

Title	Gel-filtration法による血液成分の研究 : (1)全血カルシウムの定量
Sub Title	Studies on blood constituents by gel-filtration : (1) quantitative determination of calcium in whole blood
Author	宮本, 貞一(Miyamoto, Sadaichi) 三島, 和子(Mishima, Kazuko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1962
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.6(1961)/7(1962) ,p.35- 40
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000006-0035

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Gel-filtration 法による血液成分の研究

(1) 全血カルシウムの定量*

宮本貞一, 三島和子

Studies on Blood constituents by Gel-filtration

(1) Quantitative determination of Calcium in Whole blood

Sadaichi Miyamoto and Kazuko Mishima

血液カルシウムは赤血球内にはほとんど存在せず, 血清中に結合カルシウムおよびカルシウムイオンとして存在し結合カルシウムは主として蛋白質と結合している。血液カルシウムの定量は赤血球存在下においては困難であるから, すべて血清について行なわれている。血清カルシウムの定量法は従来の修酸塩沈澱分離法の外に比色法, 比濁法, キレート滴定法, 炎光光度計法などが挙げられるが, 今日主として比色法およびキレート滴定法が一般に頻用されているようである。

血液成分の定量法は反応の鋭敏なことは勿論必要であるが, 同時に試料がなるべく少量で足りることや操作が容易迅速であることが望ましい。ところがこれらカルシウム定量法では, まず血清を分離しなければならないことから所要血清量の少なくとも3倍量の全血を要し, また血液が少しでも溶血していれば分離血清が着色して指示薬の変色点の見分けが困難になるなどの欠点がある。

我々は全血をそのまま Sephadex によつて gel-filtration¹⁻³⁾ してまずカルシウムを血球その他の蛋白質と完全に分離した後, カルシウム劃分についてキレート滴定法でカルシウムを定量する方法を考案し, 従来欠点とされていたところをいささか解決することができたのでその結果を報告する。

実 験 の 部

試 薬

1. Sephadex—Pharmacia 製 G-25 course を使用
2. Column—径 1 cm, 長さ 25~30 cm
3. 溶剤—生理食塩水 (特級塩化ナトリウム使用)
4. EDTA—0.001 M, 同仁薬化学製
5. N.N.—同仁薬化学製
6. カルシウム標準液—血清カルシウム濃度に近いように Ca 0.1 mg/ml を使用
7. 血液—血清の場合は常法により遠心沈澱して得る。全血の場合はヘパリン添加で凝固を阻止する。なお水はすべてイオン交換樹脂による純水を更に蒸溜したものをを用いた。

実験方法

まず Sephadex の粒子を 0.1% 食塩水中で 2~3 時間膨潤させてから Column 中に 13~16 cm の層に充填する。Column 上方から溶剤を流入し下方に滴下させ Sephadex が溶剤で飽和されたとき試料を加えることができる。

試料を加える前に Sephadex 層の上方に溶剤を少量 (試料とほぼ同量) 残して溶剤の流入をとめ, また下

* 第5回薬学会関東支部大会にて発表

1) Porath, J. & Flodin, P.: Nature 183, 1657 (1959)

2) Gelotte, B.: J. Chromatog. 3, 330 (1960)

3) Spitzzy, H., Skrube, H. & Müller, K.: Microchim. Acta (1961), 296

方のコックをとめて流出を一時中止する。充填層上部，溶剤の少量残つているところに，ピペットで一定量の試料を静かに加える。それから下方のコックを開いて液の流出を始め上方に液層がなくなりかけたとき溶剤を試料とほぼ同量加えて流出を続ける，この操作を2回くり返すことによつて壁に付着する試料を完全に充填層内に流入する。以後は常に溶剤の流入液層を，充填層上方に一定の高さに保つようにながら，約2 ml/min の流出速度で流出させる。流出液は1 ml 宛分取し，あるいはカルシウム劃分のみを集めて，N.N. を指示薬として0.001 M EDTA で滴定してカルシウム定量を行なう。

Fig. 1 はカルシウム標準液0.5 ml および全血0.5 ml を用いた場合のそれぞれの通過曲線であるが，カルシウム劃分はどちらも大体同じ位置に出る。血液の場合，血球および蛋白質はカルシウムと完全に分離し，初めに流出されている。ただしこの図に示す蛋白質の曲線は定量値ではなく単に流出位置のみを参考に示し

