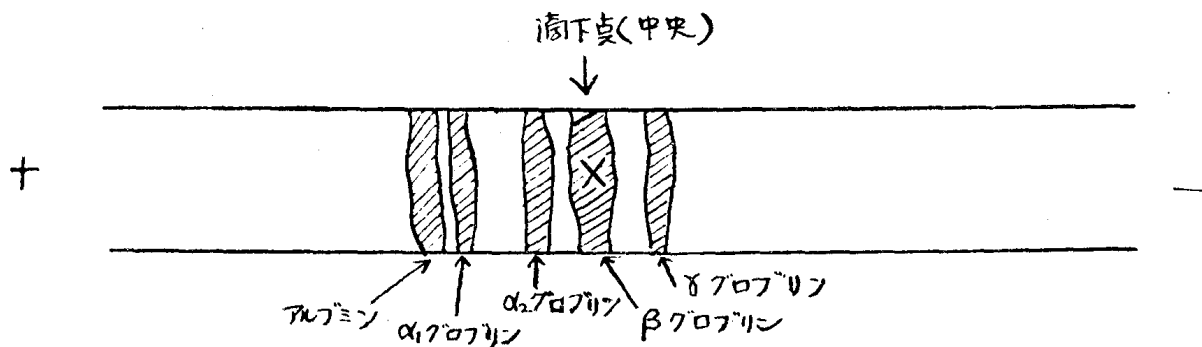


- 1) K. Sakamoto, K. Tateoka : *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 20, 98 (1958)
- 2) 坂本清, 楯岡和子 : 農化, 30, 463 (1956)
- 3) 坂本清, 斉藤絹子 : 農化, 32, 181 (1958)
- 4) 坂本清, 斉藤絹子 : 農化, 32, 186 (1958)
- 5) 坂本清, 斉藤絹子 : 農化, 32, 275 (1958)
- 6) 坂本清, 斉藤絹子 : 農化, 32, 390 (1958)
- 7) K. Sakamoto, K. Saito, A. Nagata : *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 23, 89 (1959)
- 8) K. Sakamoto, K. Saito, A. Nagata : *Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.*, 23, 95 (1959)
- 9) C. V. Holt et al. : *Biochem. Z.*, 323, 345 (1952)
- 10) P. G. Moinat, E. F. Tuller : *Anal. Chem.*, 29, 1655 (1957)
- 11) J. de Wael : *Ciba Foundation Symposium on Paper-electrophoresis*, p.105 (1956)
- 12) E. Pacsu, T. P. Mora, P. W. Kent : *Science*, 110, 446 (1949)
- 13) H. Kunkel, A. Tiselius : *J. Gen. Physiol.*, 35, 89 (1951)
- 14) 平井秀松, 島尾和男 : 電気泳動法, p.57 (1955)
- 15) A. B. Foster, M. Stacey : *J. Appl. Chem.*, 3, 19 (1953)



第6図 血清蛋白の分離例 8v/cm, 0.4mA/cm, 4時間 水平型
open-strip type 装置内, β グロブリンは原点にとどまる。

を行つたが、検出、粘度、易動度を考える時好ましいものは見当らない様である。勿論硼酸イオン含有液の如きデキストランと荷電物質を形成する様な場合はデキストランの使用は出来ない。この場合は $R=1.00$ を持ち使用液で荷電を持たない物質を探さなければならぬ。硼酸中で Foster⁽¹²⁾等はメチル化した糖を基準に用いているが之等が例である。

b) 試料の R 値が1.00より小さい時。

この場合は試料と同一の R 値を有し、しかも全く荷電のない物質を探さねばならない。之は極めて困難なことで先ず不可能と言つてよい。

2. (1)の方法で蒸発がおこると認められたとき。

濾紙の中央に限らず、任意の位置に試料を滴下し、1.の場合と同様の判定を行えばよい。多くの実験から私は以上の方法を提案する。勿論判定に際しては周到な注意が必要であり、特に液槽液面の平衡、寒天橋の均一配置、濾紙の緊張、濾紙の湿じゆん等に充分留意すべきことは言う迄もない。

要 約

水平型 open-strip type 装置ならびにガラス板型装置内における泳動距離に種々の検討を加え、又現在迄の知見を加えて新たな泳動方向の判定法を提案した。

稿を終るにのぞみ九州大学大島康義教授・船津勝教授に対し深甚の感謝を表する次第である。又デキストランの御恵与を戴いた東京医歯大 小林茂三郎氏に厚く感謝の意を表したい。

