また, 無電解Ni-Pめっき皮膜中のP定量結果をISO容量法(リンモリブデン酸アンモニウムを形成, フェノールフタレインを指示薬として過剰の水酸化ナトリウムを塩酸で逆滴定)と比較して表に示す。このときのIP法の分析時間は試料処理を含めて約1時間, 繰り返し

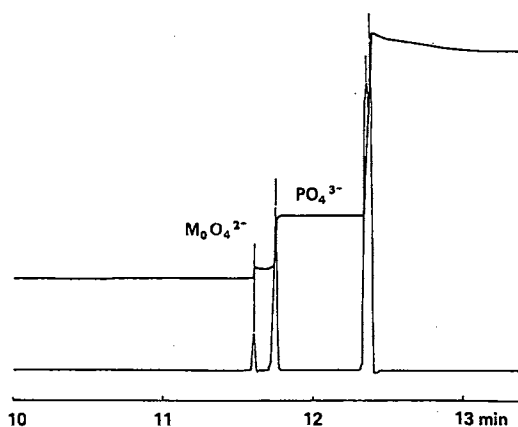


図1 Ni-Mo-P皮膜処理液泳動図

し再現性はC.V.0.8 - 1.5 %となった。ISO法では分析時間約6時間, c.v.5 - 10%となり, IP法が分析時間, 再現性共に優れていることがわかった。

錯化剤の異なるCo-Pめっきの浴中次亜リン酸濃度と皮膜中P濃度の関係を図2に示すが, P含有率に関しては有機酸の種類に無関係であった。なお, 脱塩時のPの回収率は主成分金属によらず一定であった。

Ni-B合金めっき皮膜についてもP同様の処理を行い, 等速電気泳動法でB含有率を調べた。なお, このときの脱塩装置のホウ酸回収率は約70%であった。

以上より, 脱塩装置と組み合わせることによってIPでめっき皮膜中Pが精度良く定量できることがわかった。

表 Ni-P皮膜中P濃度定量結果

次亜リン酸 ナトリウム (g/L)	P含有率 (%)	
	IP	ISO
5 (Al)	3.07	3.42
10 (Al)	11.98	11.27
15 (Al)	13.60	13.93
25 (Al)	16.13	15.87
<hr/>		
10 (Pt)	9.53	9.91
<hr/>		
10 (ろ紙)	10.19	9.75
10 (綿布)	9.23	10.38
10 (ポリエステル)	7.23	7.82
15 (ポリエステル)	8.13	8.25

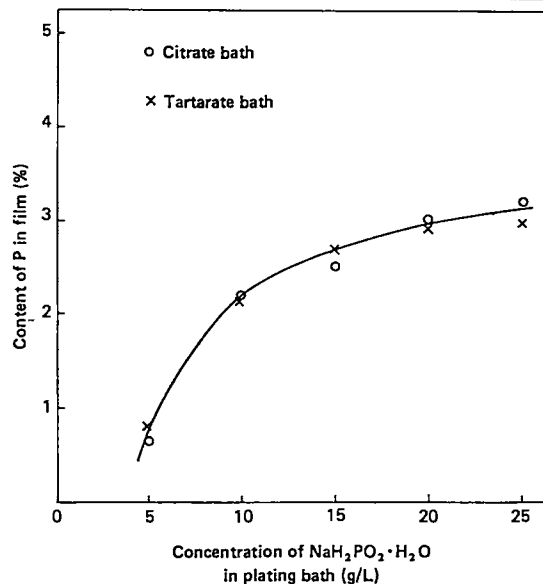


図2 Co-P浴中次亜リン酸濃度と皮膜中P濃度

謝辞

本研究を遂行するに際し, 超分散パラジウムコロイドを供与して頂きました戸田工業株式会社創造部研究開発の堀石七生部長に深く感謝致します。

4. 文献

- 1) W.H.Safraneck; The Properties of Electrodeposited Metal and Alloys p.463, American Elsevier Publishing Co.Inc., New York(1974)
- 2) M.G.Miksic; J.Electrochem.Soc., 113, 360(1966)
- 3) 中山郁雄, 松井富士夫; 金属表面技術協会第77回講演要旨集, p.262(1988)
- 4) 児嶋佳世子, 八木孝夫; 金属表面技術, 36, 104(1985)
- 5) 児嶋佳世子, 八木孝夫, 篠原長政; 金属表面技術, 37, 195(1986)
- 6) 児嶋佳世子, 篠原長政; 日本分析化学会第35年会講演要旨集, p.745(1987)
- 7) 児嶋佳世子; 金属表面技術, 38, 544(1987)

こじま かよこ, たなか てつろう, しのはら ながまさ

15 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分離同定

共立女子短期大学
昭和女子大学

○津田 淑江
福場 博保

従来、アントシアニンの分離分析には、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各種の方法が用いられてきた。しかしアントシアニンそれ自身の不安定性から分離は著しく困難であり確実に分離できる方法は見出されていない。近年、平岡らは細管式等速電気泳動法(I.P.法)が、植物中のフラボノイドの検出に有効な手段であることを報告している。そこで本研究において、アントシアニン及びアントシアニジンの検出及び分離、同定に、本法が利用できるか否かについて検討を試みた。そのため標準色素の他、小豆、黒大豆、赤シソの葉、赤カブ等の食品から色素を抽出し、これら試料中のアントシアニン成分のI.P.法による検索を試みた。

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外部吸収検出器を用いて実験を行った。各化合物の同定にはPU値(Potential unit value)および R_E 値(Relative potential gradient)を計算し用いた。

試料 デルフィニジン、シアニジン、ペラルゴニジン、クリサンテミン(シアニジン-3-モノグリコシド)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年度産エリモ小豆を、黒大豆、赤シソの葉、赤カブは市販品を試料とした。

結果及び考察

1) 島津細管式等速電気泳動を用いアントシアニン、アントシアニジンの分離定性を行った結果、リーディング液:0.01 N 塩酸+0.5%トリトンX100、ターミナル液:0.01 N トリス定電流 100 μ A で陽イオンとして泳動した場合シャープなピークとして分離できた。しかし、単体の場合はシャープなピークとして現われたが、デルフィニジン、シアニジン、ペ

Table 1

Effect of $AlCl_3$ on R_E

Leading electrolyte	R_E values		
	Tri*	p**	m***
10 mM $AlCl_3$ (pH 3.9)	----	8.39	5.04
10 mM HCl-S-alanine (pH 3.9)****	4.71	1.98	3.69

* 3,4,5-trihydroxybenzoic acid
** p-hydroxybenzoic acid
*** m-hydroxybenzoic acid
**** R_E values for this case were obtained by computer simulation

Table 2

An operation condition for analysis of anthocyanins

Leading solution	
Leading ion	; Na^+
Concentration	; 10 mM.
pH	; 2.3
Terminal solution	
Cation	; Tris
Concentration	; 10 mM
Electrocurrent	; 100 μ A
Additive	; 0.2 % Triton X-100
	; 0.5 mM $AlCl_3$
Capillary tube	; 0.5 mm ϕ , 20 cm
Controlled temperature	
	; 20 $^{\circ}C$

つだ としえ、ふくば ひろやす

ラルゴニジンのPU値は非常に接近しており相互に分離することは出来なかった。

2) 食品からのアントシアニン抽出法について検討を行い1%塩酸-メタノールを用いた場合にはH⁺量の増大からアントシアニンピーク出現がやや遅くなるが、0.01%塩酸-メタノール液の場合と比較し泳動に大きな影響のないことが確かめられた。

3) PU値の非常に接近した試料イオンと金属イオンとの錯体を形成させ、その錯体形成能の差を利用して、試料イオンの実行移動度を变化させて分離させることを試みた。

まず予備実験として、これらのアントシアニンに含まれているオキシ安息香酸(メタ、バラ、トリ)をモデル化合物として用いた。なお、この場合は陰イオンとして泳動を行った。アルミニウムイオンをキレート剤とする10mM塩化アルミニウム(pH_L 3.9)をリーディング液とし、この液を用いた時のR_E値を求めた。一方比較としてキレート剤を含まないpH_L 3.9の塩酸-β-アラニンを用いた時のR_E値を、コンピューターシミュレーションで算出した。その結果Table 1のような値を示し、メター、バラ、トリーヒドロキシ安息香酸のR_E値はシミュレーションで得られたキレート剤無添加の値より塩化アルミニウムで行った場合の値の方が大きくなり、トリーヒドロキシ安息香酸においては移動度はターミナル液よりも小さくなり、明らかにアルミニウムがキレート剤として働き移動度を变化させた。このことはデルフィニジン、シアニジン、ペラルゴニジンのようにOH基の位置や数の異なる化合物においても錯体を利用すれば分離が可能となることが推測された。そこで錯体効果を利用してアントシアニンを陽イオンとして泳動を行なうことにした。キレート剤としてアルミニウムイオンを使用し、リーディングイオン、リーディング液のpHを検討した。その結果Table 2に示すような条件において最も良い結果を得ることが出来た。本条件による各アントシアニン及びアントシアニジンの泳動図をFig.1に示した。以上のようにアルミニウムイオンの存在によりデルフィニジン、シアニジン、ペラルゴニジンの移動度を变化させることができ、PU値間に差が生じ、相互分離が可能となることを確かめた。

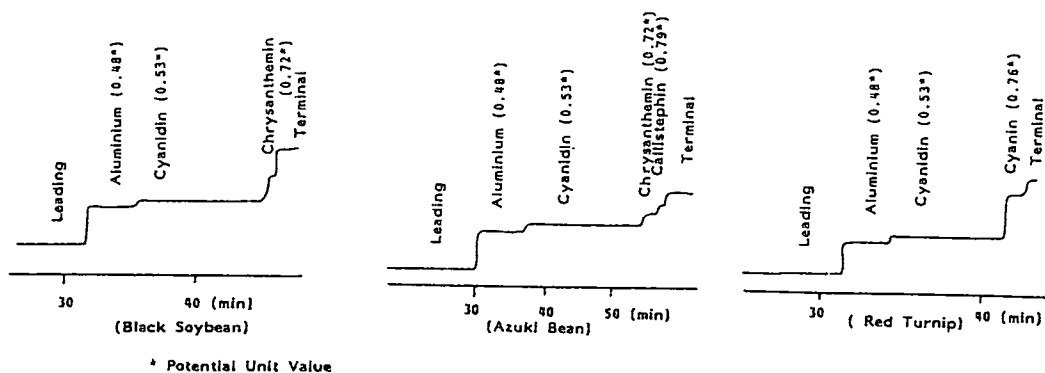


Fig.1 Isotachoelectrophoretic separations of anthocyanins and anthocyanidins from various sources.