Fig. 1

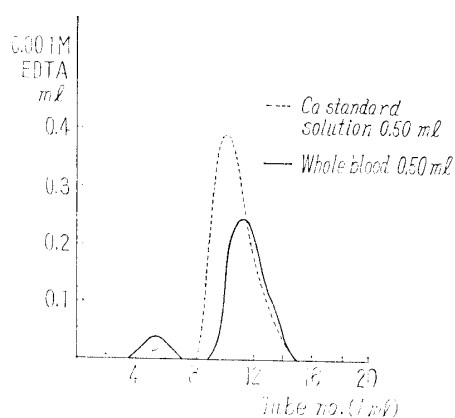


Fig. 2

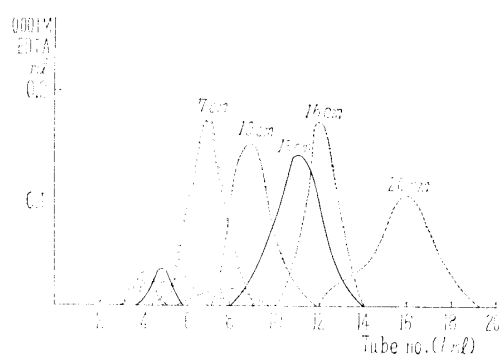


Table I.

Tube No. (1 ml)	0.001 M EDTA ml for Ca standard solution (0.100 mg/ml)		
	0.5 ml	1.0 ml	0.5 ml
1	0	0	
2	0	0	
3	0	0	No. 1—7
4	0	0	(7 ml)
5	0	0	
6	0	0	omitted
7	0	0	
8	0	0	
9	0.17	0.67	
10	0.39	1.08	
11	0.35	0.41	No. 8—16
12	0.18	0.16	(9 ml)
13	0.10	0.06	
14	0.03	0.03	taken
15	0	0	
16	0	0	
17	0	0	
18	0	0	
19	0	0	
20	0	0	
Total ml	1.22	2.41	1.21
Ca found mg	0.0488	0.0965	0.0485
Ca theoretical mg	0.0500	0.1000	0.0500

Table II.

Tube No. (1 ml)	0.001 M EDTA ml for Serum			
	0.125 ml	0.250 ml	0.125 ml	0.250 ml
1	0	0		
2	0	0		
3	0	0	No. 1—7	No. 1—7
4	P 0	P 0	(7 ml)	(7 ml)
5	P 0	P 0	omitted	omitted
6	P 0	P 0		
7	0	0		
8	0	0.03		
9	0.06	0.10		
10	0.10	0.13	No. 8—16	No. 8—16
11	0.06	0.12	(9 ml)	(9 ml)
12	0.06	0.10	taken	taken
13	0.03	0.06		
14	0	0.03		
15	0	0.03		
16	0	0		
17	0	0		
18	0	0		
19	0	0		
20	0	0		
Total ml	0.31	0.60	0.30	0.61
Ca found mg	0.0124	0.0240	0.0120	0.0244
Direct titration ml	0.31	0.60		
Ca found mg	0.0124	0.0240		

Table III.

Tube No. (1 ml)	0.001 M EDTA ml					
	Whole blood 0.50 ml	Whole blood 0.50 ml + Ca 0.05 mg	Whole blood 0.50 ml	Whole blood diluted 2 × 1.00 ml	Whole blood 0.25 ml	Whole blood diluted 2 × 0.50 ml
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0
5	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0
6	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0
7	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0	P 0
8	0	0.15	0	0	0	0
9	0	0.25	0	0	0	0
10	0.15	0.47	0.06	0.10	0.10	0.06
11	0.25	0.51	0.21	0.23	0.12	0.10
12	0.20	0.32	0.19	0.25	0.12	0.12
13	0.12	0.17	0.17	0.12	0.03	0.06
14	0.03	0.06	0.10	0.06	0	0.03
15	0	0.05	0.03	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
Total ml	0.75	1.98	0.76	0.76	0.37	0.37
Ca found mg	0.0301	0.0793 (0.0801)	0.0304	0.0304	0.0148	0.0148

Table IV.