(2) 使用濾紙，緩衝液による毛管吸着分析

被験物質が純物質であつても，混合物であつても泳動の際に使用する液及び濾紙を用いて前報に述べた様な装置で毛管吸着分析^(6,7)を行う。この場合一個の spot しか得られない時は本泳動の際毛管浸透，電気浸透による分離がおこることは一応ないと考えられる。もしこの場合2つ以上の spot に別れる時は本泳動に際して易動度の差による他に，毛管浸透，電気浸透による分離がおこるので，泳動後の分離像からの泳動速度の遅速の判断は極めて注意を要し不可能に近いと考えられる。又被験物質が $R=0$ 即ち原点より動かない時は固く濾紙に吸着される証拠で，同一濾紙，同一液による電気泳動による分離はたとえ易動度に差のある物質でも不可能^(6,7)である。

(3) 濾紙電気泳動による泳動方向の判定

1. (i)の方法で蒸発がおこると認められた時は次の方法で泳動方向の判定を行う。

濾紙の正確に中央に試料を滴下し泳動を行う。その結果

i) 少しでも陽極側に動いた時は陽極に泳動したと^(6,7)考えてよい。勿論この場合 R 値の大小は無関係で考慮する必要はない。

ii) 中央にとどまつたまま動かない時次の二つの場合がある。

a) 試料が濾紙に完全に吸着し，たとえ荷電があつても，又電気浸透が働いても動くことが出来ない場合。この場合は帯電状態はわからない。

b) 試料が濾紙の中央において電気浸透と丁度同じ速度で逆の方向即ち陽極側に泳動しようとしている場合。

a), b) の区別は毛管吸着分析を行えばよく $R=0$ であれば a) の場合で，^(6,7) $R>0$ であれば

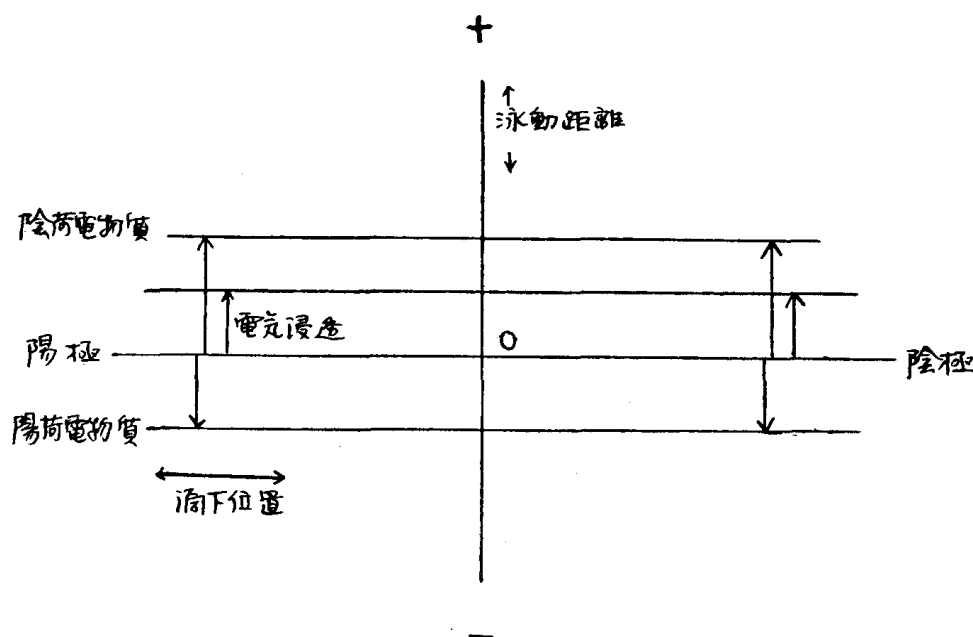
b) の場合である。前者の例としては $R=0$ の色素が，^(6,7)又後者の例としては第6図等がそれである。

iii) 陰極側に動いたならば次の方法で判定を行う。

a) 試料の R 値が 1.00 の場合

$R=1.00$ の物質で荷電のな物質を試料と一諸に原点に滴下して泳動後これを基準に泳動方向を判定すればよい。^(3,4,5)之には私の実験した所では低分子のデキストランが最も好ましい様である。デキストランの検出は KMnO_4 ⁽¹²⁾ 溶液が都合がよく，BPB⁽¹³⁾，ニンヒドリン⁽¹⁴⁾による法は可成困難の様である。検出の都合もあるのでデキストランは必ずしも試料と同一点でなくても，同一濾紙の同一線上即ち中央であれば差つかえない。濾紙が違つくと，私の経験では条件が異なることがあり微小な距離差を見るには適當でない⁽¹⁵⁾と考える。前節で述べた様に高分子のデキストランは **tailing** をおこし易い。又他の糖質，特に多糖類についても実験