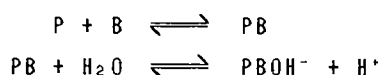
16 カテコール誘導体の細管等速電気泳動

(北大理) ○金田 隆, 田中俊逸, 吉田仁志

【緒言】等速電気泳動法における分離能の改善のため、演者らはターミナルイオンとの錯形成反応を用いる手法について報告してきた。この方法では、試料として注入した金属イオンが配位子であるターミナルイオンとの反応により負電荷をもつ金属錯体に変換され、陰イオンとして泳動する。泳動系内でのこのような化学種の変換反応を利用するとき、中性分子についてもその泳動分離が可能であると思われる。そこで今回、中性pH領域で電荷をもたないカテコール類、及びその類似化合物を対象とし、ターミナルイオンとしてホウ酸を用い、これとの錯形成反応を用いる等速電気泳動法について検討した。

【実験】装置には電位勾配検出器を備えた島津細管式等速電気泳動装置IP-1Bを用いた。分離カラムはプレカラム(1mm I.D.X40mm)とメインカラム(0.5mm I.D.X150mm)からなる。リーディング液には塩酸-トリス緩衝溶液を用い、ターミナルイオンとしてホウ酸あるいはヒスチジンをを用いた。リーディング液のpHは7.5から9.0とした。対象としたカテコール類をFig.1にその構造とともに示す。

【結果と考察】炭水化物やカテコールのようないくつものヒドロキシル基をもつある種のポリオール類は中性pH領域では中性化学種として存在する。これらを等速電気泳動法により分離するためにはヒドロキシル基の解離のために泳動系をアルカリ性とする必要がある。しかし、カウンターイオンとしてアンモニウムイオンを用いpH 9~11とした泳動系では、リーディングイオンとターミナルイオンの移動度の差が小さくカテコール類の分離は困難であった。一方、ポリオール類は次のようにホウ酸と錯形成すること、その錯体が水溶液中で酸として働き負電荷をもつことが知られている。



そこで、ターミナルイオンにホウ酸を用い上記の反応を泳動系内で行わせたと、中性のカテコール類を陰イオンとして泳動することができた。

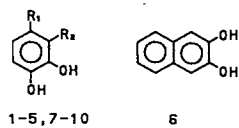
Fig.2はリーディング液のpHを7.5とし、ターミナルイオンとしてホウ酸ではなくヒスチジンをを用いたときのカテコール類のイソタクソグラムである。この泳動系においてFig.1のカテコール類のうち2,3はそれがもつカルボキシル基の、また1,4,5,7はヒドロキシル基の解離により陰イオンとなっているため検出できたものと思われる。しかし、6,8,9,10の化合物は検出されなかった。これらはこのpHにおいて中性分子として存在するためと思われる。

これに対して、pH 7.5においてターミナルイオンにホウ酸を用いたときにはFig.3に示すように、Fig.1の10種のカテコール類のうちピロカテコールとピロガロールは混合ゾー

かねたたかし、たなかしゅんいつ、よしだひとし

ンを形成し分離できなかったが、これを含めてすべてが検出できた。この結果は中性のカテコール類がターミナルイオンであるホウ酸との錯形成により陰イオンとして泳動できることを示すものである。Fig.4はターミナルイオンにホウ酸を用い、リーディング液のpHを変化させたときのカテコール-ホウ酸錯体の実効移動度の変化を示したものである。pHの増加とともにターミナルイオンのホウ酸およびカテコール-ホウ酸錯体の実効移動度はいずれも増大する傾向を示し、それらカテコール-ホウ酸錯体の実効移動度はそれらの安定度定数、解離定数に依存することを示唆している。

Fig.3と同じ条件下においてメタ位、パラ位にヒドロキシル基をもつレゾルシノール、ハイドロキノンについては検出されず、これらの化合物はその構造上ホウ酸と錯体を形成しないためと思われる。また、1,2-シクロヘキサジオール、1,3-シクロヘキサジオールも検出されず、これらについては錯体を形成しないかあるいは錯形成定数が小さいためであると思われる。



1. Hydroxyhydroquinone $R_1=OH, R_2=H$
2. 2,3-Dihydroxybenzoic acid $R_1=H, R_2=COOH$
3. Protocatechuic acid $R_1=COOH, R_2=H$
4. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde $R_1=COH, R_2=H$
5. 2,3-Dihydroxybenzaldehyde $R_1=H, R_2=COH$
6. 2,3-Dihydroxynaphthalene
7. 4-Chlorocatechol $R_1=Cl, R_2=H$
8. Pyrogallol $R_1=H, R_2=OH$
9. Pyrocatechol $R_1=H, R_2=H$
10. Homocatechol $R_1=CH_3, R_2=H$

Fig.1

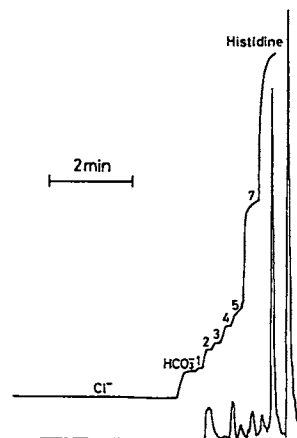


Fig.2

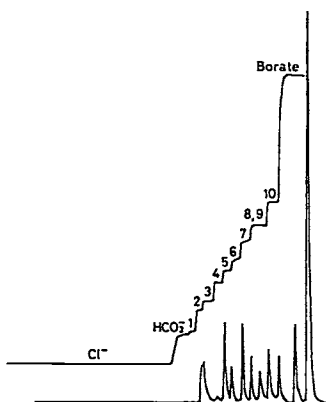


Fig.3

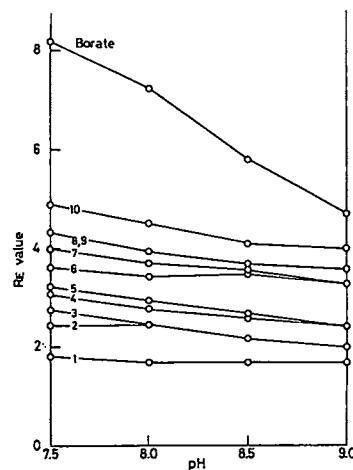


Fig.4

1. はじめに

キャピラリーイソタコフォレシス(CITP)により、テトロンの原料となるテレフタル酸ジメチルのような難水溶性試料に含有される未反応不純物のテレフタル酸、テレフタル酸モノメチルおよびトルイル酸などの陰イオンを分析する場合、以下の条件が必要である。①試料を溶液とする。②不純物をイオンとして解離させる。③電解液中で試料を沈澱させない。④試料溶液の電気抵抗を低くする。これらの条件を満たすには、水に可溶性有機溶媒を用いて試料溶液を調製する。この溶液に電解質水溶液を加えることにより、テレフタル酸ジメチルは、溶解度が減少し沈澱を除去でき、同時に試料溶液の電気抵抗も低下し、通電性が高まるとともに、不純物もイオン化しやすくなると考えられる。しかし、実際にこの種の試料に適した有機溶媒や添加すべき電解質は明らかにされていない。

演者はこの点を鑑み、テレフタル酸ジメチルを試料とし、前処理条件の検討を行い、不純物分析への適用性を見いだしたので報告する。

2. 実験

装置は島津キャピラリー等速電気泳動分析装置：IP-3A形を使用し、検出器に電位勾配検出器(PGD)を用いた。泳動チューブは、内径1.0mm長さ80mm(PTFE製)と内径0.5mm長さ160mm(FEP製)を直列に接続し、泳動電流を100 μ A(9min) \rightarrow 50 μ Aとした。

リーディング液は10mM(L-ヒスチジン・1塩酸/L-ヒスチジン)+アセトン(1+1)を用い、ターミナル液に10mM-カブロン酸ナトリウムを用いた。

試料溶媒はメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトンおよびアセトニトリルを用いた。電解質溶液は10mM(L-ヒスチジン・1塩酸/L-ヒスチジン)、以下10mMのイミダゾール、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリスと略)、エチレンジアミンおよび水酸化ナトリウムの水溶液を用いた。

3. 結果と考察

テレフタル酸ジメチルの溶解度はアセトンの¹⁰⁰4g/Lが最も高く、続いてアセトニトリルの約3g/Lであり、他のアルコール類において0.7g/L以下である。これより、アセトンを溶媒として採用した。また、アセトンはリーディング液溶媒に一部用いており、試料液と電解液のなじみが良い。しかし、不純物のテレフタル酸はアセトンに対する溶解度が約20ppm程度と低く、試料の溶解に加温、攪拌が必要である。

テレフタル酸ジメチルのアセトン溶液を直接分析装置に注入すると、電解液内で沈澱を生じるので、あらかじめ電解質水溶液と混合し、テレフタル酸ジメチルを沈澱させ、遠心分離にて除去する。これより得られた各種電解質溶液の100 μ Lを装置に注入し、100 μ Aで通電したときの両極間の印化電圧の時間経過を図.1に示す。試料溶液を注入せず電解液のみの電圧変化(0)に対して、純水を加えて調製した試料溶液(1)の場合、短時間に電圧が急激上昇し気

