口紙電気泳動法における口紙固定方式の検討

小 延 鑑 一*

口紙を水平空間に保持する open-strip type と、著者が自製したガラス板で口紙をはさみ密閉、冷却できるようにした sandwich type の2種類の口紙固定方式にて、口紙上物質の移動と泳動電流による口紙の発熱、それに伴って生じる電解液の蒸発、口紙の毛細管浸透現象による電解液の口紙中央部に向う流れとの関連について調べた。open-strip type は口紙の発熱が著しく、このため泳動方向、泳動像、泳動速度などに安定した結果を得ることが困難であり、また泳動電圧を高くすることは不可能に近い。これに対して sandwich type ではこれらの影響を受けにくく、再現性もえやすいうえに高電圧を加えることが可能であった。それでこの sandwich type を用いて 100 V/cm 程度の電位こう配にて泳動を実施できる口紙固定台を試作し、泳動結果の再現性を簡単なグラフにて表現することを試みた。

1 緒 論

口紙電気泳動法は普通、口紙 1 cm あたり 2~10 V の電位こう配下で口紙を水平空間に保持する open-strip filter paper type が用いられているが、1951 年以降 Michl¹⁾, Kickhöfen および Westphal²⁾, Turba³⁾, Lange⁴⁾, Heilmeyer⁵⁾ らによって 20~100 V/cm の高電位こう配での泳動法が発表され、わが国においても佐野⁶⁾, 宮本⁷⁾らによってこの方法が導入開発されてきた。そして最近では、この高電圧泳動法は従来のものに比べて泳動速度の増大により低分子物質の口紙上における拡散をおさえ泳動分離できる特徴があることが知られてきた。しかるに電解液に浸した口紙に高電圧を加えて行くと、いかにその条件（電解液のイオン強度を小さくし、口紙の電解液含量を減少させるなど）を調節してもなお口紙上の泳動電流が増大するのは当然であり、この時ジュール熱が大量に発生するのをさけることはできない。実際、室温下で open-strip type に 20~40 V/cm 程度の電位こう配を設けるとほとんどの場合、ジュール熱により口紙中央部からの乾燥または焼切れなどがおこり、泳動不能になってくる。

著者はこのジュール熱による影響を除くのに特別な冷却用有機溶媒を使用せず、Tiselius-Kunkel⁸⁾ のガラス板法により口紙を密閉冷却しようと試みた。すなわち2枚のガラス板で口紙をはさみこみ、これに簡単な水冷却器をとりつけた泳動用口紙固定台を自製し (sandwich type と仮称した)、これと従来から用いられている open-strip type の泳動装置とを用いて、口紙上物質の移動に

対するジュール熱およびそのために生じる電解液の蒸発と口紙の毛細管浸透作用による陰陽両電解液室からの電解液の流れについて調べた。その結果口紙のジュール熱に起因する影響は open-strip type では著しく現われ、泳動に使用できる口紙の有効な長さはかなり短い。これに対して、sandwich type では口紙が一応密閉冷却されているためジュール熱に起因する影響はきわめて小さくなり、一応、口紙面の全部が泳動に使用できることを知った。そこでこの sandwich type の口紙固定方式にて高電圧を加えることを検討し、一応、100 V/cm 程度の高電位こう配下においても安定した泳動を実施できる口紙固定台を試作した。そして高電圧下における口紙の発熱、口紙上よりの電解液の蒸発、これに伴う電解液の毛細管浸透作用を十分におさえることができた。

2 sandwich type と open-strip type との比較検討

2.1 実験装置

Fig. 1 に示した Tiselius-Kunkel のガラス板方式に水冷却器に下側より装着したものを自製した。このガラス板で口紙をはさむ方式は、その欠点として分離像の不鮮明さがいわれているが、著者はワセリン、シリコングリース、固型パラフィンなどの化学的安定な撥水性のものでガラス面にコーティングをすることにより十分使用できた。

