

## 実験 F-2 (ろ紙電気泳動による低分子化合物の分離)

共同実験者:藤田悠介, 古川絢深

### 1. 目的

電気泳動法により試料の分離が可能であることを確認する。また、アミノ酸を試料として、試料の電気移動度が泳動媒体の pH によって変化することを確認する。

### 2. 実験

#### 2.1. 条件

実験 A 水性インクの変色	実験 B アミノ酸の変色
試料:水性インク (黒, 赤, 黄緑, 緑)	試料:アミノ酸 (Trp, Gly, Glu, His, Arg)
印加電圧:300 V	印加電圧:300 V
測定時間:10 min	測定時間:12 min
泳動媒体:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 緩衝溶液 pH 6.7	泳動媒体:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 緩衝溶液 pH 6.1, 6.7, 7.3, 7.9

#### 2.2. 操作

##### 2.2.1. 実験 A 水性インクの変色

- ① 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液 5.65 mL と 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液 4.35 mL を、マイクロシリンジを用いて混合し 50 mL に希釈した。この水溶液を pH 6.7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 緩衝溶液とする。
- ② 条件通りに水性インクの変色を行った。

##### 2.2.2. 実験 B アミノ酸の変色

- ① マイクロシリンジを用いて 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液を、それぞれ 8.50, 5.65, 2.30, 0.70 mL とり、100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液を、それぞれ 1.50, 4.35, 7.70, 9.30 mL 加え混合したのち 50 mL に希釈し、pH をそれぞれ条件どおりに作成し泳動媒体とした。
- ② 条件通りに各 pH ごとに泳動媒体を交換し、アミノ酸の変色を行った。

### 3. 結果

#### 実験 A

##### A.3.1. インク成分の分離

図 A のように分離された。

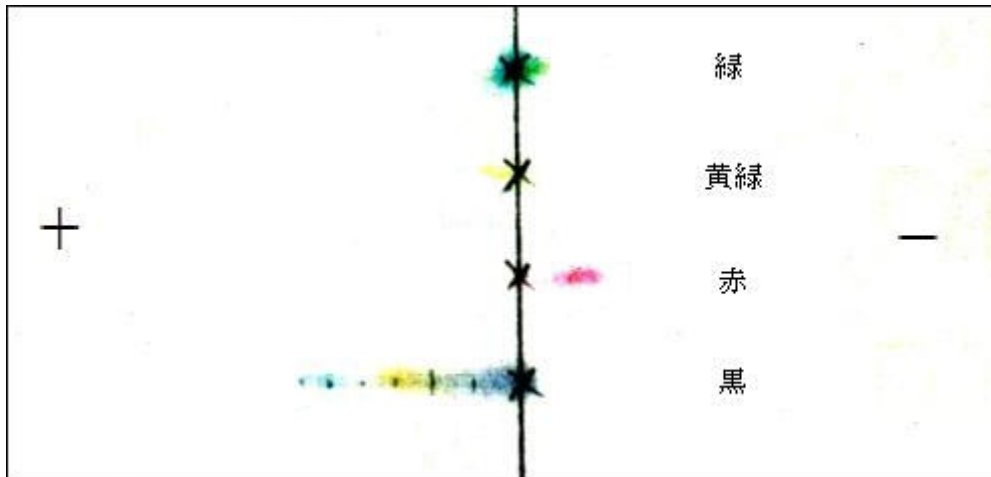


図 A 水性インクの電気泳動結果

#### 実験 B

##### B.3.1. 等電点 pI と各 pH における電気移動度の関係

次項に、測定結果のグラフを作成した。これらのグラフは、各アミノ酸の等電点と電気移動度の推移を比較できるように作成してある。また、電気移動度の正方向への増加は、陰極への電気泳動距離が増加したことを指す。