やぎ たかお

泡発生を伴い通電不能となる。イミダゾール(2)とトリス(3)は電圧値で2倍近いが8~9min. 経過後、電流値を2分の1にすれば気泡の発生を押さえターミナルイオンが検出できる。一方、塩酸/ヒスチジン(5)は塩化物イオンが含まれているため、長時間を要し実用的でない。また、水酸化ナトリウム(4)においては、電圧上昇に時間を要し、水酸化物イオンの影響と考えがたく、別な陰イオンの存在が予想される。なお、エチレンジアミンはトリスと似通った曲線を示した。

テレフタル酸ジメチルの溶液に不純物を各10ppm宛添加し、電解質種毎の回収率を求めたところ表.1に示す結果を得た。

表.1 回収率 *zone length ratio* (%)

	イミダゾール	トリス	エチレンジアミン	塩酸/ヒスチジン
テレフタル酸	111	119	133	113
テレフタル酸モノメチル	135	220	914	136
トルイル酸	105	105	106	106

イミダゾールと塩酸/ヒスチジンの回収率はよく一致しているが、トリスやエチレンジアミンにおいて、テレフタル酸モノメチルの値が増加している。また、水酸化ナトリウムに至ってはその増加がはげしく数値化できない。これらのことから、電解質種によってはテレフタル酸ジメチルのエステル結合の一部が切れモノ体が生成していると考える。一方、10ppmの不純物溶液では電解質種による差異を認めなかった。以上の電圧、回収率の結果から電解質としてイミダゾールが有効と考えられる。したがって、イミダゾールの回収率で100%を超えた分が試料に含まれる不純物イオンとして、その濃度を求めるとテレフタル酸5.6ppm、テレフタル酸モノメチル17.3ppm、トルイル酸2ppmとなった。

検量線はテレフタル酸において、アセトンに対する溶解度が低いため、0.8 μ g/100 μ L以上で直線からはずれる。しかし、3成分とも実用範囲で良好な直線関係にある。不純物を添加した試料溶液(図.2)による各イオンのゾーン長のくり返し再現性は、変動係数として2.5%以下であった。本実験結果から、有機溶媒にアセトン、添加する電解質にイミダゾールの適していることが判った。

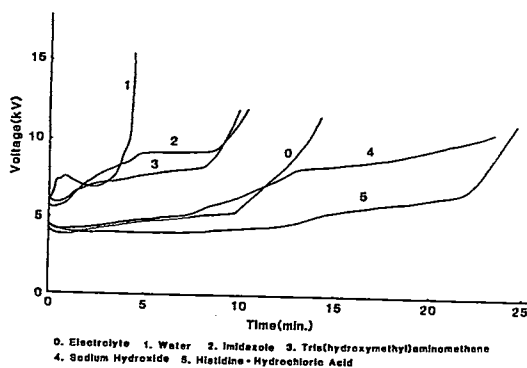


図.1 印加電圧の経時変化

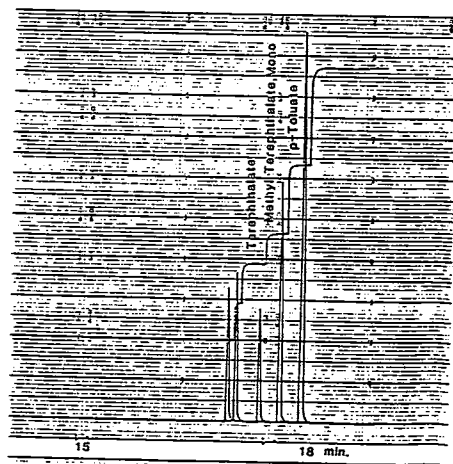


図.2 不純物添加試料のイソタコフェログラム

(九大工) ○竹中繁織・高木 誠

1. 生物学、医療分野で遺伝子解析の手法が一般化し、種個体間の微少な遺伝子の違いや疾患に関する遺伝子の特徴を的確にかつ簡便に検出する手法が強く望まれるようになった。我々は、インターカレータのDNAへの結合の特異性を利用して、微少な塩基配列の差を検出する可能性について検討している。例えば、等速電気泳動法において泳動溶液にインターカレータを添加することによってDNA二重らせん構造の最小単位であるDuplex dimer DNA (例えばGpCとCpG)が配列の違いにより分離できることを明らかにしている¹⁾。

ところで、一般にDNAへのインターカレーションには、荷電と疎水性相互作用の効果が大きい。インターカレーションは本来可逆的な反応であるが、これらの効果が相乗的に働く場合、インターカレータはDNAに強く結合し、ゲル電気泳動においてもDNAはインターカレータと実質上不可逆的に結合した状態で泳動する可能性がある。実際にLoucks²⁾やNielsen³⁾により、天然DNAフラグメントレベルでDNA-インターカレータ複合体がゲル電気泳動法下、同時に泳動することが示されている。しかし、これらの報告では、DNAフラグメントは天然から制限酵素による消化で得たものであるため、DNA-インターカレータ複合体のゲル電気泳動下でのより詳細な検討は困難であった。

今回、我々は、インターカレータのDNA配列認識といった観点から、オリゴヌクレオチドレベル(12mer)で、DNA-インターカレータ複合体のゲル電気泳動の泳動挙動について検討した。

2. 12merオリゴヌクレオチドとしては、自己相補性オリゴヌクレオチドa-dを、ファルマシア製DNA合成装置を用いてシアノエチルアミダイト法により合成した(表1)。オリゴヌクレオチドの融解温度(T_m)曲線の測定は、恒温槽をつけた日立モデル200-20スベクトルメーターにて行った。セル内の温度は直接横川サーモメータモデル2455にて測定した。ゲル電気泳動法は、20%ポリアクリルアミド(アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 30:0.8)のスラブゲルにより、TBM衝緩液(0.1M Tris-borate, 0.005M MgCl₂, pH8.3)

Table 1. Oligomer sequence

Sequence	Duplex structure	GC content %
a dCCGGTTAACCGG	CCGGTTAACCGG GGCCAATTGGCC	67
b dCGCCTATAGGCC	CGCCTATAGGCC GCGGATATCCGC	67
c dCCTTGGCCAAGG	CCTTGGCCAAGG GGAACCGGTTCC	67
d dTTAACCGGTTAA	TTAACCGGTTAA AATTGGCCTTAA	33
e dCCGGCCGGCCGG	CCGGCCGGCCGG GGCCGGCCGGCC	100

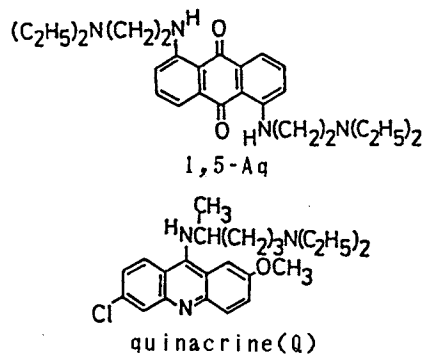


Fig 1. Structure of intercalatoers

たけなか しげおり・たかぎ まこと

を用いて行った。インターカレータによるオリゴヌクレオチドの易動度の変化は、 $r = (m_0 - m) / m$ により整理した (m , m_0 はインターカレータ存在下及び非存在下での易動度を示す)。今回用いたインターカレータの構造を図1に示す。

3. まず自己相補性オリゴヌクレオチドの二重らせんの安定性を調べるために、オリゴヌクレオチドの T_m 曲線の測定を行った(図2)。一般にGC含量に比例して T_m は高くなる。これは、G-C間には水素結合が3本形成されA-T間2本よりも結合が強いためである。図2においても、GC含量の増加に伴って T_m が高くなっていることがうかがわれる。また特に興味深いのは、同じGC含量であっても配列がことなることにより、オリゴヌクレオチド分子鎖間の結合の強さがことなっていることである(T_m の高さ: $e > a > b > c > d$)。

まず、オリゴヌクレオチドのみのゲル電気泳動を二重らせん形成条件下(TBM衝緩液15°C, 図2より)で行った。フラグメントa-dはいずれも同一易動度を示した。一般に変性剤を加えていないポリアクリルアミドゲルは、一本鎖オリゴヌクレオチドの場合、その易動度は塩基の違いに依存することが知られている⁴⁾。これらの事実はa-dがいずれも二重らせん構造を保って泳動していることを示している。しかし、インターカレータである1,5-Aqの添加($[1,5-Aq]/[DNA-P] = 10$)によってオリゴヌクレオチドの易動度の減少が見られた。また、泳動の途中ではインターカレータ色素のバンド(肉眼で検出できる)とオリゴヌクレオチドバンド(エチジウムにより染色して検出)とが一致した。この結果は、オリゴヌクレオチドレベルでも、DNA-インターカレータ複合体が解離することなくゲル中を泳動可能なことを示している。次にGC部位に対する親和性が高いインターカレータであるキナクリンを添加($[キナクリン]/[DNA-P] = 10$)して、易動度の変化を調べた(図3)。この場合いずれも異動度の減少が見られたがこれらの遅れを r を用いて整理すると、GC含量の多いフラグメントほど大きな r 値を示した。これはキナクリンのGC選択性と一致している。また同一GC含量を有する配列異性体でも T_m の大きな値を示すものほど大きな r 値を示した(表2)。これらの結果は二重らせんの安定性の違いにより配列異性体を分離できる可能性を示すと考えられる。

文献

- 1) K. Dohtsu et al., Chem Lett., 1986, 1691; Anal. Sci., 4, 251 (1988).
- 2) E. Louchs et al., Nucleic Acids Res., 6, 1869 (1979).
- 3) P. E. Nielsen et al., Biochemistry, 27, 67 (1988).