2.2 泳動試料

口紙電気泳動法は陰陽両電解液室を口紙で連結してあるため、毛細管浸透作用による電解液が口紙中央部に向

* 京都大学薬学部：京都市左京区吉田近衛町

Fig. 1 Section view of closed type (Sandwich type) electrophoresis deck

A: Platinum electrode
B: Electrode vessel (KCl solution)
C: Electrolyte vessel (5M CH_3COOH)
D: KCl-Agar bridge E: Glass plate
F: Filter paper G: Water cooler

って移動する傾向をもっている。それでこの電解液の流れに影響されにくいものを泳動試料に用いることが必要であり、著者は **magnoflorine-picric** を用いた。このものは四級塩基のピクリン酸塩であるため、一般の分子化合物によく見られるように、通常のペーパークロマトグラフィーにおいて一定の R_f 値を示しにくく、かつ泳動により容易に塩基と酸とに分離されて、それぞれ陰極側および陽極側へ移動する。そしてこの両者の荷電の強さに移動距離はだいたい比例していて、そのうえ **picric acid** の黄色は泳動状況を観察できる利点がある。

泳動終了後の **magnoflorine** はヨウ化カリウム塩化白金試液で呈色させて検知した。

2.3 口紙および電解液

口紙は東洋口紙 No. 50 および No. 51A を 10×40 cm の大きさで使用した。

電解液には 5M 酢酸を使用し、左右の電解液面間の口紙の長さを約 38 cm に調節し、泳動に使用できる口紙面の長さは 22 cm とした。

2.4 実験結果

2.4.1 sandwich type における口紙の温度 15～16°C の水道水を冷却器に入れ、2000 V、約 20 mA で 180 分間通電したとき口紙中央部の温度は 23～26°C であった。この程度では一応室温での条件といえる。この温度は医療用皮フ表面温度計にて測定した。

2.4.2 試料塗布位置 (sampling position) と泳動方向および泳動像について Fig. 2 に示すように口紙中央部および中央より陽極側へ 5 cm, 10 cm, また陰極側へ 5 cm 離れた位置、合計 4 カ所にそれぞれ試料を塗布し、800 V (約 21 V/cm) にて泳動を行なった。その結果を Fig. 3, 4 に示す。Fig. 3 は open-strip type, Fig. 4 は sandwich type である。(A) は No. 50, (B) は

Fig. 2 Sampling position

Fig. 3

Fig. 4

No. 51A のロ紙を使用した場合で、ロ紙中央に **sampling position** を設けた場合 **magnoflorine** は陰極側へ、**picric acid** は陽極側へ泳動しているが、中央より陽極側 10 cm のところに **sampling** をした場合は陽極方向へ泳動されるべき **picric acid** が反対方向である陰極側へ移動している (Fig. 3). また泳動方向が逆になったのみならず、泳動像も著しく拡散していることがわかる。これに対して **sandwich type** では Fig. 4 に見られるとおり、このような現象は認められない。 **open-strip type** ではジュール熱によりロ紙の発熱が大きく、そのためロ紙面よりの電解液の蒸発が盛んとなった結果、失われた電解液の補給がロ紙の毛細管浸透作用により中央に向かって行なわれることになる。このような電解液の移動の速さがロ紙上物質の泳動速度を上まわった結果が Fig. 3 に見られる現象と考えられる。このことから **sandwich type** はこのようなロ紙のジュール熱の影響に対する有効な一方式であるといえる。いいかえると泳動電圧を **open-strip type** では不可能な程度にまで高くすることができるわけである。

2.4.3 泳動距離 前節と同じ泳動を 400V (11V/cm) でそれぞれ 60, 90, 120, 180 分行なって **picric acid** ~ **magnoflorine** 間の距離と **sampling position** とを調べた。Table I に示すように (A) は **open-strip type**, (B) は **sandwich type** での結果である。すなわち、**sampling position** により泳動距離は (B) に比べて (A) はかなり不ぞろいである。そしてまた、平均した泳動距離も (A) は (B) よりかなり小さいことがいえる。次に同じ泳動を 700V で行なった場合を、泳動距離 ~ 時間の関係でグラフに示したのが Fig. 5 である。このグラフより 400V で泳動を行なう場合は、(A) **open-strip type**, (B) **sandwich type** のいずれの方式でも一応直線的な結果が得られているが、700V で行なった場合は、**open-strip type** は前述したジュール熱の影響が著しく現われて泳動速度は一定でなく、とくに泳動時間が 120~180 分間におよぶと全く直線関係が得られず、結果の再現性は乏しい。このことから、前節で述べたように **open-strip type** は低電圧 (10V/cm 以下) の条件においてのみ使用できることがわかる。

