

THE HITACHI

Scientific Instrument

NEWS

January, 1962 Vol. 5 No. 1

KLA-2 形アミノ酸分析計について

*小沼武男 島田三男

アミノ酸分析は、あらゆる生物体中の蛋白質の研究に、またアミノ酸の生体内における消長の研究に不可欠のものであるが、性質の良く似た各種アミノ酸を定量分析することは多量の試料と莫大な時間と労力を費しても、正確な分析値を得ることは困難であった。

1951年米国の W.H. Stein および S. Moore によってスルホン酸形交換樹脂 Dowex 50-X8 のカラムを用いて各アミノ酸を数種の緩衝液で、いわゆる液体クロマトグラフ式に溶出する系統分析法を発表した。

この分析法は、わずか数 mg の試料を用い、24 時間以内に正確な分析値が得られるという点で画期的な方法である。

KLA-2 形日立アミノ酸分析計は W.H. Stein および S. Moore

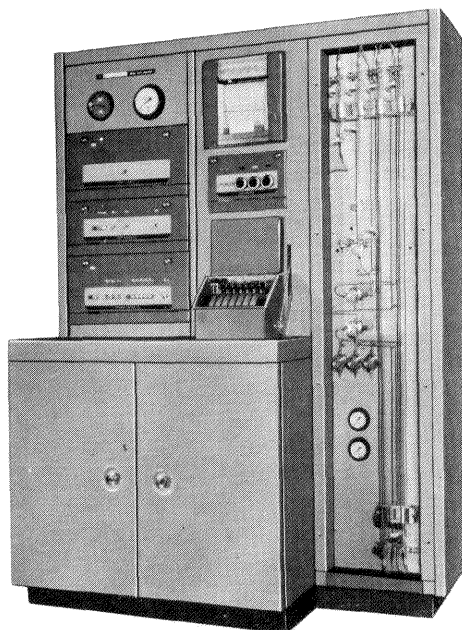
によって確立された分析法に準拠し、かつ日立独特の技術を取り入れて完成したので紹介する。

第1図に外観写真を示す。

原 理

空気を除いた緩衝液を微量ポンプによって常に一定流量でイオン交換樹脂を充てんしたカラムに注入し、カラムを緩衝液で平衡化した後、試料をこのカラムの上部に加え一定流量の緩衝液で展開する。各アミノ酸の解離定数は異なっているので、樹脂に対する親和性が各アミノ酸によって異なっている。したがって緩衝液で展開すると各アミノ酸に展開してカラムから流出する。

この流出液の流れに別の微量ポンプによって送られる一定流量のニンヒドリン溶液を加えて発色させ、この二つの混合した溶液を、100℃ に保持された反応槽内の螺旋状のテフロン管内を一定時間かかって通過させ完全に発色させた後、ガラスセルを通して



第1図 KLA-2 形 アミノ酸分析計

* 日立製作所 那珂工場

440 m μ , 570 m μ および 650 m μ (570 m μ の吸光度の約 1/3 の吸光度を示す波長) の波長光によって連続比色測定し、これを記録計に記録させるものである。

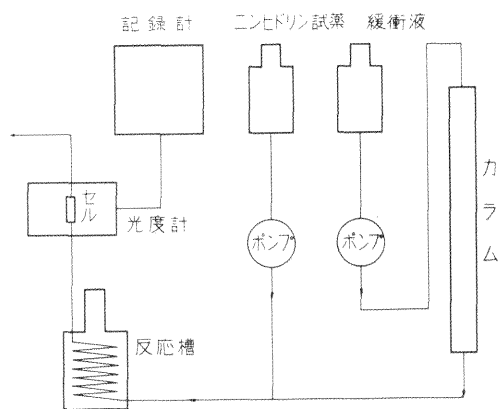
第2図に系統図を示す。

測定例

この分析計を用いて各種アミノ酸の混合溶液を画いた曲線を第3図に示す。

試料は cysteic acid (東京化成製) を除くほかは、味の素製の標準試料を用い、カラムは日本オルガノ商会より販売されているイオン交換樹脂アンバーライト CG-120, type-3 を精製して用いた。