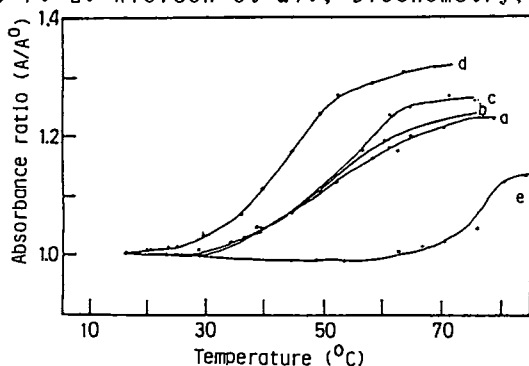


Fig 2. Melting curves of oligonucleotides

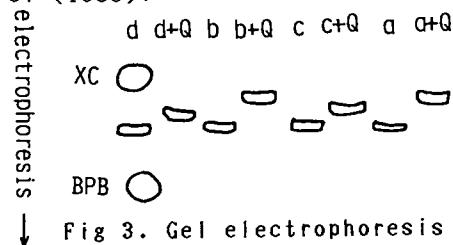


Fig 3. Gel electrophoresis

Table 2. T_m vs. r	
T_m	$a > b > c > d$
r	0.16 0.12 0.09 0.03

19 細管式等速電気泳動法によるペニシリン類と
カナマイシンの反応生成物の推定

(九大病院・薬剤部) 中島 和博、○藤下 修、平川 雅章、
樋口 駿、大坪 健司、青山 敏信

【緒言】

これまで^{1,2)} 演者らは有機系イオン性物質(カルボン酸、アミノ酸、ジペプチド、β-ラクタム系抗生物質)について、その分子量あるいは分子体積と細管式等速電気泳動における定性の指標 h_R あるいは R_E 値(R_E 値は h_R を補正したもの： $h_R = h_S / h_L$, $R_E = h_S + \Delta h / h_L + \Delta h$)との関係を報告してきた。その目的はこれらの定性指標から、有機系イオン性物質の分子量あるいは分子体積を推定するためである。今回は、その応用としてβ-ラクタム系抗生物質の一種であるペニシリン類と、アミノ配糖体系抗生物質の一種であるカナマイシンの反応生成物について、定性指標 h_R から推定する方法を検討した。

【実験】

ペニシリン類の h_R と R_E 値、およびカナマイシンの反応生成物の h_R は次の方法により求めた。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(PGD-1), 泳動電流：100 μ A, 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_L 11.4), 試料：アンピシリン(ABPC, pK₁ 7.24), ベンジルペニシリン(BPC, pKa 2.73), カルペニシリン(CBPC, pK₁ 3.06, pK₂ 3.3), クロキサシリン(MCIPC, pKa 2.73), スルベニシリン(SBPC, pK₁ < 1, pK₂ 2.5-2.7)の各ペニシリン類のNaまたはK塩および硫酸カナマイシン(KM), ペニシリン類の濃度：10mM, カナマイシンの濃度：42mM, pH : 6.4, 反応温度：(1) 35, (2) 70°, 反応時間：(1) 24, (2) 60時間, アンピシリンのみ反応条件(2)。

【計算】

分子体積は既報²⁾のように原子または基の van der Waals volume V_A (Å³/個)の値を加算して計算した。また、それぞれの相関の有意性については相関係数 r を z 変換した後、 t 検定により検定した。

【結果および考察】

[1] ペニシリン類の h_R , R_E 値および分子体積

ペニシリン類の h_R , R_E 値および分子体積は次の表のようになり、それぞれの相関は次式のような良好な結果が得られた (Z は電荷を表す)。

ペニシリン類	$R_E \pm S.D. (N=5)$	$h_R \pm S.D. (N=5)$	V_A (Å ³ /個)	$ Z $
ABPC	4.04 ± 0.09	3.91 ± 0.06	292.56	0.96
BPC	3.67 ± 0.04	3.82 ± 0.08	280.79	1.00
CBPC	1.95 ± 0.14	2.16 ± 0.04	300.63	2.00
MCIPC	—*	4.07 ± 0.04	329.42	1.00
SBPC	1.92 ± 0.02	2.10 ± 0.05	319.59	2.00

* : R_E 値を算出するための酢酸を添加することにより沈澱物を生じた

$$R_E = -0.12 + 0.090 V_A^{2/3} |Z| \quad (r=0.998, N=4)$$

$$h_R = 0.33 + 0.079 V_A^{2/3} |Z| \quad (r=0.997, N=5)$$

calc
in
zone pH
↓
0.98

結合物 →

[2] ペニシリン類とカナマイシンの反応生成物の比率および h_R

ペニシリン類について、分子体積と h_R あるいは R_E 値との間に良好な相関性があることを示したが、反応生成物など未知物質でも同様の相関性があることを示すために、別の方法によって既に報告されている結果³⁾と、細管式等速電気泳動法による結果とが一致することを次に示す。なお、 R_E 値を算出するための酢酸を添加することにより、沈澱物を生じるものもあり、またペニシリン類については R_E 値と h_R との間に有意の差が認められなかったことから、定性の指標として h_R を用いた。表は、ペニシリン類とカナマイシンの反応生成物について、山名ら³⁾の報告した値と実験によって得た結果を示す。ただし PM はペニシリン類とカナマイシンの結合物を表し、PA はペニシリン類の加水分解物を表す。

ペニシリン類	PM		PA		$h_R \pm S.D. (N=5)$	
	文献値 ^{a)}	実験値	文献値 ^{a)}	実験値	PM	PA
ABPC ^{b)}	71	78	29	22	5.98 ± 0.08	2.15 ± 0.05
BPC ^{b)}	36	38	64	62	6.93 ± 0.22	1.90 ± 0.08
CBPC	45	40	55	60	4.32 ± 0.07	1.42 ± 0.10
MCIPC ^{b)}	39	42	61	59	6.65 ± 0.21	2.19 ± 0.09
SBPC	35	34	65	66	4.37 ± 0.24	1.42 ± 0.07

a) : 山名らの報告した生成量の%表示の値³⁾を PM : PA 比で表した

b) : 反応条件 (1) および (2) で 100% PM と PA に変化しなかったため、PM : PA 比で表した

ペニシリン類とカナマイシンの結合物 (PM) と、ペニシリン類の加水分解物 (PA) との生成量の比率は、山名らの報告した値とほぼ一致した。このことからそれぞれの h_R は、PM および PA の分子体積あるいは分子量を示していると言える。ペニシリン類 P_c、PM および PA の各 h_R の値と、それぞれの分子体積との関係は次式および図のようになり、かなり良い相関性を示した。

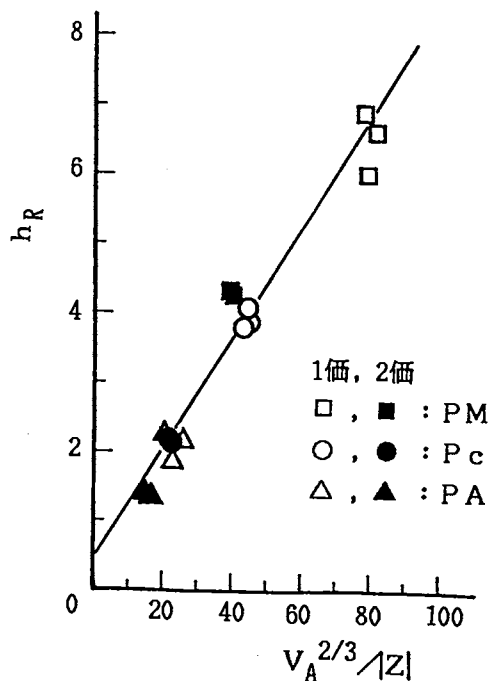
$$h_R = 0.43 + 0.077 V_A^{2/3} / |Z|$$

($r=0.975, N=15$)

従って、電荷が同じならば h_R の順序は反応生成物の分子体積あるいは分子量の大きさの順序を表しており、細管式等速電気泳動のチャート (h_R) から、結合反応物 (PM) か分解反応物 (PA) かの予測が可能である。

【文献】

- 1) Chem. Pharm. Bull., 31, 2134 (1983), *ibid.*, 34, 1344 (1986), *ibid.*, 34, 5026 (1986).
- 2) Chem. Pharm. Bull., 36, 3985 (1988).
- 3) 山名月中ら, 薬剤学, 38, 74, 1978.



徳島文理大・薬 ○佐藤英生、赤田良信

【目的】茵陳蒿は、キク科カワラヨモギ (*Artemisia capillaris* Thunb., Compositae) の根を除いた全草であり、消炎性利尿や利胆薬として、黄疸、伝染性肝炎などに用いられる生薬である。演者らは、茵陳蒿の理化学的品質評価のための分析法として、種々の金属イオンを含む弱酸性から中性領域のリーディング液を用いる細管式等速電気泳動法の適用を試み、茵陳蒿煎液中の既知成分の定量及び未同定アニオン成分のパターン分析を行うことを目的とした。

【実験】装置は、島津製 IP-2A 型細管式等速電気泳動装置を用い、検出器は、PGD-2A 型電位勾配検出器と UVD-10 型紫外吸光検出器 (254 nm) を併用した。泳動管は、プレカラムとして 1.0 mm i.d. x 80 mm (PTFE 製) を、また分析カラムとして 0.5 mm i.d. x 140 mm (FED 製) を使用した。泳動電流は 250 μ A \rightarrow 100 μ A、チャート速度は 20 mm/min で分析した。電解液は、(I) 10 mM HCl, β -Alanine (pH 2.7~3.9) (L 液) - 10 mM Sodium Capronate (T 液)、(II) 10 mM HCl, Creatinine (pH 4.0~5.0) (L 液) - 10 mM MES, Tris. (pH 7.2) (T 液)、(III) 10 mM HCl, Histidine (pH 5.0~6.5) (L 液) - 10 mM MES, Tris. (pH 7.2) (T 液) の 3 種を用い、各 L 液に一定量の金属 (Na, Mg, Ca, Ba, Cd, Mn, Co, Cu, Ni 及び Al) の塩化物を添加した。また、比較のため金属塩無添加の条件においても同様の分析を行った。試料は、3 種の市販茵陳蒿を使用し、常法に従って調製した煎液を遠心分離し、得られた上澄液をそのまま用いた。

【結果及び考察】金属塩無添加の pH 2.7 に調製した電解液 (I) で、各茵陳蒿煎液を分析した結果、煎じることにより水へ移行するアニオン成分のうち、シュウ酸 (約 0.05%)、クエン酸及びリンゴ酸 (約 0.7%) が同定された (Fig. 1)。