グラフは常に横軸と平行する。従つてこの場合、濾紙上に「静止点」はなく、滴下された物質は止まることなく陰極側に進んで行く。⁽⁷⁾R 値の異なる物質でも滴下位置の差や通電時間の経過に従つて分離の順序が逆になることもなく、同一濾紙上では分離された各物質間の距離は滴下位置の如何にかゝらず一定する。然し物質が濾紙上を泳動することには変りがないから、吸着の問題は open-strip type 装置と同様で分離の順序が必ずしも泳動速度の遅速をあらわすことにはならない。故に必ず毛管吸着分析を併用すべきものと思われる。



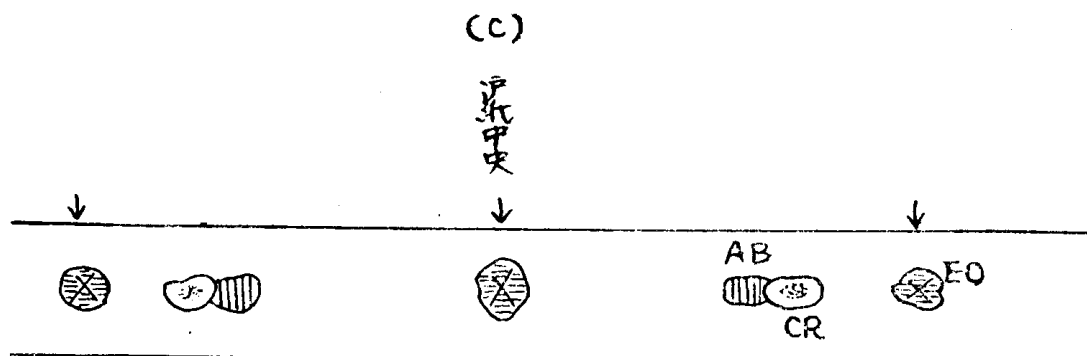
第5図 ガラス板型装置中における泳動距離—滴下位置グラフ

Ⅱ 泳動方向の判定法

以上の事実を考える時水平型濾紙電気泳動装置における泳動方向の判定法として次の方法を提案する。

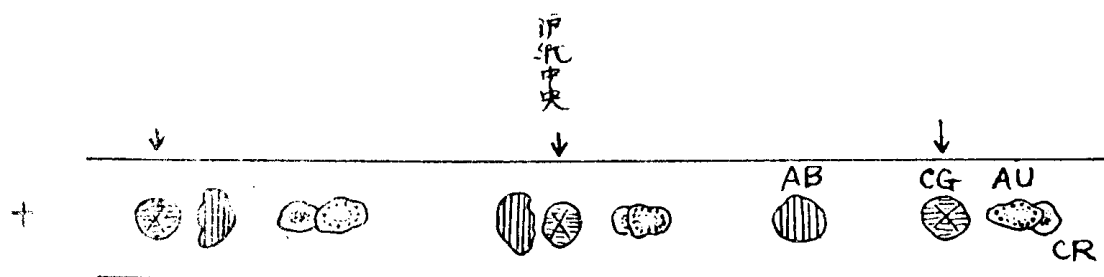
(1) 蒸発の有無の判定

ガラス板で濾紙を挟む場合においても波状ガラス板⁽³⁾であつたり、又強くガラス板で挟まないと僅かなガラス板の間隙に蒸発⁽³⁾がおり泳動速度が減速することがある。故に一応密閉槽あるいはガラス板型装置⁽³⁾においても、同一濾紙の中央及び両極側の数点に検出が容易で泳動速度が割合小さく R 値の大きい物質たとえばグルコース又は中性アミノ酸特にグリシンの如きものを滴下し、1 ~ 2 時間前後通電して、その泳動距離—滴下位置⁽³⁾グラフを作成し、之が横軸と平行するか否かにより蒸発の有無を判定する。勿論これは自室の装置について使用電位勾配の範囲を一度試験しておけば、泳動毎に行う必要はない。