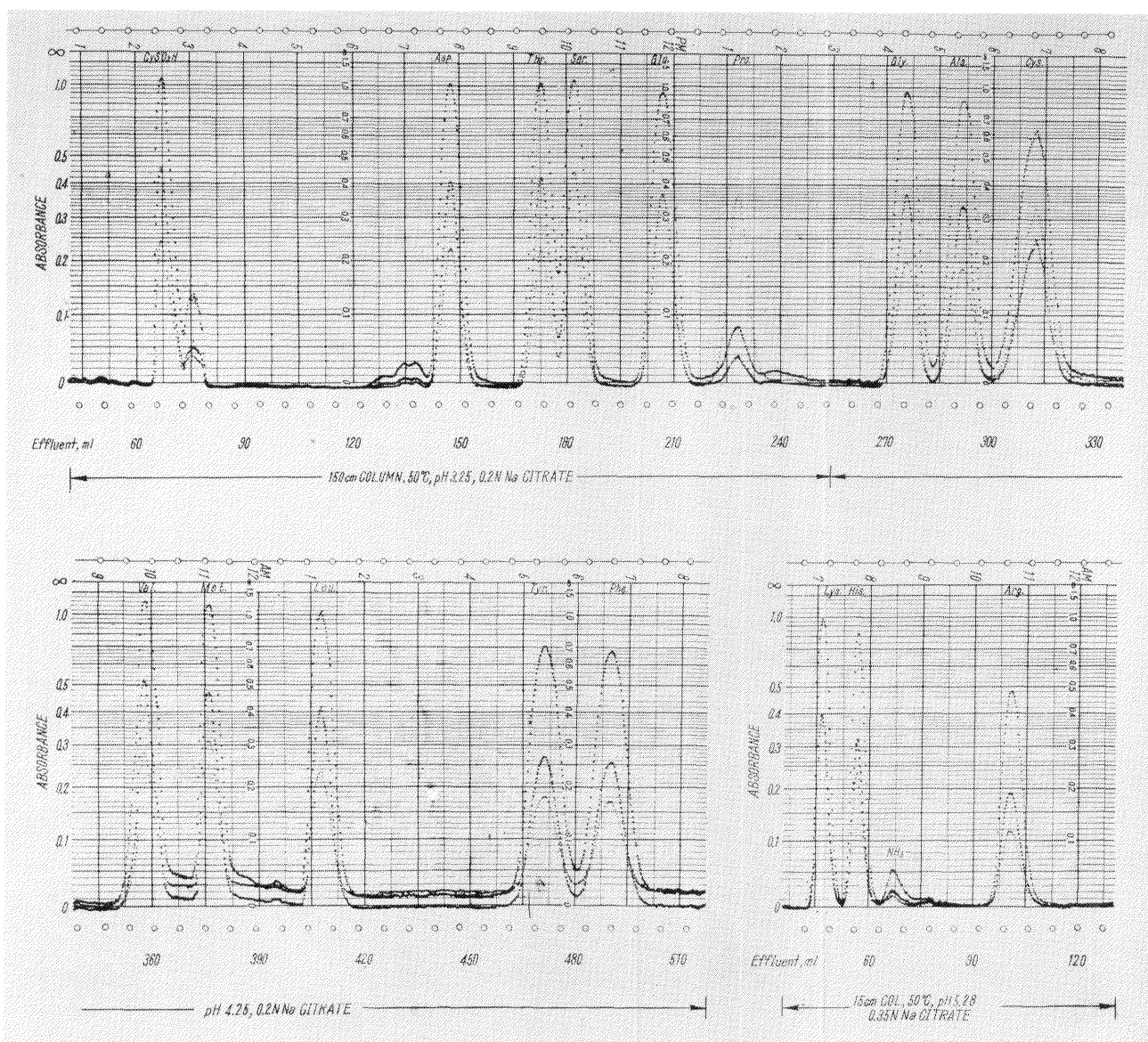
樹脂の精製法については S. Moore, D.H. Spackman および W. H. Stein 等の水圧を応用して選別する Hamilton 法⁽¹⁾があるが、この分析には市販の細目メッシュを用いた比較的均一なもののみを選別して使用した。第3図において上段および下段左側は 150 cm のカラムで緩衝液の pH を切替えて行なったもので、下段右側は 15 cm カラムを用い、樹脂は 150 cm の場合より一段細かく選別した樹脂を使用した。