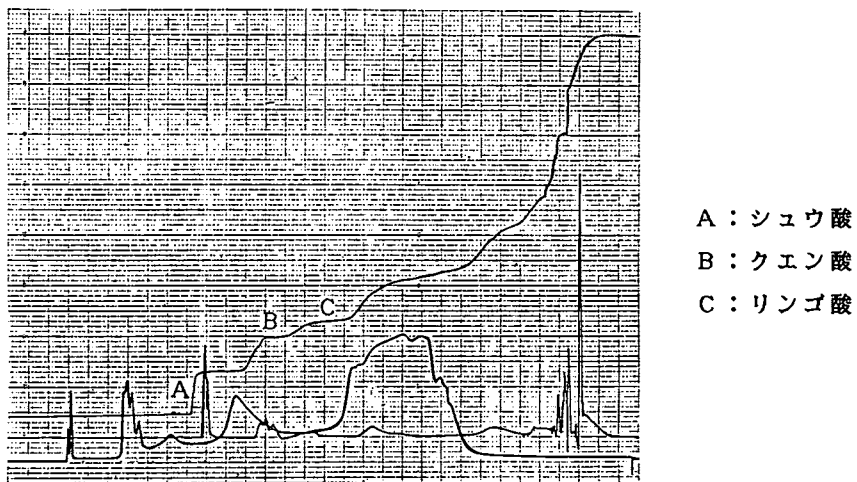
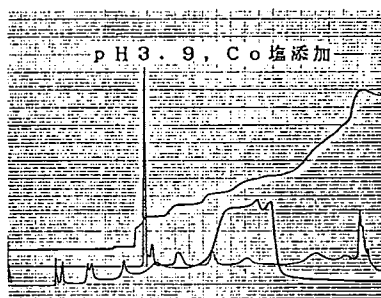
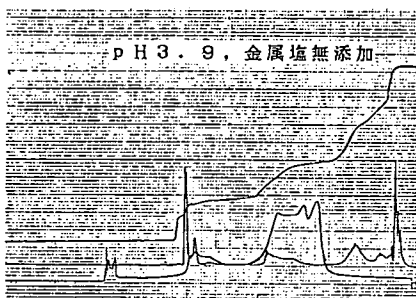


Fig. 1 pH 2.7 に調製した電解液 (I) による茵陳蒿煎液のイソタコフェログラム

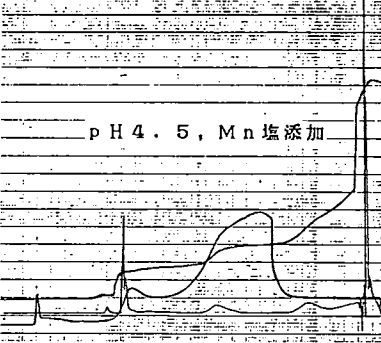
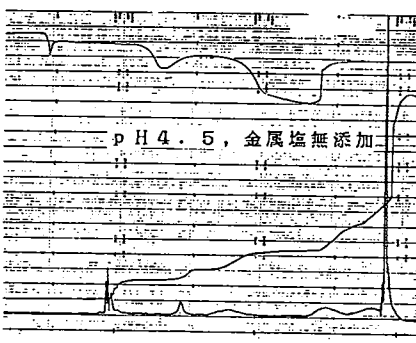
さとう ひでお、あかだ よしのぶ

また、演者らが設定した電解液を用いて分析した結果、茵陳高煎液中には、これらの既知有機酸以外に多数の未同定ゾーンが認められた。これらの既知及び未知成分は、種々の金属塩をリーディング液に添加することより、無添加の場合と比べ、その泳動状態が変化する成分と変化しない成分があり、さらに添加する金属塩の種類により各ゾーンの分離挙動が異なることがわかった。Fig.2 に、各分析条件により得られた茵陳高煎液の特徴的なイソタコフェログラムを示した。この分離挙動の差異をパターン化することにより、アニオン成分を中心とした茵陳高の理化学的品質評価の可能性が示唆された。

電解液 I



電解液 II



電解液 III

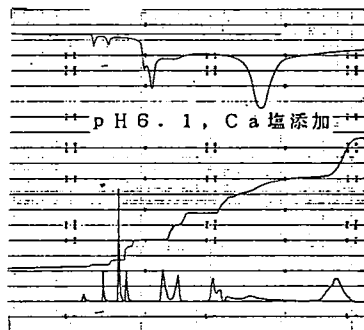
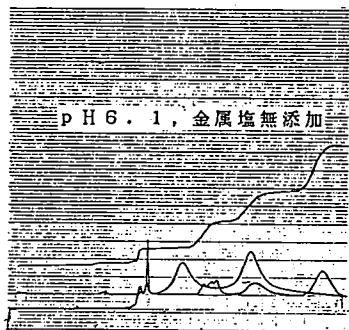


Fig. 2 種々の電解液を用いたときの茵陳高煎液のイソタコフェログラム

特 タンパク質の細管電気泳動 -全自動化とデータ評価-

(都立大・理・化) 真鍋 敬

脳、神経系の高次な機能をタンパク質分子のレベルで明らかにするために、できれば神経細胞1個に含まれるタンパク質を分析したい。内径1.3mm、長さ35mmのキャピラリーポリアクリルアミドゲルを1次元目に用いたマイクロ2次元電気泳動法では、銀染色により細胞 10^4 個に含まれるタンパク質約400個が分析でき、検出される最小スポットのタンパク質の量は0.5ng程度である。細管電気泳動法は、操作性が高いうえ、キャピラリーの内径を小さくすれば、さらに高感度にタンパク質を検出できる可能性がある。そこでまずタンパク質の細管電気泳動を全自動化し、得られたタンパク質分離パターンの解析法について検討した。

(方法)

1. 自動化 泳動用細管は perfluorinated ethylene propylene (PFEP) 製、内径0.5mm、外径1mm、長さ19cm (試料注入ブロックから紫外吸収検出器まで、電位勾配検出器までは23cm) のものを、1度1%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液を通し、120度Cで6時間乾燥させてから用いた¹⁾。電極槽液の送液は蠕動ポンプにより行い、流路はできるだけ単純化した¹⁾。電源、電極槽、紫外吸収及び電位勾配検出器は、島津細管式等速電気泳動装置IP-2Aのものをほぼそのまま用いた。サンプラーはテクニコン社のオートサンプラー(40試料カップ用)に、プローブ動作検出用マイクロスイッチを付けて用いた。試料溶液の送液は小型蠕動ポンプで流速 $100\mu\text{l}/\text{分}$ で、試料注入はインジェクションブロックのセプタムにガラスキャピラリー(内径0.24mm、外径0.35mm、長さ50mm)を挿入して行った。各部分装置の制御にはマイクロコンピュータ(PC8001+PC8013、日本電気)に自作した8チャンネルリレーインターフェースをつけたものを用い、動作プログラムは手動操作を模して製作した。

2. データ取込 島津製装置付属の紫外吸収及び電位勾配検出増幅器は、最大0.05V程度の信号電圧であるので、さらにそれぞれの信号を2台の増幅器(大岳製作所)で100倍増幅したのちA/D変換し、泳動開始後4分20秒から、AD変換された値10個の平均値を1データ/0.7秒のタイミングで1200データずつコンピュータに一時記憶させた。泳動終了後、これらのデータを5インチフロッピーディスクに記録した。

(結果)

1. 自動化 インターフェースを内蔵しない各機器の制御のためには、接点容量の大きいリレーとそのインターフェースが必要であるが、現在のところ汎用の適当な市販品はなく、自作を要した。試料注入の自動化は、全自動化するための最も重要な部分であるが、オートサンプラーから蠕動ポンプでインジェクションポートに注入し、過剰の試料をドレインから洗い流すという簡単な方法でも、試料の注入量は3%程度の再現性を示した。ただしドレイン出口に0.1kgの背圧をかける必要があった。これは電極に発生する気泡の圧力で細管中の溶液が泳動前あるいは泳動中に移動することによるのかもしれない。全自動のための動作プログラムはBASIC言語で製作して動作速度に問題はなかった。1試料当たり26分、40試料が17時間で分析できた。現在のところ電極槽液と試料溶液の交換に約10分を要しているが、電極槽、試料注入部の改造により2~3分程度にすることは可能であろう。紫外吸収検出は現在254nmでフルスケール0.7という低い感度で行っているが、添加する試料量は血清として0.05 μ l相当量(血清タンパク質約3.5 μ g)であり、ディスク電気泳動法の100倍近い高感度である。細管径を小さくし、高速液体クロマトグラフィ用検出器を用い、光路を絞ることによりさらに100倍程度の高感度化は容易に期待できる。繰り返し分析のうえでの最大の問題点は泳動用細管のHPMCによる被覆法で、現在は約100回の分析後細管を交換している。

2. データ取込とデータ評価

電位勾配及び紫外吸収検出器からの直流電圧信号は市販A/Dコンバーターで1データ/100 μ sec程度の速度でA/D変換できるが、これらをすべて保存する必要はないので、平均し1データ/0.7sec程度の速度でコンピュータのメモリーに保存した。データ取込の頻度は検出される最も鋭いUVピークの幅(約3sec)から決定した。データを取り込んだのちは、さまざまなデータ評価が単にデータ処理のプログラム作製だけでできるようになる。等速電気泳動条件でタンパク質を分析したときのデータ評価の過程は以下のとおりである。1) 電位勾配と紫外吸収の2つの検出器の、泳動管上の位置のずれを、ゾーンの移動速度が一定であると仮定して補正する。2) 一つ一つの紫外吸収データを、横軸に電位勾配値をとってグラフ表示する。3) 横軸に電位勾配値をとり、一定の電位勾配値幅の範囲にある紫外吸収値を積算してグラフ表示する。4) 紫外吸収積算値のピークの電位勾配値を読み、タンパク質の同定に用いる。

(応用)