Length of column cm Tube No. (1 ml)	0.001 M EDTA ml for each 0.25 ml of whole blood				
	7	10	13	16	20
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	P 0	P 0	P 0	0	0
4	P 0	P 0	P 0	P 0	0
5	P 0	P 0	P 0	P 0	0
6	0.10	0	P 0	P 0	P 0
7	0.17	0	0	P 0	P 0
8	0.06	0.10	0	0	P 0
9	0	0.15	0.03	0	P 0
10	0	0.06	0.08	0	P 0
11	0	0.03	0.14	0.06	0
12	0	0	0.10	0.17	0
13	0	0	0	0.10	0.03
14	0	0	0	0	0.03
15	0	0	0	0	0.08
16	0	0	0	0	0.10
17	0	0	0	0	0.08
18	0	0	0	0	0.03
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
Total ml	0.33	0.34	0.35	0.33	0.35
Ca found mg	0.0132	0.0136	0.0140	0.0132	0.0140

Table V.

Blood sample	Sample taken ml	0.001 M EDTA ml	Whole blood Ca mg	Whole blood Ca mg %	Serum Ca mg % (as Ht. No 50)
A	0.50	0.75	0.0301	6.02	12.04
B	0.50	0.68	0.0272	5.44	10.88
C	0.25	0.35	0.0144	5.60	11.20
	0.50	0.70	0.0280	5.60	11.20
D	0.25	0.35	0.0140	5.60	11.20
	0.50	0.71	0.0284	5.68	11.36
E	0.25	0.30	0.0130	4.80	9.60
	0.50	0.60	0.0240	4.80	9.60
F	0.25	0.31	0.0124	4.96	9.92
	0.50	0.59	0.0236	4.72	9.44
G	0.25	0.30	0.0120	4.80	9.60
	0.50	0.59	0.0236	4.72	9.44

たものである。このようにカルシウム割分の位置がわかればカルシウム割分のみを集めて定量することができる。

以上のようにして、カルシウム標準液、血清、全血について、それぞれカルシウム定量を試み、更に Column の void volume を検討し、また数人の血液についてカルシウム定量を実施した。それらの結果を Table I ~ V および Fig. 2 に示す。

考 察

カルシウム標準液 0.5 ml および 1 ml については Table I の如くほとんど定量的に回収することができた。0.5 ml の場合 Fig. 1 に示した如く、カルシウム割分のみを集めて定量した結果も全く同様であった。

血清についても Table II に示す如き結果を得た。表中 P は蛋白質割分を示す。蛋白質割分は

Tube No. 4~7 で、その後流出液は清澄となりカルシウム劃分が続く。ここでも 1 ml 宛分取した各々についての滴定値の総計と、カルシウム劃分のみを集めてとつた分の滴定値とは全く一致した。同じ血清について直接滴定を行なつた結果もまた同様であつた。これは Sephadex を通すことによつて結合カルシウムは蛋白質とカルシウム分子とに完全に分離することを裏書するものである。我々が先に行なつた甲状腺機能検査法としての PBI 定量においては、血清中 PBI は Sephadex を通すことによつて蛋白質部分と分離せず、従つて PBI と遊離 thyroxine との分離定量が可能であつた⁴⁾が、血清中結合カルシウムはこれと異なり Sephadex によつて蛋白質部分とカルシウム部分とに完全に分離する。このことからカルシウムと蛋白質分子との結合状態は、PBI のそれと比較してより弱いものであることが推定される。

全血を用いた場合 (Table III) も血清の場合と同様、血球および蛋白質はカルシウム劃分よりも先に流出してしまふため、その定量を妨害することがない。全血 0.5 ml にカルシウム標準液 0.5 ml (Ca 0.05 mg) を加えて行なつた結果も理論値に等しい値を得た。また 2 倍希釈血と比較してみたが結果は同じであつた。ただし全血の場合には粘性が大きいから、これを column 中に加える際、溶剤を Sephadex 充填層の上部に残し、試料を加えてガラス棒で攪拌希釈することが肝要で、これをしないと流出時間が長びき定量が手間どることになりがちである。この操作により血液を希釈したと同様の効果を得ることができるので、始めから正確に血液を希釈しておく必要はない。この Sephadex による gel-filtration は血液カルシウムの直接定量を可能にすると同時に採血量も僅少ですむことにもなり、大いなる利点をもたらす。