第2図 アミノ酸分析計系統図

参考文献

- (1) Analytical Chemistry; Vol. 30, No. 7. July 1958



第3図 混合アミノ酸の分析例

SR-1 形吸収自記付属装置について

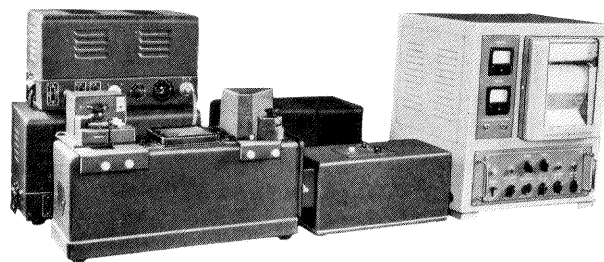
*佐 藤 繁

近年各種の分析機器を自動化する要求が高まり、吸光分析の方面においても多数の試料の測定や分光吸収特性よりの微細構造検討の必要性から分光光電光度計の自記化が要望され、紫外域より近赤外域の波長域に対しては EPS-2 形 自記分光光電光度計を製作した。一方、手動式の EPU-2A 形分光光電光度計も各種の付属装置の開発と相まち、ますます応用範囲を広げている。

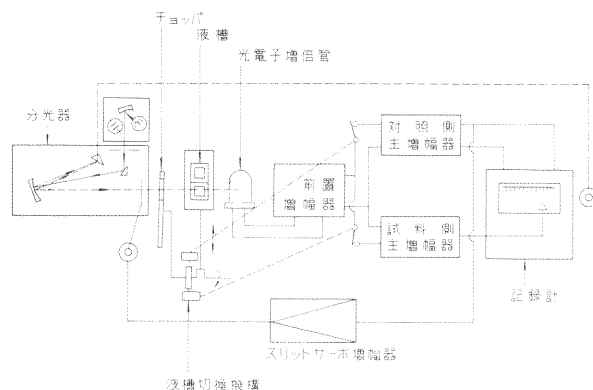
従来手動式の分光光電光度計を自記式にするためには大改造を要したが、今回、当社では EPU-2A 形になんら改造を加えることなく 210~700m μ の波長域の分光吸収特性を自記できる SR-1 形吸収自記付属装置を完成した。

一般に自記分光光電光度計には分光器からの単色光の光路を、同期的に回転する半円形回転鏡によって周期的に2光路が形成されるよう変化せしめ、各光路に置かれた対照および試料へ交互に入射させ、それぞれの透過光量の比を自動的に記録させる方法が採用されている。このような方法において重要なことは測定波長域で対照および試料への入射光量が相等しいか、あるいは常に一定の比率が保たねばならないことである。しかし実際には光路を形成させるために使用される2個以上の反射鏡の反射率を同一にすることは困難であり、さらに日時の経過による反射率の低下も一様ではない。したがってこの光学的差異に基因する100%ラインのずれを補正するためにドリフト補正装置が設けられており、測定時ときどき100%ラインをチェックして補正せねばならない。

SR-1 形吸収自記付属装置は上述の光学的光路変換方式の代りに1光路中に対照および試料を誘導して行なうもので、原理的には同じであるがドリフトの原因となるものが全くない。すなわち第5図に示すように EPU-2A 形分光器よりの単色光を円形の窓を有する円板(チョッパ)で480サイクルの周期で断続し、対照側液槽および試料側液槽を機械的方法により10サイクルの周期で