自動化システムは、そのまま核酸など、他の紫外吸収物質の分析に利用できる。またクロマトグラフィシステムと結合して、溶出液の連続自動分析を試みている。

1) 山本秀子、小島清嗣、真鍋 敬、奥山典生、生物物理化学、32(1988)33-38。

新潟大医・法医 ○山内春夫、小野政孝

我々は、これまで細管式等速電気泳動法（イソタコ）により、ヒト血清について分析してきた。今回、これまで行ってきた血清蛋白の分析と同じ条件を用いヒト尿についてイソタコによる分析を行った。尿は大学付属病院の外来患者50例の尿を任意に選び、それぞれの尿についてイソタコによる分析と同時に、尿試験紙（N-マルティステックスSG、マイルス三共製）により比重、pH、蛋白質など9項目についての検査を行った。

〔方法〕

1. イソタコは島津のIP-3Aで内径0.5mmのFEP製キャピラリーチューブを用いた。
2. リーディング液は、5mM HCl-10mM Ammediol-0.1% HPMC 4000、ターミナル液は、10mM 6-Aminocaproic acid-10mM Ammediol(pH10.8)、スパーサー液は、数種類の0.2mM アミノ酸にpH 3.5~9.5のAmpholine(LKB)が2%となるように加えたものを用いた。
3. 尿とスパーサー溶液とを1:3に混合したものを1 μ l注入し、リーディング電極-ターミナル電極間で、5分間150 μ A、次に75 μ Aの定電流で12~20分の泳動を行った。

〔結果及び考察〕

1. イソタコによる尿の分析では、低電位の領域から高電位の領域にかけて、多くのピークが認められた。このピークを低電位のものからA領域、B領域、C領域とわけて、各領域について下記のように分類を行った。即ち、A領域では、1本の高いピークがあるものをA-I型(3例)、2本の比較的高いピークがあるものをA-II型(10例)、平坦なピークのあるものをA-III型(37例)とした。A-III型が最も多く、ついでA-II型、A-I型の順であった。また、B領域では、2本のピークの高さの比によりB-I~IV型に分類した。ピーク比が1.0以上のB-I型(1例)、ピーク比0.5~1のB-II型(3例)、ピーク比0.2~0.5のB-III型(14例)、ピーク比0.2以下のB-IV型(32例)で、B-IV型が最も多く、ついでB-III型、B-II型、B-I型の順であった。次にC領域では、比較的高いピークがあるものをC-I型(20例)、平坦なピークのあるものをC-II型(30例)と分類した。(Fig. 1)
2. 尿蛋白の強陽性例と陰性例とのイソタコグラム等を比較したところ、尿の分析パターンと尿中の蛋白量との間に相関は、認められなかった。(Fig. 2)
3. B領域及びC領域のピークを比較すると比重の高い尿は、比重の低い尿に比べてピークが高い傾向が窺われた。(Fig. 3) また、色調の濃い尿は色調の薄い尿よりも、比重と同様にB領域及びC領域のピークが高い傾向が窺えた。
4. 280nmと254nmのUV検出器によるイソタコグラムを比較すると、B領域のピークは280nmで高く、A、C領域のピークは254nmで高い傾向がみられた。
5. 濁りや沈査のある尿については、軽く混ぜてそのままイソタコに注入したものと、遠心分離し、その上清を注入したものとを比較したが両方で顕著なパターンの差は認められなかった。
6. 尿のアセトン沈査をイソタコにより分析したところ、A、C領域のピークが消失し、B領域のピークのみが残った。
7. 尿を分子量5000及び30000のメンブランフィルターを用いて、約2倍及び約80倍に濃縮して、その濃縮液をイソタコにより分析したが、濃縮による尿のパターンの変化は認められなかった。

やまのうち はるお、おの まさたか

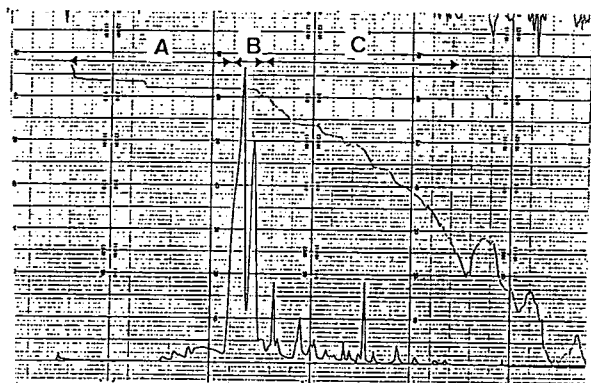


Fig. 1.

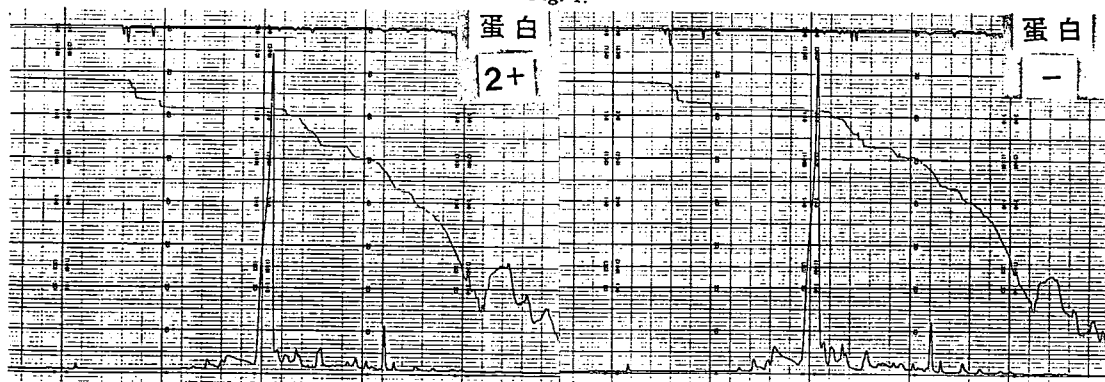


Fig. 2.

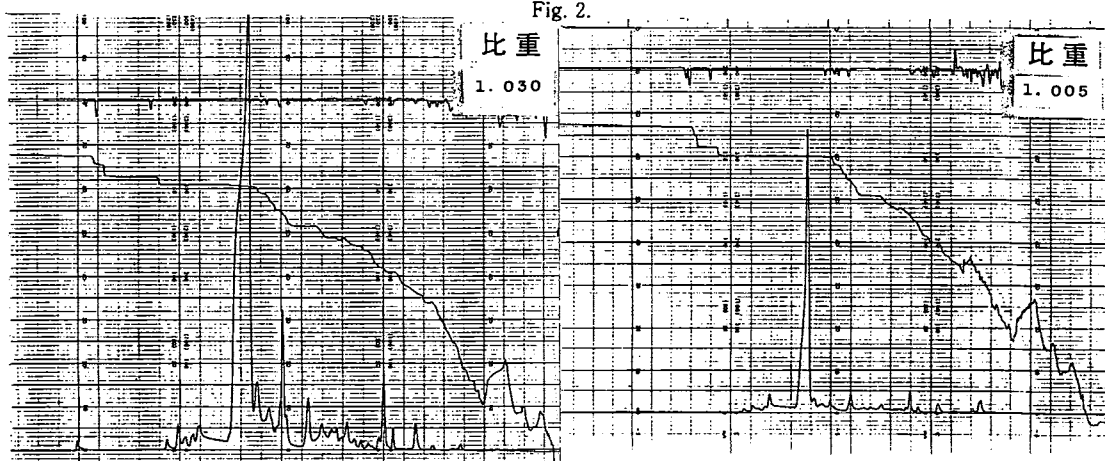


Fig. 3.

イミノジペプチド尿症患者ではProlidaseが欠損しているために、その尿中に種々のiminodipeptidesを排泄することが知られている。

プロリダーゼ欠損症患者及び正常人の赤血球中のプロリダーゼ活性については本研究会で発表したが、プロリダーゼ、プロリナーゼ及びプロリンイミノペプチダーゼ活性の測定に本装置を用いて行ったので、その結果について報告する。

方法:

正常人及び患者とその母親の赤血球のLysatesを50mM Tris-HCL Bufferで10倍に希釈(100 μ l)し、37 $^{\circ}$ Cで10分間 preincubationしたのち、10mMのsubstrate 100 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間 incubateした。

反応は、100 $^{\circ}$ Cで5分間熱処理することにより止めた。その反応液を細管式等速電気泳動装置を用いてそれぞれの活性の定量を行った。

分析条件:

プロリダーゼ及びプロリナーゼ活性の測定

Leading electrolyte: 10mM HCL+2-amino-2-methyl-1-propanol (0.05% PVAを含む) pH, 6.0

Terminal electrolyte: 10mM GABA+Ba(OH)₂ pH10.9

プロリンイミノペプチダーゼ活性の測定

Leading buffer: 10mM HCL+Amediol pH8.7 (0.05% HPCMを含む)

Terminal electrolyte: 10mM β -alanine+Ba(OH)₂ pH10.9

Chart speed 10mm/mino, Temperature 20 $^{\circ}$ C

結果:

患者の母親の赤血球中のプロリダーゼ及びプロリナーゼ活性の同時定量がFig 1に示されている。(A)は0分、(B)は30分、(C)は60分間反応させた時で反応時間とともに基質のGly-proとPro-glyが減少し、生成物のGlyが増加していることを示している。

Table 1には正常人、プロリダーゼ欠損症患者及びその母親のプロリダーゼとプロリナーゼを示した。患者のプロリダーゼ活性は完全に欠損しているのではなく、わずかではあるがその活性が認められ、また母親の活性は正常人の約半分に減少していた。プロリナーゼ活性は患者及びその母親とも正常人の約1/6に減少していた。正常人の赤血球中のプロリンイミノペプチダーゼ活性の測定を図 2に示した。aは赤血球のlysate、及び0(b)、5(c)、15(d)、30(e)分間の反応後の基質Pro-gly-glyの減少と、生成物gly-glyの増加を示した。Pro-gly-glyは反応時間とともに減少し、30分では殆んど完全に分解されることが判った。そのため、プロリンイミノペプチダーゼ活性の測定には反応時間を10分とし、それぞれの酵素活性を測定した。その結果を表 IIに示した。