2.4.4 sandwich type における泳動速度と使用可能電圧 泳動時間を 30 分として電圧 ~ 泳動距離を調べたのが Fig. 6 である。電圧は 400V より 200V ずつ高くして行き最高 2600V まで使用した。グラフに見られるとおり、400V より 1200V までと、1600V より 2600V までの間では電圧 ~ 泳動距離は直線関係を示して泳動速度は電圧に比例しているが、1200~1600V の間ではこ

Table I Migration distance between **magnoflorine** and **picric acid**

		Time (min)			
		60	90	120	180
A	Sampling position + 10 cm	24 mm	41 mm	48 mm	91 mm
	+ 5 cm	25	44	57	98
	Center	30	42	60	94
	- 5 cm	27	46	64	78
	Average	21.5	43.1	57.2	90.2
B	Sampling position + 10 cm	30 mm	50 mm	64 mm	118 mm
	+ 5 cm	31	50	68	112
	Center	30	50	70	112
	- 5 cm	29	50	72	112
	Average	30	50	68.5	113.5

A: Open strip type B: Sandwich type

400 volt, 5M CH₃COOH

Toyo Roshi: Filter paper No. 50, 40×10 cm

Fig. 5 Relationship between migration rate and voltage

5M CH₃COOH; Toyo Roshi: Filter paper No. 50, 40×10cm

のような直線関係は見られず、泳動速度が乱れている。すなわち、400~1200V までに見られた泳動速度はこの 1200~1600V の間で変動し、1600V 以上の電圧において、より大きい泳動速度を示している。この泳動速度が二次的に変化してきたことは、No. 51A のロ紙の場合一層明瞭に見られた。この原因については目下不明であるが、著者はこの泳動速度が二次的に変化する電圧をもって一応高電圧泳動法と、低電圧泳動法とに区別することの適否を検討している。この実験において 2000V 以

上の電圧を加えた場合、ガラス板の両端と電解液室との空間に露出している口紙の部分がジュール熱により蒸発乾燥しやすく、安定した泳動を行ないにくいことがわかった。すなわち、この空間に露出している口紙の部分よりの電解液の蒸発を防止すれば、この sandwich type で容易に高電圧を加えることにより泳動させることが可能であることがわかった。

Fig. 6 Effect of voltage on the migration distance between magnoflorine and picric acid

Toyo Roshi: Filter paper No. 50, 40×10cm
5MCH₃COOH
Sandwich type (with water cooler) 30min.

Fig. 7 Sectional view of closed type (Glass plate sandwich type) high voltage electrophoresis deck

A: Platinum electrode B: Electrode holder
C: Boundary of electrolyte vessel
D: Condenser E: Electrolyte
F: Filter paper strip G: Glass plate

3 sandwich type による高電圧泳動用口紙固定台の試作

3.1 口紙固定台

前節で述べた sandwich type に改良を加えて Fig. 7 に示したものを試作した。Fig. 7 は横断面を示してあ

る。ガラス板 G₁ の下側に水冷却器 D を取付けて冷却水をガラス板 G₁ の下側に噴射するようにして冷却できるようにした。ガラス板 G₁ (185×70×3mm) に口紙 F をのせ、上側にガラス板 G₂ (110×80×5mm), G₃ (15×80×5mm) で密着固定する。このガラス板 G₂ を陰極側、陽極側へそれぞれ伸ばしておき、口紙 F の両端が電解液に浸漬しているところの電解液室 E のふたになるようにしている。ここで電解液室 E を空間に開放した状態におくことは前述の通り高電圧を加えるのに適さない。この結果、口紙 F はガラス板 G₁, G₂, G₃ で完全に密閉され、電解液室 E も外界と仕切られた状態になる。このため、従来の高電圧泳動法に用いられている n-ヘキサンなどの特別な冷却用有機溶媒中に泳動口紙を浸漬して密閉した場合と同様な効果を簡単に得ることができ、そのうえこれら有機溶媒に可溶性の試料をも泳動の対象にできる利点がある。