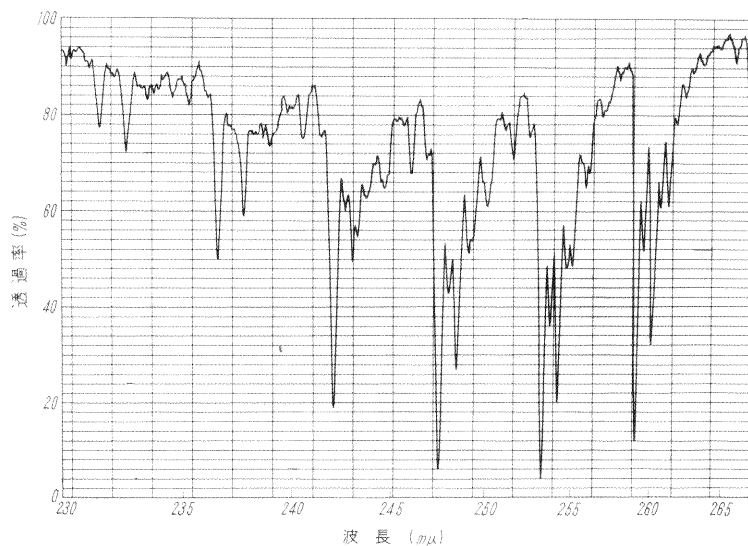


第4図 吸収自記付属装置付分光光電光度計



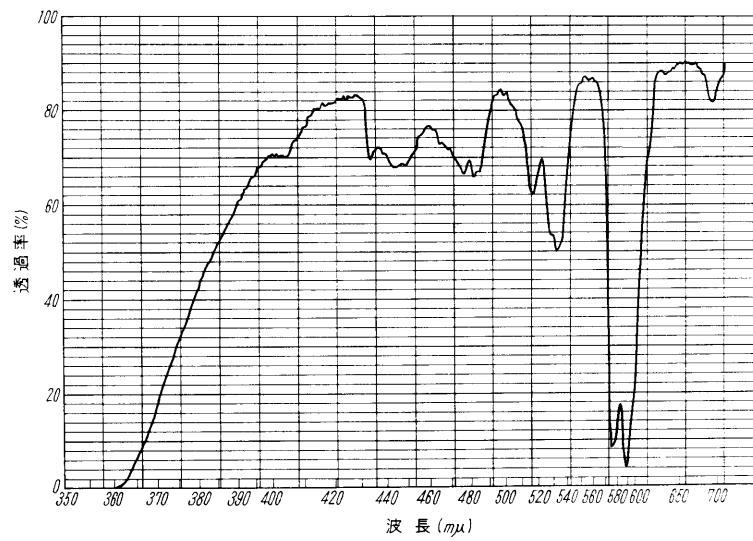
第5図 系 統 図

交互に光軸に誘導するもので、手動式分光光電光度計の測定操作を単に機械化したにほかならない。したがってこの付属装置自身には光学的部品を含まないため、煩雑な光学系の調整を必要としないことはもちろん、光学的差異に基因する100%ラインのずれも補正する必要がない。なお、この付属装置は波長駆動部およびスリット駆動部を分光器のそれぞれのダイヤル位置に、測光部を絞りはめ込むだけであるから、EPU-2A用として開発された各種付属装置を使用することができる。この装置による測定結果の一例を第6図~第8図に示す。

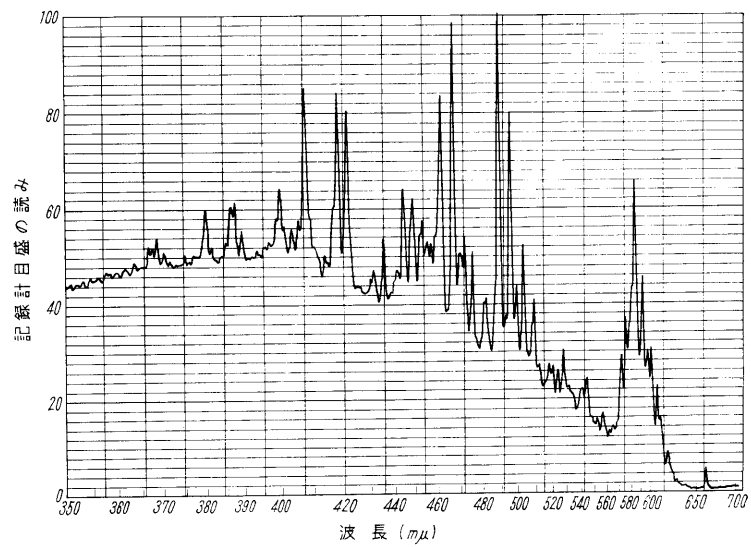


第6図 ベンゼン蒸気の吸収特性

* 日立製作所 那珂工場



第7図 ディアフラグフィルタの透過特性



第8図 水素放電管の輻射特性

原子吸光について

*保田和雄 *佐藤 繁 *山崎義一

原子の蒸気が光を吸収するという現象は1802年 W.H. Wollastonが太陽スペクトルを測定したときに認めたもので、太陽の外側にある原子の蒸気が太陽の光を吸収するためであり、Fraunhofer 線と呼ばれるものである。この現象を金属原子の分析に応用したものが Atomic Absorption (原子吸光) と呼ばれる方法で、1955 年 A. Walsh によって提案されたものである。一般に発光分析では励起状態の原子について観測を行なうために、共存する他の原子の干渉、または自己干渉を受けやすいこと、他の原子の光が分析すべき原子の光に近接し見かけ上の強度が変化すること、さらに分析すべき原子の励起エネルギーにも関係するため短波長に発光線——分析に用いる線——を持つ金属の分析が困難なことなどがある。特に炎光分析では、主として水溶液の試料を用いるので、フレームの中で水が分解し OH ラジカルが作られる。このラジカルの吸収が 300 mμ より短波長側に表われるので、この波長範囲の発光線は検出感度が悪くなるという現象がある。しかし原子吸光による分析法では基底状態にある原子の吸収を測定するため、他の原子による干渉が少ないこと、光源に分析する金属と同じ光を出す中空陰極ランプ (Hollow cathode lamp) を用いているので、他の原子の発光による妨害が全くないこと、光の吸収による測定であるため分析感度は励起エネルギーに関係しないこと、100% 合わせを行なっているので OH ラジカルによる吸収の影響がないことなどが炎光分析に比較して有利な点としてあげられる。