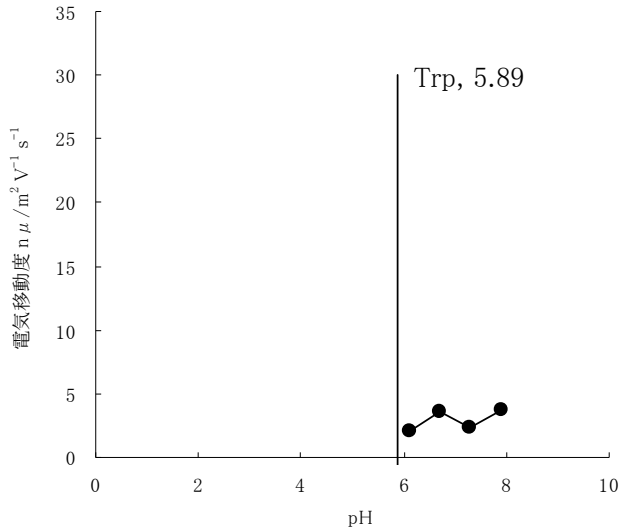


図3.1.1. 等電点pIと各pHにおける電気移動度の関係

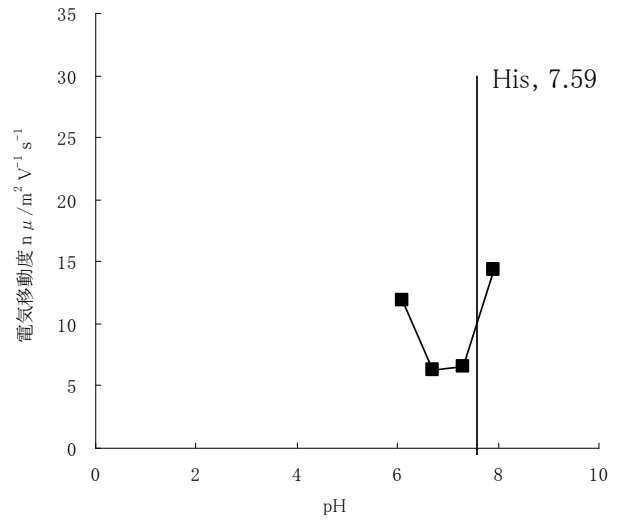


図3.1.2. 等電点pIと各pHにおける電気移動度の関係

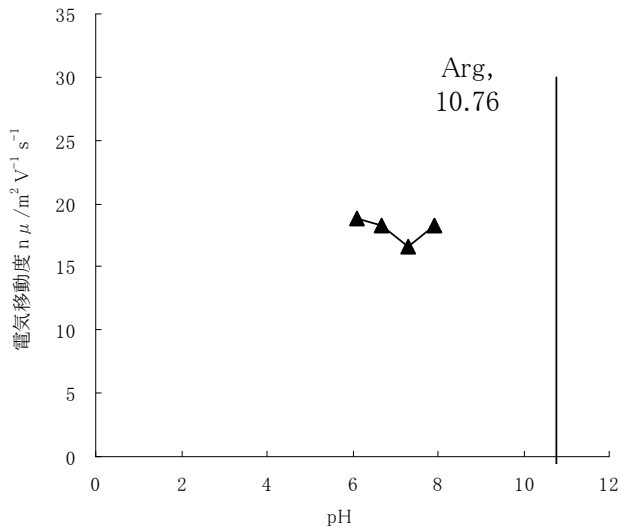


図3.1.3. 等電点pIと各pHにおける電気移動度の関係

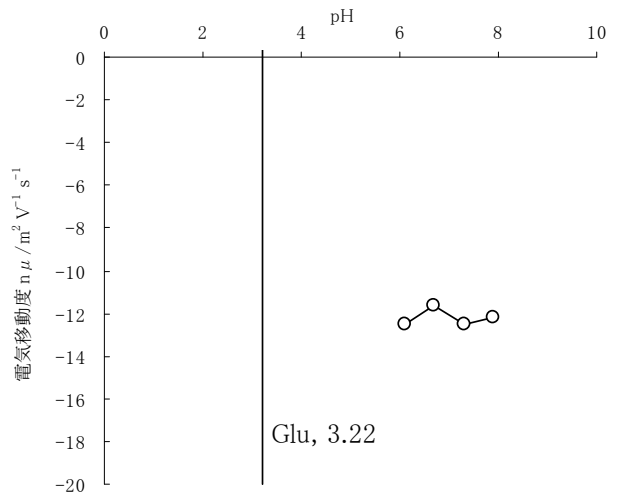


図3.1.4. 等電点pIと各pHにおける電気移動度の関係