第3図 水平型 open-strip type 装置内における毛管浸透の影響，東洋濾紙No.50使用

- (A) アミノ酸混合物；アスパラギン酸，グルタミン酸，グリシン，ヒスチジン，リジン，アルギニン含有，PH7.3 磷酸緩衝液，1 時間
- (B) 血清蛋白；アルブミン， α_1 グロブリン， α_2 グロブリン， β グロブリン， γ グロブリン含有，PH8.5，ペロナル塩緩衝液，2 時間
- (C) 色素混合物；AB：アズールブルー-VX，CR：クリソイジン，EO：エオシン，30%酢酸，1 時間



第4図 色 素 の 分 離

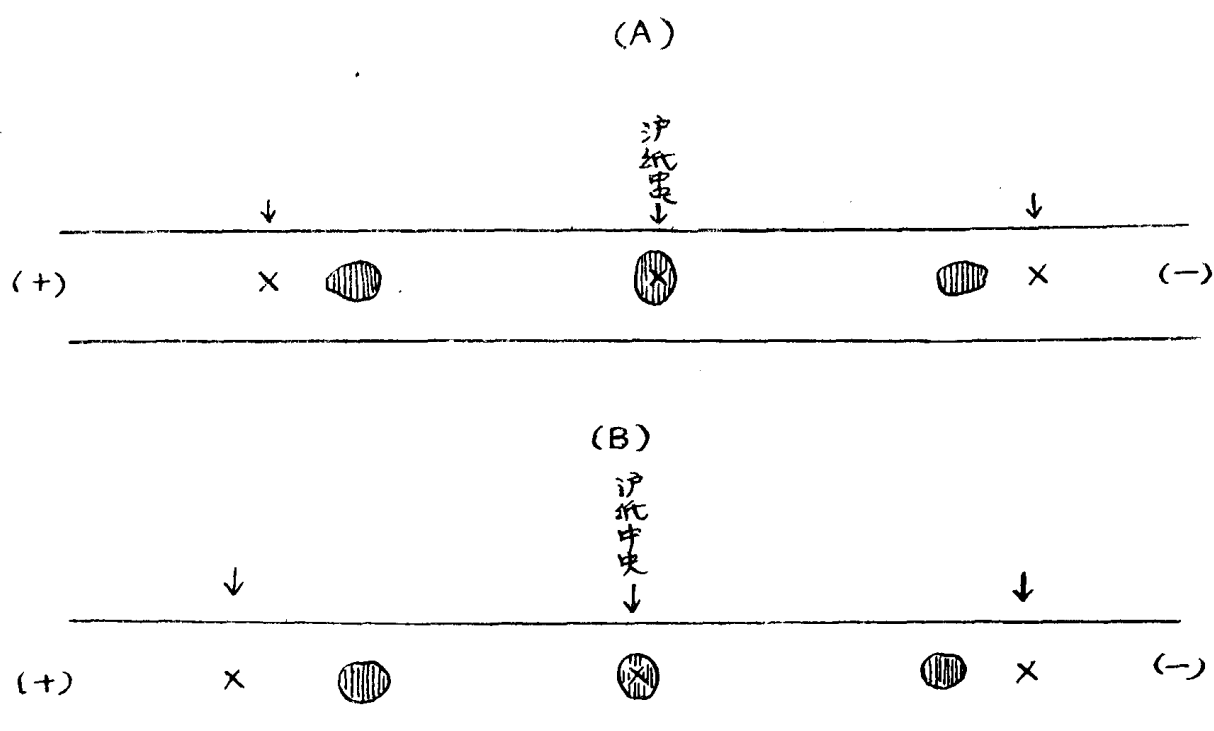
AB：アズール・ブルー VX CG：コンゴー・レッド AU：オーラミン
CR：クリソイジン 30%酢酸中，0.2mA/cm，6.5V/cm，2時間 水平型 open-strip type装置中