Void volume によつて炉過曲線が影響を受けることは充分考えられるので、この点について検討した。

Table IV および Fig. 2 は Sephadex 充填層の長さを 7, 10, 13, 16, 20 cm (void volume はそれぞれ 2.0, 2.5, 3.1, 3.5, 5.0 g となる) とし各々について全血 0.25 ml を通してみた結果であるが void volume があまり小さいと蛋白質とカルシウム劃分との間隔が短かすぎて定量に支障を来たす恐れがあり、逆の場合は流出時間が長びいて不便である。結局 void volume 3.1~3.5 g, 即ち Sephadex 充填層の長さ 13~16 cm 位が適當である。

以上の実験結果から Sephadex を用いる血液カルシウムの定量法としては、次の方法が最適である。即ち、径 1 cm, 長さ 26~30 cm の column に Sephadex を 13~16 cm 位充填し、生理食塩水で流出する。まず Sephadex 層の上部に溶剤を 0.5 ml 程度残し、その上に全血を 0.125~0.25 ml 加えガラス棒で液面を静かに攪拌して血液を希釈しガラス棒を極く少量の溶剤で洗滌後、溶出を始める。溶剤少量で column 壁を洗い流すことを 2 回くり返して後、普通に溶出する。最初の 7~8 ml は棄て、次の 9~10 ml をとつて常法により 0.001 M EDTA をもつて滴定してカルシウムを定量する。

幾人かの血液についてこの方法による血液カルシウムの定量を試みた。Table V のように最高 6.02 mg% から最低 4.72mg% までの値を得た。従来血液中のカルシウム濃度は血清 100 ml についての濃度で表わされているのでかりにヘマトクリット値を 50 としてこれらの値を血清カルシウム濃度に換算したものを参考のため表中に掲げた。しかしもともと全血量に対する血清量はヘマトクリット値によつて異なるので、全血液中のカルシウムを直接知る方が望ましい。この意味においても全血カルシウムの直接定量は意義があると思われる。

4) 宮本貞一：未発表論文

Summary

The rapid and accurate method of calcium determination in whole blood in connection with Sephadex gel filtratin has been studied. This method has an advantage in complete separation of calcium from protein.

THE AMINO ACIDS IN OPIUM II

Quantitative Determination*

Sadaichi MIYAMOTO and Einar Brochmann-Hanssen

In a qualitative study of the amino acid composition of opium, the presence of a large number of free amino acids was reported (1). Reasons were presented why the amino acids might be useful as a basis for origin determination. For such purpose, it is necessary to have a quantitative method of determination which gives reproducible results and is suitable for routine operation. Various paper chromatographic methods were explored, but in our hands were not satisfactory for the large number of amino acids in question. We found the most accurate and reproducible method to be the ion exchange chromatographic procedure of Moore and Stein (2, 3). Although time-consuming and hardly suitable for routine analyses in its original form, equipment is now commercially available or may be built from available parts (4, 5) that will make the method almost entirely automatic. Considerable progress is also being made in the field of gas chromatography of amino acids.

This paper reports the results of quantitative determination of free amino acids in a limited number of opium samples of different origin.

EXPERIMENTAL

A total of fifteen authenticated opium samples were analyzed, representing seven different countries and three opium-producing regions in India.

Preparation of the Sample.--Two hundred mg. of finely powdered opium was triturated in a glass mortar with 1 ml. of ice-cold water. Gradually, 10 ml. of cold water was added while stirring. The stirring was continued for five minutes, and the aqueous extract was decanted into an extraction tube (1) containing 1 g. of a strongly acidic, cationic exchange resin (Dowex® 50-X₂, 50-100 mesh), previously activated with 4 N hydrochloric acid. The residue was extracted twice more with 10 ml. of ice-cold water each time and the extracts added to the extraction tube. The opium residue was then washed quantitatively into the extraction tube with enough cold water to give a volume of 40 to 50 ml. The tube was shaken mechanically for fifteen minutes. The liquid was allowed to drain slowly from the extraction tube through an ion exchange column of Dowex® 50-X₂ (H⁺), 1 cm. diameter and 25 cm. high. The resin in the extraction tube was washed with about 100 ml. of cold water and the washing allowed to pass through the ion exchange column. The extraction tube and the column were washed separately with 50 ml. of 80% ethanol followed by distilled water and eluted as follows:

The extraction tube was eluted with 4 N ammonia, and the eluate evaporated to dryness

* United Nations' Secretariat, Document ST/SOA.K/109 に発表