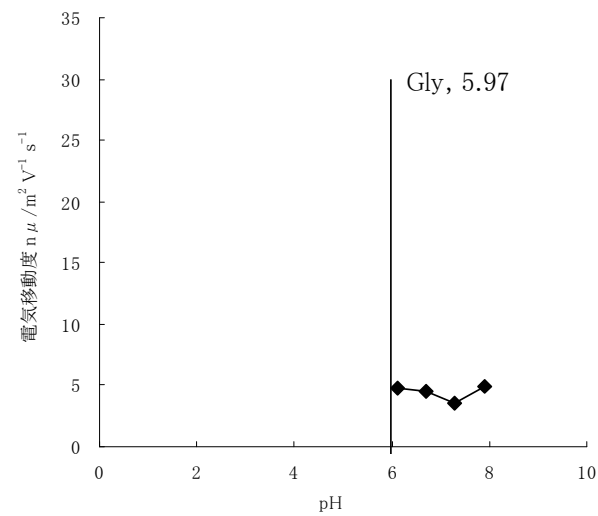


図3.1.5. 等電点pIと各pHにおける電気移動度の関係

### B.3.2. 測定したアミノ酸全体の等電点 pI の順と電気移動度の順の関係

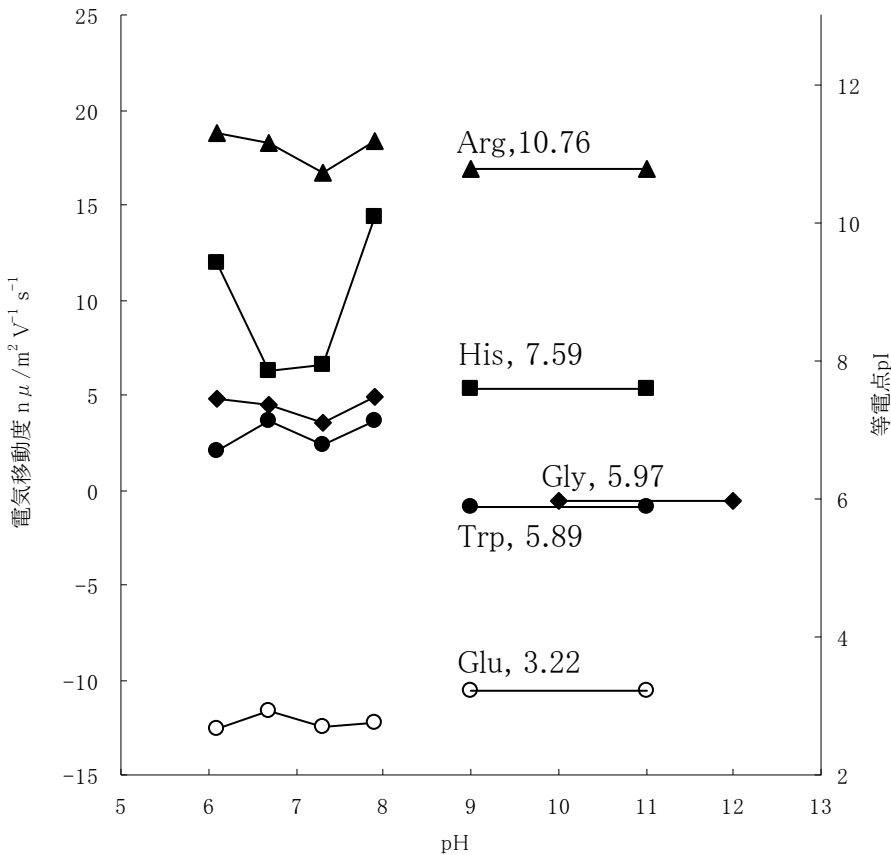


図3.2.1. 等電点pI の順と電気移動度の順の比較

測定結果をもとにグラフを作成した. 等電点を右側第二 Y 軸に等電点の順を対応させ, 左側第一 Y 軸には電気移動度の推移を示した. なお, Gly と Trp の等電点は, 非常に近い値であったので, 重なって見にくくなることを考慮し少々ずらして示してある.