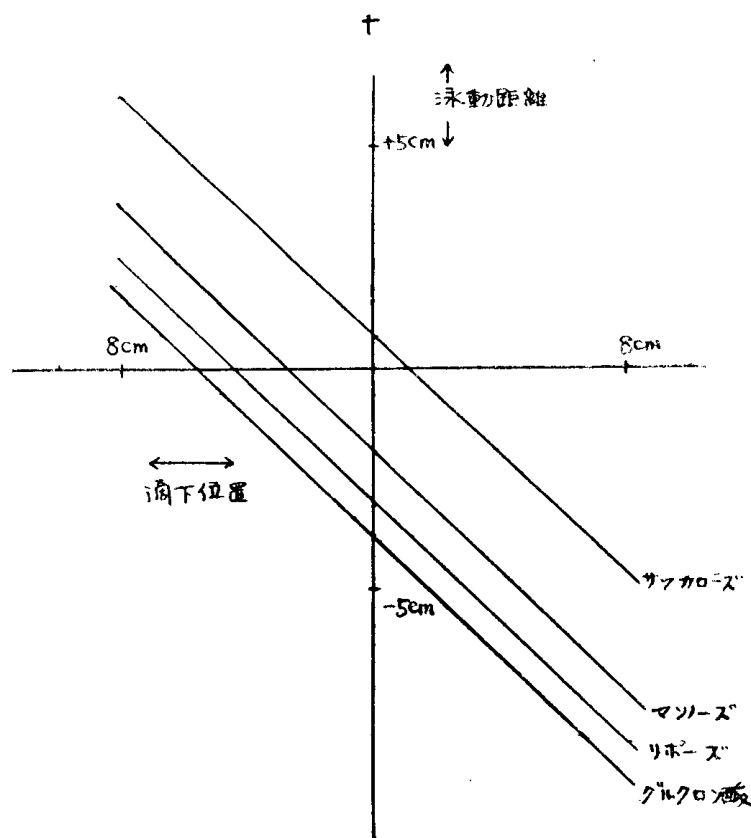
この図より明らかな如く同一濾紙上でも滴下位置によつて分離の順序は著るしく異なり又前報⁽⁷⁾第4図に示した様に泳動時間の経過に従つて分離の順序が違つて来ることさえあるこれは各物質の間に濾紙に対する吸着性の差があるためで，このためある物質が他の物質に比べて陰極側に動いたからといつて，陰極に向う泳動速度が速いとはいえない。従つて被験物質の濾紙に対する吸着性が同一でない限り泳動速度の判定は極めて困難となる。

以上は水平型 open-strip type 装置に関することであるが，ガラス板で強く蒸発を防ぐ⁽³⁾ glass-plate type装置では，第5図の如き泳動距離—滴下位置グラフが得られ，この

Uel は電気浸透速度である。よく濾紙の中央から約 3cm 程度陰極側に試料を滴下する時電気浸透の影響が最も少いというのはこの点を指す。然しこの式から明らかな如く Ucap という流速は発熱、蒸発の結果おこるものであるから、電流、濾紙の長さや種類・装置の気密度の差等で一定するものでなく、Uel は電流によつて変化するから、この様な変化し易い因子に支配される「静止点」の位値をどの様な場合も一概に濾紙中央より何 cm と決めることは出来ず、特に正確に泳動方向を決定するためにはこの様な方法は殆んど意味がない。この場合まず毛管浸透のみによつて物質が如何に分離するかを検定するため次の実験を行つて見た。即ち R 値の同一の物質、異なる物質同志を適当に混合して試料とし、水平型 open-strip type ^(3.6.7) 装置の濾紙中央及び両極側 10cm の 3 点に滴下し、電流を通ぜず、濾紙面よりの自然蒸発でおこる毛管浸透によつてどの程度分離がおこるかを調べた。その結果の一部を示すと第 3 図で、R=1.00 の血清蛋白、及びアミノ酸は両端から中央に向つて流されても全然分離せず、又 R 値の種々異なる色素は電流を通じないでも毛管浸透だけで吸着性の差によつて著るしい分離が起ることが明らかにされた。

この場合は勿論電気浸透はおこらないので中央に滴下した試料は分離しないが、泳動の際には第 2 図でも述べた様に、濾紙中央に滴下した試料でも泳動とは別の陰極方向への毛管浸透の影響を受ける。又この図の色素で両端より中央に多く流されているもの程、毛管吸着分析における R 値の⁽⁷⁾大なるものである。第 4 図は 4 種の R 値を⁽⁷⁾夫々異にした色素を同一濾紙の中央及び両極側 10cm の 3 原点に滴下して泳動させた一例を示したものである。