患者 I, IIの活性は正常であったが、その母親は約2倍の活性を示した。

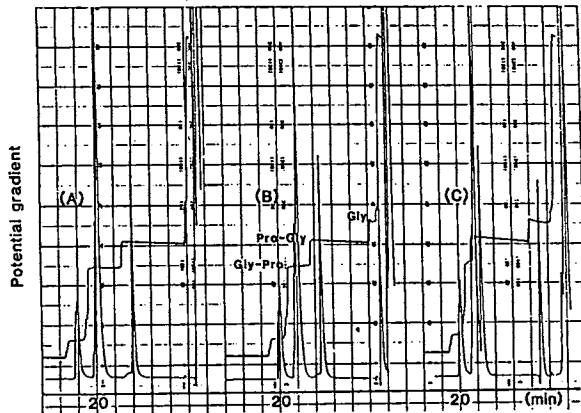
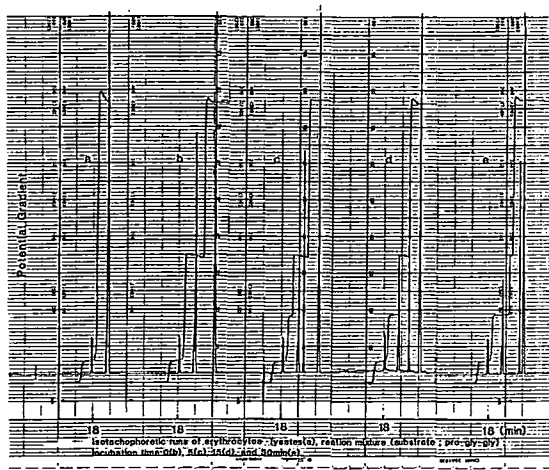


Fig. 1. Isotachopheric runs for the simultaneous determination of prolidase and prolinase activities in erythrocytes from the mother of the patient with iminopeptiduria at (A) 0 min, (B) 30 min and (C) 60 min. The initial concentrations of H-Gly-Pro-OH and H-Pro-Gly-OH were 5 and 10 mM, respectively. Analytical conditions as in Fig. 1.

☒ - 1



☒ - 2

Isotachopheric runs of erythrocytes lysates (a), reaction mixture (substrate: pro-gly-gly) incubation time 0 (b), 5 (c), 15 (d) and 30 min (e).

Table 1

Prolidase and prolinase activities in erythrocytes from healthy subjects, patients with prolidase deficiency and their mother.

	Prolidase activity			
	Control (n=5)	Mother	Patient I	Patient II
Gly-pro	165.67±15.37	81.10	4.72	4.13
	Prolinase activity			
	Control (n=5)	Mother	Patient I	Patient II
Pro-gly	33.60±3.80	4.53	5.68	4.38

Table 2

Measurement of proline iminopeptidase activity in erythrocytes from normal human, patients with prolidase deficiency and mother.

	pro-gly-gly	gly-gly	
	(nmoles/200µl)	(nmoles/200µl)	(nmoles/min/mg)
normal human			
1	694.0	306.0	97.4
2	555.6	444.4	142.4
3	496.5	503.5	132.5
4	653.9	346.2	104.3
5	640.2	359.8	113.9
mean±SD	608.0±71.7	392.0±71.7	118.1±16.9
patient I	650.0	350.0	99.7
patient II	613.7	386.3	111.0
mother	647.9	352.1	183.4

23 植物種子抽出液の沈降素活性と細管式等速電気泳動による植物種子の種属鑑別について

専修大・法 吉田治弘

植物種子抽出液中には、赤血球膜の糖鎖や糖蛋白質に特異的な親和性を示す植物性凝集素の存在が知られ、ヒトや家畜の血液型判定の実務に使用されている。しかし、沈降素活性の検索については、少なからず実施されているものの、ヒトの生体内の糖蛋白質を構成する単糖はごく限られており、遺伝標識の検索を目的に血清蛋白質を検討しても結果は期待薄である。そこで、他種の動物血清中の未知成分の検索に重点を置き、種属鑑別を目的として検索を進めたところ、イヌ血清に特異的な親和性を示す沈降素を見いだした。また、CITPにより植物種子抽出液を分析したところ、植物の種類、品種によりそのUV吸収パターンに顕著な相違点が観察され、さらに、植物種子抽出液間に沈降反応が観察された。

材料及び方法

供試した動物血清は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、タヌキ、モルモット、マウス、イルカ、ニワトリの計12種である。植物種子は、ナタマメ(2種)、ハリエンシダ(Ulex)、スイトビー、空豆、落花生、ササゲ、ふじ豆、豌豆(2種)、大豆(6種)、隠元豆(10種)、エンジュ、クズ、大根・カブ(10種)、オクラ、アスパラガス、ゴボウ、人参、ハクサイ、紅ヒマ、クサギなどの約60種を使用した。種子抽出液の作成は、種子を豆挽器、乳鉢等で微細な粉末とし、種子粉末 1g に生理的食塩水10mlを加え、よく攪拌し、37℃に1時間、さらに攪拌後、4℃で1晩置いたのち、3000r.p.m. 10min.の遠沈した上清を抽出液とした。細管式等速電気泳動法は、島津IP-2A型を使用した。分析条件は、リーディング液には HCl-Ammediol-HPMC系を、ターミナル液には ϵ -ACA-Ammediol-Ba(OH)₂ を用い、プレカラムは10cm x 1φ、分析用カラムは30cm x 0.5φとし、試料はアミノ酸を含むスパーサー溶液とampholine 3.5~9.5などを含む試料調整液に種子抽出液を加え、これらの1 μlを添加した。通電は125 μAで15分、さらに75 μAで13~15分間実施した。検出は280nmでのUV吸収を4cm/min.の速度で記録した。

沈降反応と免疫電気泳動は、ペロナル緩衝液 pH 8.6 を用い1% Agaroseゲルを作成し、沈降反応は、オクタロニー法により実施し、72時間後に沈降線を観察した。免疫電気泳動法は、動物血清、植物抽出液などを抗原孔に入れ、泳動後抗体溝に植物抽出液に入れ、同様に沈降線を観察した。

実験結果

1、CITPによる植物種子抽出液の分析

供試した種子抽出液のCITPによるUV吸収パターンは、植物の科(属)、種などによりかなりの相違が観察された。すなわち、図1に示すようにマメ科の種子においても特徴的なパターンが観察され、種子だけでその種を決定する時などに有用であり、かつ品種間の差異も観察でき、M2D-PAGE等を併用することにより、さらに、その識別は容易になった。

2、動物血清と植物種子抽出液との沈降反応

動物血清に対する植物種子抽出液のオクタロニー法によるスクリーニング・テストの結果は、表1にまとめたごとくである。すなわち、供試したマメ科種子の多くは沈降素活性を有しており、ナタ豆は何れも全ての動物血清に反応した。大豆は、6品種用いたが、反応パターンにより3種に分類されるようであった。

隠元豆は11種用い、小豆、大福以外は、ほとんどの動物血清に親和性を示した。マメ科以外の種子では、大根などのアブラナ科の種子に、とくにイヌ血清に強い親和性が観察された。これらの動物血清と植物種子との免疫電気泳動を実施したところ、動物血清は隠元豆との沈降線形成に種属差を反映していた。また、イヌ血清とカイワレ大根との沈降線の形成は、イヌ血清の易動度の非常に速い蛋白と思われた。動物血清と種子抽出液との反応物のCITP像については検討中である。

3、植物種子抽出液間の沈降反応

今回の実験中に、寒天ゲル内で隣合った植物種子間での沈降線の形成を観察し、免疫電気泳動を実施したところ、血清免疫グロブリンの沈降線を検出する部位に植物沈降素を見いだした。供試した植物種子のうち24種について、相互に沈降反応を実施したところ、表2にまとめたごとくの結果が得られた。詳細な検討はまだ実施していないものの、植物の免疫能を考えると興味深いものである。

図1、植物種子抽出液のCITP分析のUV吸収パターン

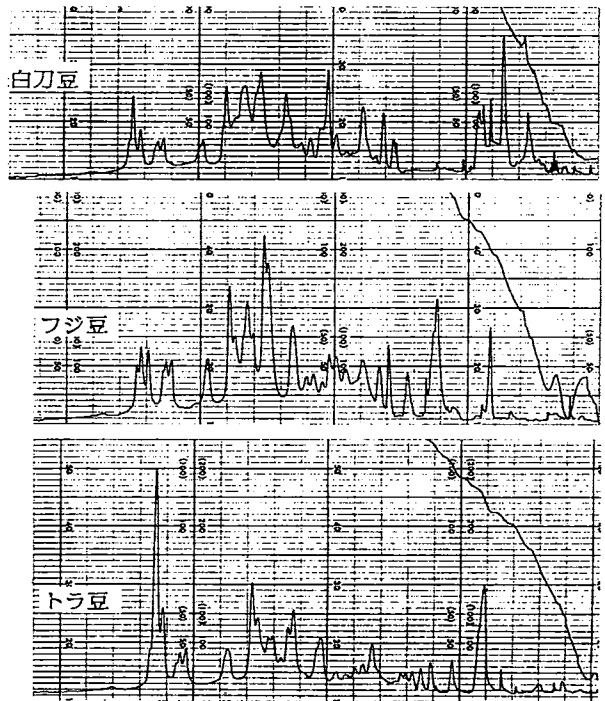
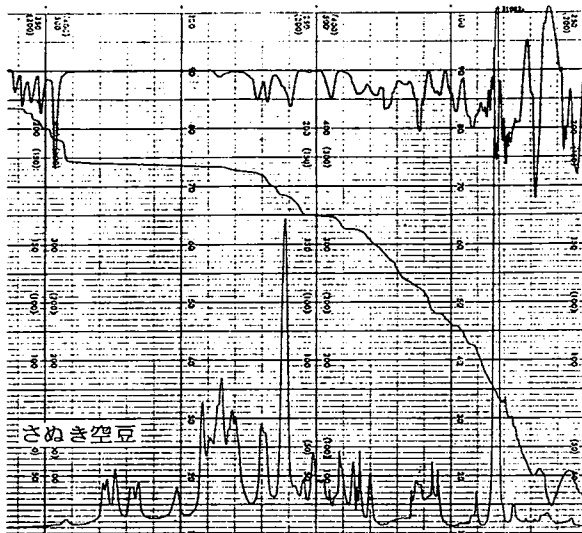