## 4. 考察

### 実験 A

#### A.4.1. 電気泳動法により試料の分離が可能であるか

図 A のように, 水性インクは確かに電気泳動法により分離された. 特に, 黒色インクについては複数の色の混合物であることが分かり, 単色で黒ではないと分かる. さらに, pH 6.7 において, 緑色は泳動をあまり起こさなかったことから電氣的に中性であり, 黄緑色はやや陽極へ泳動したことからやや負電荷の影響が強いと分かる. 赤色は陰極に泳動したことから正の電荷の影響が強く, 黒色の各成分は陽極に向かっていることから負の電荷の影響が強いとわかる.

このように, 電気泳動法は粒子の種類によって特有の速度で移動するので, それらの粒子を種類別に分別することが可能である.

## 実験 B

### B.4.1. 等電点 pI と各 pH における電気移動度の関係

図 3.1.1.-図 3.1.5.について考察する. プロットが少ないために, 一概には言えないが, 確かに試料の電気移動度が泳動媒体の pH によって変化している. ときどき, プロットが一貫性が無くグラフが揺れているのは, 泳動媒体の濃度の調製時の誤差か, またはろ紙電気泳動を行った際, かなり試料がにじんで広がっていたり, テーリングしたりしていたため, 正確な移動距離を計測できなかった可能性がある. 特に, にじんでいたものは半径 8 mm ほどあり, 最も離れたものは 35 mm ほどもあった. したがって, 4 点一つ一つを細かに観察するのではなく, 全体の統一性を重視し, 観察・考察していくこととする.

なぜにじんでいたかについてであるが, ろ紙上の一定方向に電場をかけたとしても, ろ紙上に試料が固定されているわけではないので, 一点にアミノ酸試料, すなわち電荷が偏ることにより, それを緩和する向きに物質拡散が起こる. したがって, これによりにじんでしまったと考えられる.

#### B.4.1.1. Trp の測定結果について

pH が減少するにつれ, おおむね電気移動度は減少している. したがって, pH が減少し, 等電点に近づくほどあまり移動しないとわかる. これは, アミノ酸は等電点以外では電価をもっており, そのために電場を印加すると電気泳動を強く行うようになるためである. 理論上, 等電点に近づくにつれ電気移動度は減少し, 等電点では電気移動度は 0 となる. これを, 以下では「移動度が落ち込んでいく」と表現することとする.

#### B.4.1.2. His の測定結果について

この測定結果でも, 確かににおおむね移動度が落ち込んでいくのが観察され, 等電点において移動度の変化量が負から正へ変化していた. これは, 図 B.4.1.2.のように, 全体がはじめ pH < 7.59 以下のときは正に帯電しているために陰極に電気泳動し, 等電点で電荷がつかない, pH > 7.59 では電荷が負となり陽極へ電気泳動したためと考えられる.

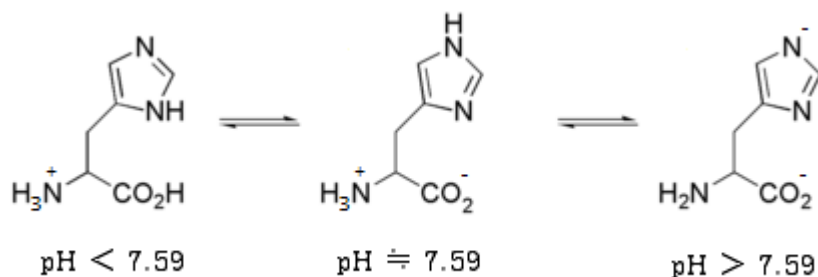


図 B.4.1.2. His の等電点での変化

しかし, 電気移動度は確かに変化したが, 電気移動度が 0 となることは観察されなかった. これは, 課題に述べるように, 電気浸透流の影響によるものである.