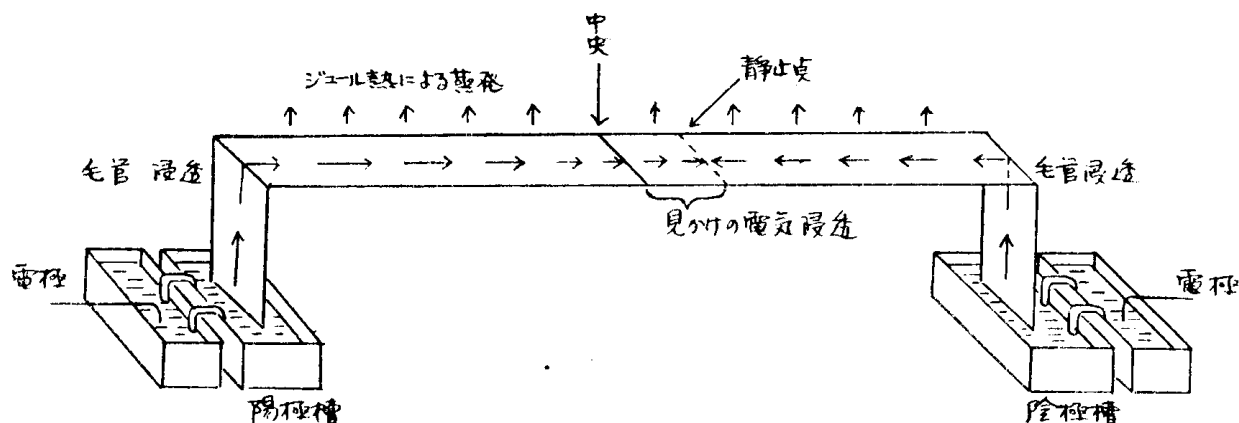


(C) 糖類, 2 時間泳動,
10V/cm, 1 mA/cm, 1 %硼砂
中, 水平型 open-strip type
装置中, デキストラン (小),
デキストラン (大) はそれぞれ
分子量の小及び大なることを示
す。

ここで水平型 open-strip type 装置で泳動を行う時の状態を考えてみる。先ず濾紙の抵抗による発熱, 蒸発のため第2図の様に両端から所謂毛管浸透が矢印の方向におこり, その度合は両端に近づくにつれて大きくなる。⁽²⁾この両端からの毛管浸透は濾紙中央でつり合うことになるが実際には濾紙の負荷電のために電気浸透が陽極から陰極側におこり, 之等の流れのつりあいが濾紙中央よりわずかに陰極寄りでおこる。この「静止点」⁽³⁾とも言える場所では流れの平衡は次の如く表現出来る。

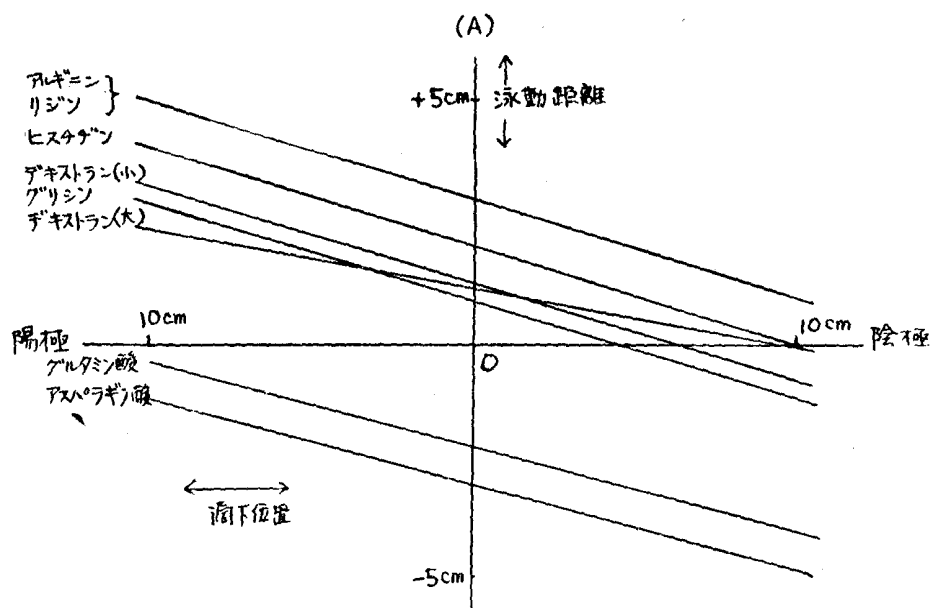
$$U_{cap}^{(-)} = U_{cap}^{(+)} + U_{el}$$