原 理

フレーム中における原子の発光と吸光について

金属塩をフレームの中に入れると、熱エネルギーによって分解し原子の蒸気になる。この原子が熱エネルギーあるいは自由電子などによって励起され、エネルギーの高い準位 (励起状態) にあが

る。そしてこの高い準位よりエネルギーの低い準位へ遷移するときエネルギーを光として放射する。これが金属の発光として観測され分析に応用されているものである。一方、原子吸光ではフレーム中の原子の基底状態から励起状態への遷移を観測するものである。(第9図)

基底状態と励起状態にある原子の数は前者の方が非常に多い。たとえばフレーム中で熱エネルギーによってのみ原子が励起されると考えると、基底状態と励起状態にある原子の分布は Boltzmann の分布(1)式によって示される。

$$N_{ex} = N_{gr} \frac{m_{ex}}{m_{gr}} e^{-E_{ex}/kT} \dots\dots\dots (1)$$

N_{ex} : 励起状態の原子の数
 N_{gr} : 基底状態の原子の数
 m_{ex} : 励起状態の Statistical Weights
 m_{gr} : 基底状態の Statistical Weights
 E_{ex} : 両状態間のエネルギー
 T : 状態の温度

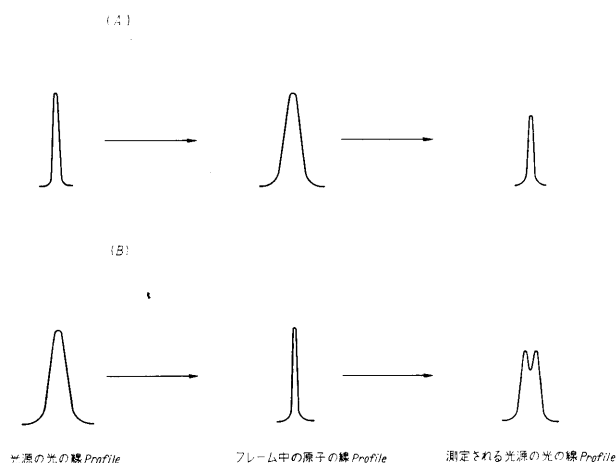
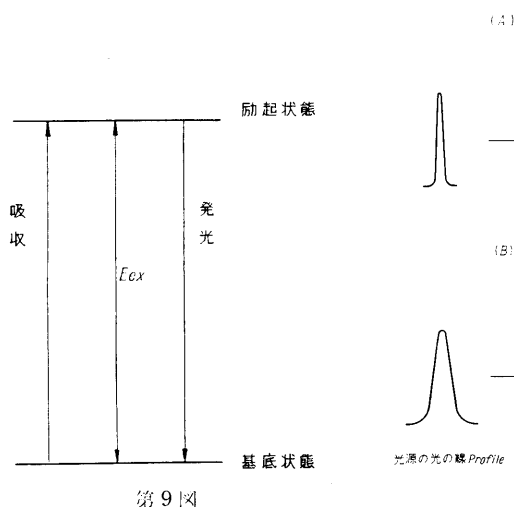
いま Zn の 1s と 2p の間についてこの分布をみると、1s における mgr は 1 であり 2p におけるそれは 3 であるため(1)式はつぎようになる。

$$N_{ex}/N_{gr} = 3e^{-E^{2138.4^\circ}/kT} \dots\dots\dots (2)$$

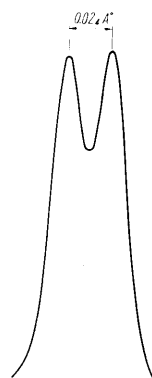
2100°K (空気—石炭ガスによるフレーム) のときにおける(2)式の値は 3.79×10^{-14} になる。以上は熱平衡からのみみた励起状態と基底状態とにある原子の分布であるが、このほかにフレーム中の原子は自由電子などによっても励起されたりするので、両状態間の分布はこの値よりも大きくなるが、少なくとも基底状態にある原子のほうが励起状態のそれよりも非常に多いと考えられる。