#### B.4.1.3. Arg の測定結果について

この測定結果でも、等電点 pI 10.76 とかなり測定した pH と離れているが、確かにおおむね移動度が落ち込んでいくのが観察された。

#### B.4.1.4. Glu の測定結果について

この測定結果は、あまり移動度が落ち込んでいないように観察された。しかし、プロット点は先述したように、誤差を多分に含んでいるものであるから、このほかにも多く測定点を取ることや、キャピラリーゾーン電気泳動法などで測定を行う必要がある。キャピラリーゾーン電気泳動法においては、電気浸透流と溶液の粘性との関係から、キャピラリー内の溶液は栓流となって移動する。したがって、層流による流れ方向の混合、拡散は本質的に発生せず、非常に高い分離度が得られる。

#### B.4.1.5. Gly の測定結果について

Gly の測定結果も Glu と同様に誤差による影響で移動度が落ち込まなかったのではないかと考えられ、Glu と同様の方法で解決できる。

### B.4.2. 測定したアミノ酸全体の等電点 pI の順と電気移動度の順の関係

図 3.2.1. より、等電点と電気移動度の順は見事に一致したことが分かる。したがって、この実験結果ではアミノ酸は等電点の順に並ぶと考えられる。

## 5. 課題

### 5.1. イオンは同一で、電気移動度を変化させる要因は、pH の他に何が考えられるか。

イオンは同一であるため、それ自体の粒子の形、大きさ、電気運動学電位はその電荷密度も同一である<sup>[2.1.]</sup>。この他に電気移動度に影響を与えるものとは、泳動媒体の粘性が挙げられる。

表面が帯電しているコロイド粒子が電解質溶液の中で分散しているとき、外部から直流電場をかけると粒子は電場からの影響を受けて動き出す。粒子は次第に速度を増すが、やがてその速度は液体からの粘性抵抗とつりあったところで一定値になり、等速運動をするようになる<sup>[1.1.]</sup>。これが電気泳動と呼ばれる現象であり、粘性は抵抗であるので、それが高いと電気移動度は低下するとわかる。

## 5.2. 今回の実験においてアミノ酸の等電点だけでは電気泳動挙動を説明することが不可能な場合、どのような現象を仮定すればこれを説明できるか。

本実験のような場合は、イオン自身が泳動する電気泳動現象の他に、ろ紙表面の電気二重層により生じる電気浸透流による影響があったと仮定することで説明できる。ろ紙が泳動媒体により満たされることで、表面およびこれと接する緩衝液との間に電気二重層が形成される。ここに高電圧が印加されると、陽極から陰極に向けて液体移動（電気浸透現象）が発生する。この流れが電気浸透流である。緩衝液の pH（塩基性側で速い）やイオン強度により速さが異なり、酸性側（およそ pH 3 以下）ではほとんど観察されなくなる<sup>[3.]</sup>。

電気浸透流の速度と電気泳動移動度とのベクトル和が、目的とするイオン性物質の分析時間、分離度を決定する。また、本実験では中性物質の分離 (Gly と Trp) は非常に難しいが、ミセル動電クロマトグラフィーを採用することで解決できる<sup>[4.]</sup>。このために、His の電気移動度は等電点でも 0 とはならなかったと考えられる。

## 7. 参考文献

- [1.] 筑波微粒子・界面・環境研究会, 2004  
[http://tsukubabiryuushi.jpn.org/TPIEN2/furusawa\\_07\\_30.pdf](http://tsukubabiryuushi.jpn.org/TPIEN2/furusawa_07_30.pdf)
- [2.] 若手研究者のための機器分析ラボガイド  
2006, 初版, 澤田清 著, 講談社  
[2.1.] p 104
- [3.] 大塚電子株式会社  
[http://www.photal.co.jp/book/capi\\_01\\_02\\_1.html](http://www.photal.co.jp/book/capi_01_02_1.html)
- [3.] ミセル動電クロマトグラフィー  
[http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/JAPANESE/RESEARCH\\_J/CE\\_J/ce\\_j.html](http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/JAPANESE/RESEARCH_J/CE_J/ce_j.html)