表1、植物抽出液と動物血清とのゲル内沈降反応

血清	ヒ	ウ	ク	マ	フ	タ	ビ	イ	ロ	タ	キ	コ	シ	マ	カ	コ	リ
	エト																
1、赤刀豆	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
2、Ulex.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3、スイトピー	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4、讃岐長莢空豆	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5、落花生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6、ささげ黒種 三尺大種	-	+	+	+	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-
7、早生ふじ豆	-	+	+	+	+	-	-	-	w	+	+	-	-	-	-	-	-
8、成金豌豆	-	-	w	w	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9、ひたし豆	-	+	+	+	-	-	+	+	w	w	-	-	-	-	-	-	-
10、三河島枝豆	-	+	+	+	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	w	-	-
11、奥原早生枝豆	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12、トッパクropp	+	2+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
13、トラ豆	+	2+	+	+	+	+	w	w	-	+	+	+	+	+	+	+	+
14、大正金時	+	+	+	+	+	2+	2+	2+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+
15、天津キドニー	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16、マントル菜豆	+	+	+	+	+	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17、オレゴン	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+
18、大福	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19、かいわれ大根	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20、大根早みの 早生3号	-	+	+	+	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21、ガーデンクレス	-	-	-	+	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22、もちばな小蕪	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23、大根聖護院	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24、幅広ニラ	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25、カイラン	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26、白菜	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27、結球高菜	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2+：沈降線2本、+2：強い沈降線形成、+：沈降線形成、
w：弱く沈降線形成、-：沈降線形成せず

表2、寒天ゲル内オクタロニー法による植物種子抽出液間の沈降反応

植物抽出液	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
1、赤刀豆	-	+	+	+	2+	-	+	+	+	2+	+	+	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2、スイトピー	-	+	-	-	w	w	w	w	+	w	w	w	+	w	+	+	+	w	w	-	w	w	-	w	w	
3、讃岐長莢空豆	-	+	w	w	w	w	w	w	+	2+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4、ささげ黒三尺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5、ふじ豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
6、成金豌豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7、三河島枝豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8、大正金時	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	w	w	w	w	-	+	+	w	w	w	w	+	w	w	
9、天津キドニー	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
10、オレゴン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	+	w	+	+	w	w	-	+	-	-	
11、エンジュ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12、かいわれ大根	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	2+	-	
13、ガーデンクレス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14、オクラ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	w	-	+	-	
15、アスパラガス	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
16、ごぼう	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17、人参	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18、幅広ニラ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19、コウサイ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20、カイラン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21、ハクサイ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22、紅ひま	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23、クズ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24、クサギ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2+：沈降線2本形成、+2：強い沈降線形成、+：沈降線形成、
w：弱く沈降線形成、-：沈降線形成せず

24 ハバリノイノ活性を示す緑藻硫酸多糖の細管式等速電気泳動による
検索

(杏林大・保健) 〇平岡 厚

(埼玉大・理・生化) 上原 勉, 常見 謙史, 前田 昌敏

【緒言】ハバリノイは血液凝固阻止活性などの生理作用を示す硫酸基を持つ多糖として著名であり、このような類似の活性を示す多糖硫酸工入ラハ、ハバリノイノ呼ばれ、天然からの単離、あるいは合成の試みが多く行なわれている。植物に含まれる硫酸多糖として海藻多糖にその起源が求められる。これまで主に褐藻からの7ユニットに7ユニットの研究がなされて来たが、ハバリノイに匹敵するような顕著な活性を示す多糖の存在は、まだ認められていない。我々は最近、緑藻類の細胞壁多糖についてハバリノイノ活性を検索した折り、いくつかの種から得られるものにおいてハバリノイノ活性を認めた。このうち、ヒトイグサ (*Monostroma nitidum*) よりハバリノイの約6倍までの活性を示す多糖を単離し、これがラムナノ硫酸であることと認められた。

このような純化精製過程において、細管式等速電気泳動によって活性成分の均一性を調べることも有効であったので、得られたこれらの結果を利用して更に多くの種について活性多糖の検索を行なうことを目的とした。

【実験】細管式等速電気泳動は、島津IP-2Aにより20°Cに維持された7.0mm細管(0.5mm i.d. x 4cm & 1mm i.d. x 15cm)の中で行なった。リ-ブ-イ-ブ-液として30% (v/v) の1-β-D-グルコピリロシド (Triton X-100) を含む0.01M 塩酸-β-D-グルコピリロシド (pH 3.6) を用い、又9-ミチアル液は0.01M 酢酸トリメチルアミンとした。電流は初期3分間を125μA、次に電圧が15KVに上昇するまでを75μA、以後は25μAに安定化させた。又検出は電位勾配により、4-アミノ安息香酸は40mm/min.とした。

各種の藻類からの粗多糖は、乾燥藻体を約10倍量の水と共にホモゲナートして580°Cにおいて2時間加熱し、遠心分離の上清の温水抽出液を流水に対して充分に透析をし、凍結乾燥して得た。ヒトイグサの粗多糖は、イオン交換セルロース、トヨパール・グルに50% (v/v) の3-β-D-グルコピリロシドを添加して、リ-ブ-イ-ブ-液を注入して電気泳動において単一な物質として示すまでに精製した。これらの多糖標品は、一定濃度(1mg/ml)の水溶液とし、この一定量(0.2-1.0μl)を注入して泳動を行なった。

血液凝固阻止活性の測定は、ハバリノイ・コアラグラーゼとして血清を含む系にトロンビンを含む一定時間(キープ)として、この一定量に7.1%のグルコピリロシドを加えて7.1%の形成に至るまでの時間(秒)を求めた。別にこれと同じようなトロンビンを含む系に一定濃度の粗多糖溶液を加え同一条件においてトロンビンを含む系とした後に、7.1%の形成に至る時間を求め、この前後の時間差を活性値として表わした。

【結果及び考察】ヒトイグサの粗多糖は、種々のグルコピリロシドの操作を繰り返すことによって、電荷およびサイズにおけるクオアトリアリに均一な状態を示すまでに純化した。別にセルロース・アセテート電気泳動において単一なバンドを示し、化学分析の結果は、ラムナノ硫酸を主体とする酸性多糖として同定された。

〇平岡 厚, 上原 勉, 常見 謙史, 前田 昌敏, 前田 昌敏

硫酸多糖を含む酸性多糖の細管式等速電気泳動については、山本らの報告がなされているが²⁾³⁾ 我々はその条件に対して上記のような改良を加えて海藻の硫酸エステルを含む多糖の分析に良好な結果を得ることが出来た。この系において泳動に要した時間は、1試料につき20分以内であった。ヒトエグサ粗多糖の泳動図では、活性多糖以外のいくつかの電荷成分が複数のゾーンとして認められたが(図1・左)、純化多糖の泳動においては $PU=0.35$ の単一のゾーンとなり(図1・右)、ここにおいても単一の物質として得られたことが理解された。ヘパリン及び同様の生理活性を示すフコイダンの PU 値は、ヒトエグサのそれとは異なる値であったので、 $PU=0.35$ のゾーンは分子種の相違によって認められるもので、ここでは生理活性を示すヒトエグサのラムナン硫酸に固有なものであると考えられる。

ヒトエグサと分類的に近傍にあるいくつかの藻類(ヒトエグサ属)からの粗多糖を比較した検索において、活性が認められたオオヒトエ、ウスヒトエなどでは $PU=0.35$ のゾーンが検出されたが、活性を示さないシワヒトエ、ヒモヒトエには、このゾーンは認められなかった。又、近縁の緑藻類においても、活性を示したクロミルなどでは、 $PU=0.35$ に近いゾーンが認められ、これらはヒトエグサの純化多糖との混合泳動によるゾーン長の延長を示した(図2)。このように高い活性を示すラムナン硫酸の存在は、むしろヒトエグサにおいて特異であると考えられるが、この方法は緑藻においてこのような荷電性の特定の活性成分の検索などには、広く利用が可能なものと言える。

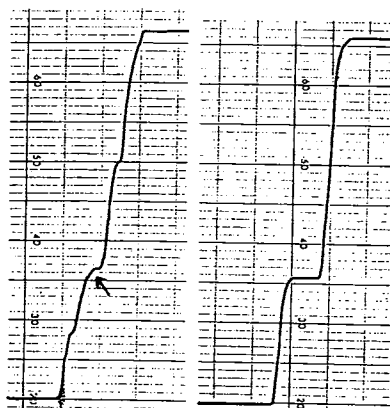


図1；ヒトエグサ粗多糖(左)および精製後の活性多糖の等速電気泳動図

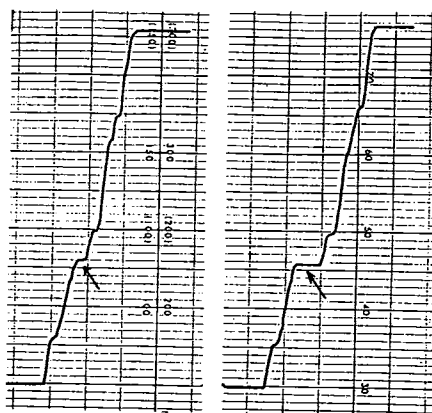


図2；クロミル粗多糖(左)およびそれとヒトエグサ純化多糖との混合泳動(右)の等速電気泳動図

[参考文献]

- 1) 原田直樹, 前田昌徹, 関口正幸: 日本化学会第53回秋季年会講演予稿集p688(1986)
- 2) 山本信也, 太田忠男, 森川良広: 分析化学, 31, 251(1982)
- 3) 山本信也, 太田忠男, 森川良広: 分析化学, 31, 557(1982)