U_{cap} は毛管浸透速度で (+), (-) はそれぞれ陰極及び陽極へ向うことを示しており



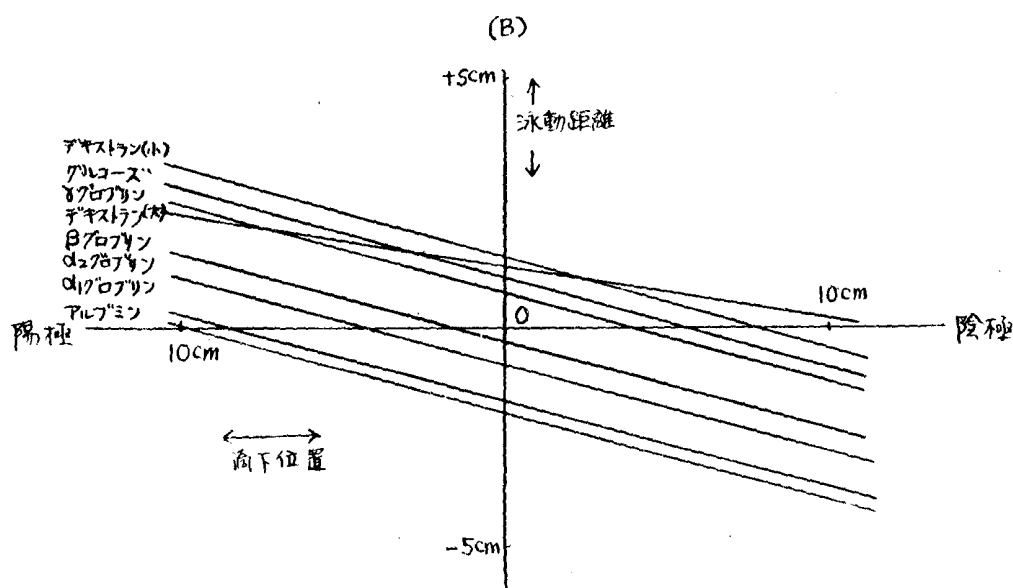
第2図 水平型 open-strip type 装置内における状態

ない。これに対し低分子のデキストラン及び他物質はすべて $R=1.00$ を示しており、之等はいずれも泳動距離-滴下位置グラフが平行している筈で実際第1図(A), (B), (C)の如くである。第1表(C), 第1図(C), で1%硼砂中では糖類は皆平行な泳動距離-滴下位置グラフを有するので、糖類のMG値が之等滴下量の範囲で成立する筈であり、之については近く報告する。



第1図 泳動距離-滴下位置グラフ

(A) アミノ酸, 1時間泳動, $7V/cm$, $0.6mA/cm$, pH6.4 磷酸緩衝液中



(B) 血清蛋白, 3時間泳動, $7V/cm$, $0.3mA/cm$, pH8.5 ペロナル塩緩衝液中

種類，使用液，濾紙の種類等で違つて来る。

(A)

滴 下 cc数	400 ¹	400 ¹	800 ¹	100 ¹	400 ¹	溶 液	備 考
濃 度 %	0.1	0.5	1.0	1.0	1.0		
ア ミ ノ 酸	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	PH8.3, 7.3, 6.4, 5.6 磷酸緩衝液	
デキストラン(1)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	"	M.W. = ca. 18000
デキストラン(2)	0.7~ 1.00	0.7~ 1.00	0.7~ 1.00	0.7~ 1.00	0.7~ 1.00	"	M.W. = ca. 160000 著るしくtailing をおこす
グ ル コ ー ズ	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	"	

(B)

滴 下 cc数	100 ¹	400 ¹	800 ¹	溶 液	備 考
血 清 蛋 白	1.00	1.00	1.00	PH8.5ペロナ ール緩衝液	
デキストラン(1)	1.00	1.00	1.00	"	M.W. = ca. 18000
デキストラン(2)	0.7~ 1.00	0.7~ 1.00	0.7~ 1.00	"	M.W. = ca. 160000 著るしくtailing をおこす
グ ル コ ー ズ	1.00	1.00	1.00	"	

(C)

滴 下 cc数	400 ¹	400 ¹	800 ¹	100 ¹	400 ¹	溶 液
糖 類	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1 % 硼砂

第1表 毛管吸着分析によるR値

(A)アミノ酸としては中性アミノ酸，ヒスチジン，リジン，アルギニン，グルタミン酸アスパラギン酸を用う。(C)糖類としてはブドウ糖，ガラクトーズ，マンノーズ，果糖，アラビノーズ，乳糖，キシロース，リボース，ラムノーズ，ソルビット，マンニット，マルトース，蔗糖，ラフィノーズ，グルクロン酸の他ビタミンCを用う

第1表 (A)，(B)，(C) はそれぞれ，アミノ酸，グルコース，デキストランのpH5.6~8.3 磷酸緩衝液におけるR値，血清蛋白，グルコース，デキストランのPH8.5ペロナール緩衝液中⁽⁹⁾におけるR値，糖類の1%硼砂中におけるR値を滴下量を変えて求めたものである。