吸収スペクトルの Profile

原子吸光に用いられる線は基底状態からすぐ上の準位へ遷移するもの (共鳴線) が吸収強度が大きいために用いられる——Fe, Co のようにエネルギー準位が多く重なっているものは必ずしも共鳴線を用いるわけではない。——フレーム中の原子は温度が高いために目的とする線の広がりとは主として Doppler Broadening に



第 10 図



第11図 自己反転した Ca の共鳴線

* 日立製作所 那珂工場

第 1 表 原子吸光に用いる各原子の波長

原 子	波 長	原 子	波 長	原 子	波 長	原 子	波 長
Na	5890 Å°	Fe	2483 Å°	Sr	4607 Å°	Au	2428 Å°
Mg	2852	Co	3533	Pd	2476	Hg	2537
K	7665	Ni	3415	Cd	3261	Pb	2833
Ca	4227	Cu	3248	Sn	2863	Bi	3068
Cr	3579	Zn	2139	Ba	5536	Ag	3280
Mn	2798	Rb	7800	Pt	2660	Cs	8521

第 2 表 OSCILLATOR STRENGTH (f) の値

原 子	(f)	原 子	(f)	原 子	(f)	原 子	(f)
Ba—5535 Å°	2.10*	Na—5890 Å°	1.0	Zn—2138 Å°	1.9	Ni—3415 Å°	0.04
Ca—4227	2.28*	K—7665	0.5	Ag—3280	1.3	Cr—4254	0.01
Cu—3247	0.62	Cd—2288	2.8	Au—2428	0.8	Li—6708	0.50*
Mg—2852	1.8	Tl—2769	0.15	Fe—3720	0.01	Cs—8521	0.66*

* 発光分析による測定。

よっており、かつかなり広い線幅 ($1/10 \text{ Å}^\circ$) を持っている。一方光源の線幅の広がりも主として Doppler Broadening によるものと考えられる。しかも中空陰極の温度は $400 \sim 700^\circ\text{C}$ であるので、フレーム中の原子の線幅よりも狭く ($5,100 \text{ Å}^\circ$) なる。したがって吸収の Profile は第10図-A のようになる。

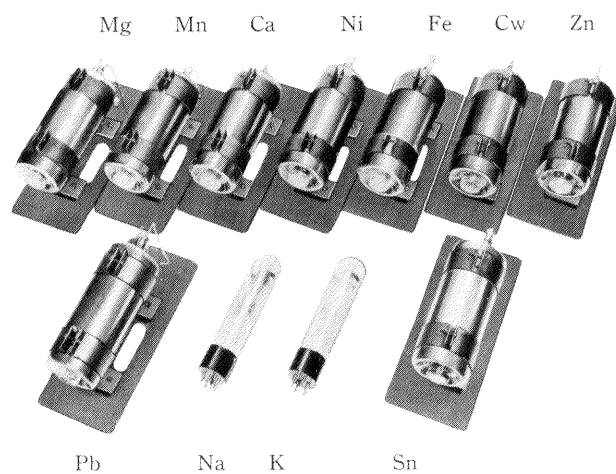
第10図-B よりみても明らかなように、光源の線幅がフレーム中の原子のそれより広い場合には検出感度が悪くなることがわかる。また光源の光が自己反転したような場合第11図に吸収の極大値の強度が小さくなり妨害する光が多くなるため感度が悪くなる。さらに光源の光（共鳴線）に近接線が存在するときは、この光が分光光度計に導入されるため当然感度が悪くなる。第1表に原子吸光に用いられる分析線を示す。

原子吸光における分析感度は光源の線 Profile、フレーム中でいくら原子の蒸気ができるかということのほか原子の Oscillator strength の値 (f) が大きい因子を占める。第2表とこの値を示す。