電解液室 E は小穴を有する仕切板 C にて電極室に連絡している。この電解液室 E もまた Fig. 7 に示すように冷却器 D に密着させて電解液の冷却をも行なわせている。

電極 A は樹脂棒に白金線を巻きつけたもので、これを保持筒 B により電極室にとりつけた。

3.2 電源部

Fig. 8 に配線図を示す。電圧切換を高圧用トランス (T₁) の 1 次コイルで行ない、倍数関係の電圧を得るようにした。

Fig. 8

3.3 口紙の長さ

前述のように泳動電流、試料の移動とは無関係に口紙両端から口紙中央部に向う電解液の流れが生じる。この流れは口紙の発熱に比例するとともに、口紙の長さにも比例している。この影響を小さくするには口紙を小型化することが最も効果的であると考えられるので、著者は口紙の長さを 22~23 cm、泳動に使用できる長さを 18.5

cm にし、口紙両端の電解液面間の口紙の長さは 20 cm になるようにした。この sandwich type は泳動に利用できる口紙の長さは open-strip type に比べて大きい

Fig. 9 Sampling position on paper

Fig. 10 The relationship between migration distance and sampling position

Experimental equation: Picric acid $y=0.03x+22$
 Magnoflorine $y=0.02x-19$
 11.5V/cm, 60min, in pH 1.5HCOOH-CH₃COOH-H₂O, Toyo filter paper No. 50, 2×23cm, in the horizontal sandwich type electrophoresis deck Sample: Magnoflorine-Picrate

ため、本器での泳動部分(約 18 cm)は 40 cm の口紙を使用した場合の open-strip type とほぼ同程度となり、有機化合物一般の泳動分析に十分な大きさである。また口紙を小型化したために冷却効果を高めることができ、さらに電源を小型にすることができた。

3.4 泳動距離と sampling position

Fig. 9 に示すように口紙の中央および陽極側、陰極側にそれぞれ 3 cm, 6 cm 離れた位置に magnoflorine-picric acid を sampling し、pH 1.5, HCOOH-CH₃COOH-H₂O の電解液により 11.5 V/cm, 60 min 泳動を行ない分離した magnoflorine ~ picric acid の距離を調べた。その結果を Fig. 10 のグラフに示す。x 軸は sampling position を口紙中央からの距離で示しており、陽極側 6 cm, 3 cm, 中央(原点), 陰極側 3 cm, 6 cm の 5 点をとった。泳動距離を陽極、陰極に向う場合をそれぞれ、⊕, ⊖ として y 軸で表わしてある。分離泳動された picric acid は ⊕ 側に、magnoflorine は ⊖ 側に移動しているが、両者とも x 軸に平行に近い直線となっており、これを一次式にて表わすと picric acid は $y=0.03x+22$, magnoflorine は $y=0.02x-19$ となる。すなわち、x 軸に対するこの配係数 a は 0 に近いことから、ほぼ平行関係と見なすことができる。一定の物質について泳動条件が同じ場合に、 a が小さいことは sampling position による泳動距離のふれの小さいことを示し、泳動結果の再現性のよいことを意味している。この場合は口紙上での電解液の毛細管浸透作用の泳動速度に及ぼす作用の僅少であることを示している。同様な実験を 22.5 V/cm で 24 min, 45 V/cm で 12 min,

Fig. 11 The relationship between migration distance and sampling position

Experimental equation:

(1) Picric acid: $y=0.03x+21$,
 Magnoflorine: $y=0.03x-17$,
 22.5 V/cm, 24min

(2) Picric acid: $y=0.06x+18$,
 Magnoflorine: $y=0.07x-17$,
 45 V/cm, 12min

(3) Picric acid: $y=0.08x+22$
 Magnoflorine: $y=0.05x-21$
 90 V/cm, 6min

Toyo filter paper No. 50, 2×23cm, pH 1.5 HCOOH-CH₃COOH-H₂O, in the horizontal sandwich type electrophoresis deck Sample: Magnoflorine-Picrate

90 V/cm で 6 min とそれぞれ行なって a の値を求めた (Fig. 11). すなわち, a の値は picric acid では 0.03, 0.03, 0.06, 0.08, また magnoflorine では 0.02, 0.03, 0.07, 0.05 となり, 電圧を高くして行くと少しずつ大きな傾向をもっているが, いずれの場合でも小さい.

この結果から, 試作した sandwich type のロ紙固定方式は泳動電流に起因するジュール熱でロ紙が発熱し, ロ紙上電解液の蒸発はかなり抑制されていることがわかった. このためロ紙上物質の移動に及ぼす電解液のロ紙毛細管浸透作用は一応無視できるものとなった.

4 結 論

(1) ロ紙電気泳動法におけるロ紙固定方式として, ロ紙を水平空間に保持する open-strip type と, ガラス板でロ紙をはさんで密閉固定する sandwich type とを使用して, 泳動電流に由来するジュール熱のロ紙上での影響を調べた.

(2) ロ紙の発熱は open-strip type においてきわめて大きく, そのため sampling position が泳動結果に大きく関係し, ある場合には結果の判定を誤ることがある.

(3) sandwich type では高電圧を使用することが可能であり, それで 100 V/cm 程度の高電位こう配でも安定した泳動を実施できるロ紙固定台を試作した.

(4) 試作器ではジュール熱による種々の影響を少なくすることができ, 結果の再現性は良好であった.

(5) 泳動結果の再現性を簡単なグラフで表現することを試みた.

本研究に際し御指導を賜った京都大学薬学部富田真雄教授ならびに原稿の御校閲をいただいた宇野豊三教授

に謝意を表します. また, 種々御助言をいただいた井上博之教授, 穂積啓一郎博士に感謝します.

文 献

- 1) H. Michl: *Mh. Chem.*, **82**, 489 (1951).
- 2) B. Kickhöfen, O. Westphal: *Z. Naturforsch.*, **76**, 655 (1952).
- 3) F. Turba, *et al.*: *Hoppe-Seyler Z. physiol. Chem.*, **296**, 97 (1954).
- 4) G. Lange: *Biochem. Z.*, **326**, 172 (1955).
- 5) L. Heilmeyer, *et al.*: *Klin. Wschr.*, **32**, 831 (1954).
- 6) 佐野 勇: 日本医事新報, No. 1533, 64 (1953), No. 1610, 28 (1955).
- 7) 宮本 璋: 生化学, **29**, 731 (1957).
- 8) H. G. Kunkel, A. Tiselius: *J. Gen. Physiol.*, **35**, 89 (1952).

☆

Studies on the filter paper electrophoresing deck. Kan-ichi KONOBU (Faculty of Pharmacy, Kyoto University Sakyo-ku, Kyoto)

The electrophoresing migration substances on the filter paper as well as the evolution of heat by electrophoresing current and accompanying evaporation of electrolyte and capillary flow of electrolyte toward the center was compared on an open-strip in a horizontal position and on a filter strip sandwiched between two glass plates in a closed system with cooling. The openstrip type showed considerable heat evolution and the direction, pattern, and velocity of migration were much influenced. The reproducibility was poor and it was quite difficult to keep high voltages in the electrophoresis. The sandwich method was less influenced by these factors, giving good reproducibility and an availability for high voltage. A sandwich-type filter paper deck for high voltage was devised by the author, and the reproducibility of the measurements was illustrated in a single monograph.

(Received July 30, 1962)