この表でデキストランは分子量約 18,000のものと，160,000のものの二種類を用いたが後者は前者に比べて著るしく溶液粘度が高く tailing をおこし，はつきり R = 1.00を示さ

$R=0$ it is the case of a) and if $R>0$ the case of b).

iii) when it is displaced toward the cathode the following method is employed for decision:

a) the case where the test substance has R value 1.00:

Drop the test substance together with the substance carrying R value 1.00 and no electric charge on the original point and practice electrophoresis and then decision of migration direction can be made regarding the position of dextran as the original point. Dextran of lower molecular weight has been most desirable in the authors' experiment so far, while high molecular weight dextran has been found easily suffer tailing.

b) the case where R value 1.00:

In this case the substance with the same R value of the test substance and with no charge should be looked for, which is very difficult to do and mostly impossible.

II. when the evaporation is acknowledged to occur by the method

(1) above, the migration direction can be decided as follows:

Drop the test substance on any position of paper strip and apply the same method mentioned in (1).

現在迄蒸発を許す水平型 **open-strip type** 装置内でアミノ酸^(1,2,3,4), 血清蛋白⁽⁵⁾, 色素^(6,7,8)の泳動距離について種々検討したが、実際上最も必要であるこの型の装置内での物質の泳動方向の確定法については詳しく述べなかつた。

之は前報でも述べた様にデキストランの様な原点補正基準物質に問題⁽⁴⁾があるためで、今回は最近行っている糖類の泳動結果の一部をも含めて、上記装置内を主とした泳動方向の確定法を種々の面から考察提案し、この方法による研究の基礎にしたい。

実 験 並 び に 考 察

I 毛管吸着分析と泳動距離

毛管吸着分析における R 値の大小が泳動距離に深い関係を持つことはクエン酸緩衝液⁽⁶⁾, 30%及び4%酢酸⁽⁷⁾を用いる色素の実験の際に述べた。毛管吸着分析における R 値の大小はその物質が使用液の下で濾紙に吸着される度合を示すもので、したがってこの値は物質の

employed at electrophoresis in the apparatus mentioned in the previous report. In this occasion when only one spot is obtainable, the separation due to capillary flow and electroosmosis at the electrophoresis can not be considered to occur. However, if the separation into more than two spots are observed, decision of migration velocity is very difficult or mostly impossible to be done observing the separated spots because of the separation due to capillary flow and electroosmosis besides the difference of mobility. When the R value is zero at the adsorption analysis of test substances, it is evident that they are stoutly adsorbed to the filterpaper, and hence it is impossible to enable the electrophoretic separation with the filterpaper and electrolyte.

(3) Decision of migration direction in paper-electrophoresis

I. When evaporation is acknowledged to occur by the method (1) above, the migration direction is decided as shown in the following:

Drop the test substance exactly on the center of the paper strip and practice electrophoresis and,

i) when it is displaced toward anodic side even a little it can be considered to have migrated towards anode, where the R value of the substance is negligible as it has no direct connection with the migration direction.

ii) when no displacement is noticed the two following cases are possible:

a) the case where the test substance is completely adsorbed to the filterpaper and it stands still where dropped even if it carries the electric charge or it is effected by electroosmosis. In this case the electric charge is unknown.

b) the case where the test substance, on the center of paper strip, migrates, just opposite way, towards anodic side at the same velocity of electroosmosis.

To identify a) from b) the adsorption analysis has to be made, and if

濾紙電気泳動法における 泳動距離について(第11報) —— 泳動方向の確定法 ——

坂 本 清

On the Migration Distance in Paper Electrophoresis. Part.11
On the Decision of Migration Direction in Paper
Electrophoresis

Kiyoshi SAKAMOTO

After their experiment hitherto the authors offers the following methods of decision of migration direction in the horizontal apparatus of paper-electrophoresis :

(1) Decision of evaporation from paper surface :

Even in the glass-plate type apparatus, unless corrugated glass plates are used or the strip is clamped tightly between glass plates, evaporation is liable to occur through narrow crevices between them and causes decrease of migration velocity. Therefore, in an apparatus in airtight-box or of glass-plate type, drop the substances with rather small migration velocities and large R values in adsorption analysis as glucose or glycine, and after current application for one or two hours their migration distance-dropped positions graphs are to be drawn. Observing whether these graphs are parallel with the abscissa, evaporation can be decided. Once this experiment is practiced in apparatus employed within the range of its voltage available, there is no need to detect the evaporation at every electrophoresis.

(2) Adsorption analysis with filterpaper and electrolyte employed

Adsorption analysis is practiced with the filterpaper and electrolyte