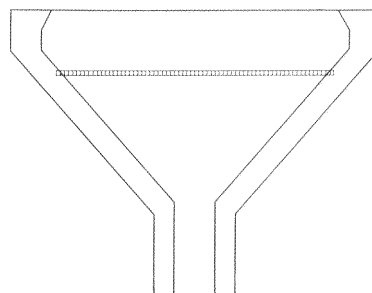
装 置

原子吸光は一般の吸収測定にはほぼ同じであるため、光源—試料—分光光度計の組み合わせになる。そして吸光度 ($-\log T$) を測定する。

光源には線幅が $1,10 \text{ Å}^\circ$ 以下で、かつ分光光度計と組み合わせるとき十分な光強度のある中空陰極ランプ（第12図）を用いる。

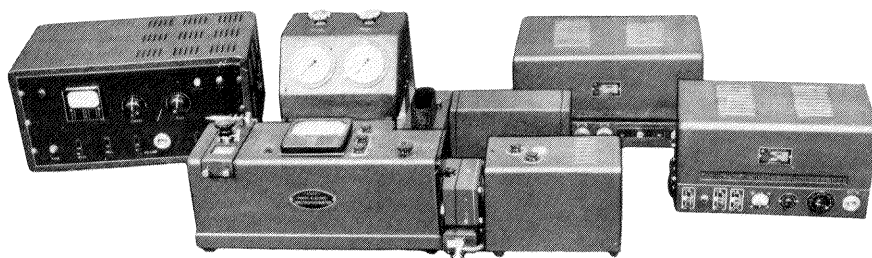


第 12 図



第 13 図

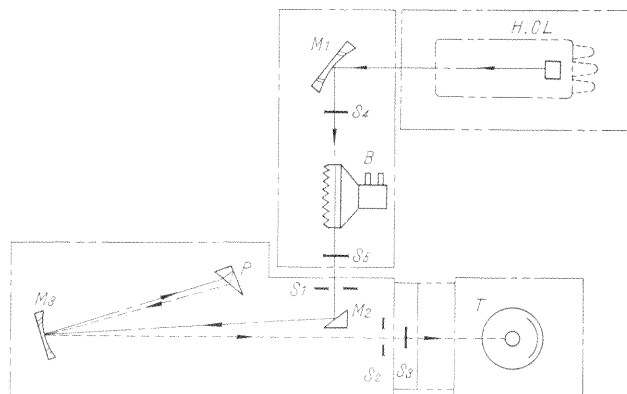
第 14 図



溶液状の試料をアトマイザで霧状にしてバーナに導く。吸収の測定であるため吸収の距離を長くしたほうが有利であるので第13図に示すような Fish-tail バーナを使用するが、フラットなフレームにするためと、flash back を防ぐために火口の途中で網状の板を入れてある。

モノクロメータは近接線を分離できるくらいの分解能を持つことが望ましい。しかしこれも分光光度計に使用した場合には光源の光強度にも関係してくるので、完全に近接線を分離することができない場合もある。しかし Zn, Mg のように近接線のないものは分解能があまり良くなくてもよい。

第 14 図に外観を、第 15 図に光学系を示す。なおこの原子吸光装置は EPU-2A 形の付属装置として製作したのでフレームの発光を補償する回路が設けられている。

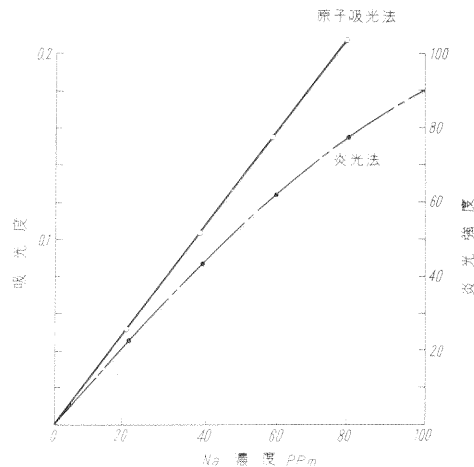


H.C.L.: 光源 M₁M₂M₃: ミラー B: バーナ S₁S₂: スリット
S₃S₄S₅: 絞り P: フリズム T: 受光器 ST: シャッター

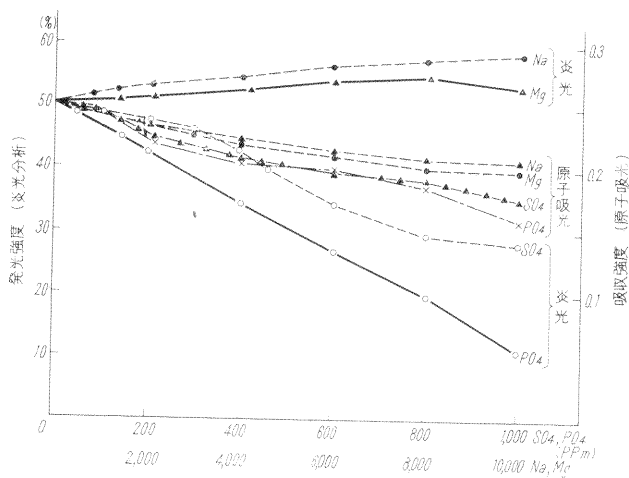
第 15 図

分 析 例

原子吸光は炎光分析と異なり基底状態の原子について測定を行なうため、前述したように自己、相互の干渉が少ない。したがって検量線についてみれば炎光分析の場合よりも直線性が成り立つ。たとえば Na を例にとると 0~100 ppm の濃度範囲で完全に直線性が成り立つ。(第 16 図) 干渉の例として Mg をとると Ca, Cu, Li が Mg の 10 倍位共存すると、炎光分析(アセチレン-空気)では Mg の光(共鳴線)強度は 50% 近くも減少するが、原子吸光では 90% 位しか吸収強度は減少しない。つぎに Ca (1000 ppm) に対する陽・陰イオンの影響を酸素-プロパンによる炎光分析と原子吸光による分析とを比較した結果を第17図に示す。この結果をみると特に陰イオンの影響が原子吸光では少ないことがわかる。



第 16 図



第 17 図

第3表に原子吸光分析による最少検出感度を示す。またこの方法によって分析できる元素は Sb, Ba, Bi, Cd, Ca, Ce, Cr, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Li, Mn, Mg, Hg, Ni, Pd, Pt, K, Rb, Ag, Na, Sr, Ta, Sn, Zn などがある。

第3表 最少検出感度

原 子	濃 度 (ppm)	原 子	濃 度 (ppm)
Ca	0.2	Ni	3.0
Cu	1.0	K	0.01
Fe	1.5	Zn	0.1
Pb	1.5	Na	0.005
Mg	0.05		

株 式 會 社
日 立 製 作 所

本 社	電 話	電 信 略 号
(新 丸 ビ ル) 東京都千代田区丸の内1丁目4番地	東京 (212) 1111 (大代)	トウキョウ」ヒ タ チ
(新大手町ビル) 東京都千代田区大手町2丁目4番地	東京 (211) 1411 (大代)	トウキョウ」ヒ タ チ
営業所 東京、大阪、福岡、名古屋、札幌、仙台、富山、広島、高松		

日 製 産 業 株 式 會 社

本 社	東京都千代田区神田鎌倉町2丁目3番地 (日立鎌倉橋別館)	電話東京 (231) 8111 (大代) 電信略号 トウキョウ」ニツセイサンギョウ
別 館	東京都千代田区神田司町1丁目17番地 (日製産業別館)	電話東京 (201) 8661 (代) 電信略号 トウキョウ」ニツセイサンギョウ
大 阪 営 業 所	大阪府北区梅ヶ枝町164番地 (宇治電ビル)	電話大阪 (361) 1241 (大代) 電信略号 オ オ サ カ」ニツセイサンギョウ
名 古 屋 営 業 所	名古屋市中村区広井町3丁目98番地 (名古屋ビル)	電話名古屋 (55) 7246 (代) 電信略号 ナゴヤニシ」ニツセイサンギョウ
九 州 営 業 所	福岡市天神町58番地 (天神ビル日立製作所内)	電話福岡 (74) 5831 (大代) (75) 2936 (代) 電信略号 フ ク オ カ」ニツセイサンギョウ
広 島 営 業 所	広島市紙屋町8番地 (広電ビル)	電話広島 (2) 9728~9, 9028 電信略号 ヒ ロ シ マ」ヒロニツセイ
仙 台 販 売 所	仙台市東4番丁51番地 (日産生命館日立製作所内)	電話仙台 (3) 2324 (5) 1795 電信略号 セ ン ダ イ」ニツセイサンギョウ
札 幌 販 売 所	札幌市北2条4丁目1番地 (三井ビル日立製作所分室内)	電話札幌 (4) 2151 (代) 電信略号 サ ツ ボ ロ」ヒタチキヅケ」ニツセイ
富 山 出 張 所	富山市新桜町13番地 (日立製作所内)	電話富山 (2) 8547, 8548, 8549 電信略号 ト ヤ マ」トヤマヒタチキヅケ」 ニツセイサンギョウ
四 国 出 張 所	高松市亀井町6番地の1	電話高松 (3) 5740, 6985, 7376 電信略号 タ カ マ ツ」ニツセイ