

THE HITACHI

Scientific Instrument

NEWS

October, 1962 Vol. 5 No. 5

目 次

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1. KLA-2形 日立アミノ酸分析計 | ・波多野博行…… 1 |
| 2. XMA-M1形 日立微小部X線分析計 | ・渡辺 宏・岡野 寛・原 行一・三村忠治…… 8 |
| 3. IM-K形 日立赤外顕微鏡装置について | ・福田健二, 植竹敏文…… 9 |
| 4. 原子吸収分析における干渉について | ・松平俊次, 保田和雄…… 11 |

KLA-2形日立アミノ酸分析計

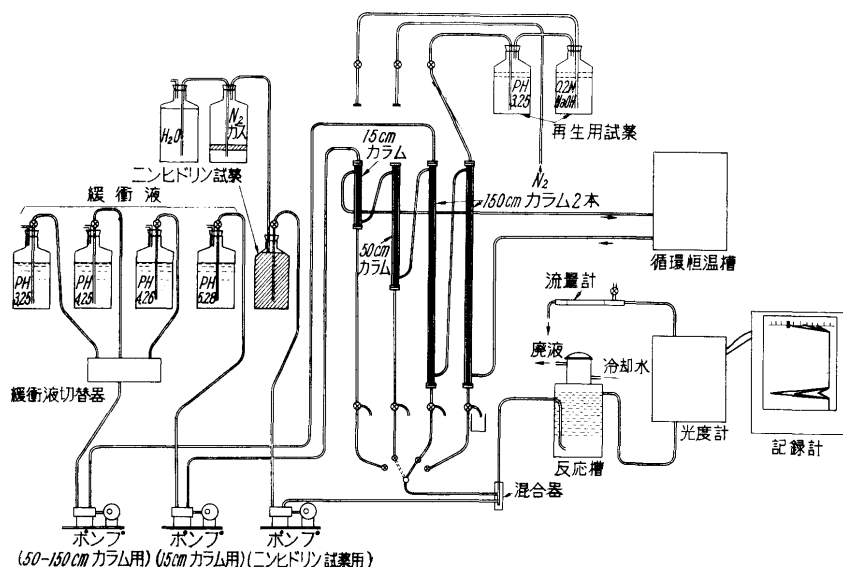
波多野博行*

構造と特長

この分析計はアミノ酸および類縁化合物をイオン交換クロマトグラフ法で分離し、ニンヒドリン比色法により定量記録する一連の分析操作を自動的に行なう分析計である。

イオン交換樹脂カラムを用いてアミノ酸および類縁化合物を分離定量する方法は 1951 年米国のロックフェラー研究所の S. Moore and W. H. Stein によって確立された。この際、分離さ

第1図 KLA-2形アミノ酸分析計流路系統図



* 京都大学理学部, 理博

**波多野博行, THE HITACHI SCI.
INSTR. NEWS vol 5, No. 2 (1962)

れた成分の検出に用いるニンヒドリン発色による光電比色分析の定量的条件は詳しく検討されている。この分析計はこの方法を用いるアミノ酸の自動分析法の原理に基づいて分析を行なうものである。

この分析計は前稿** 写真1に示したもので連続流動方式を採用し、前稿表1に掲げた諸装置より成り、これに必要な微量送液ポンプは流量一定の日立微量定量ポンプを用いている。また自動

表 1.a. アミノ酸 $\text{H}_2\text{NCHCOOH}$
R

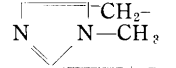
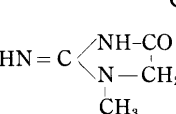
アミノ酸	略号	構造 (R)	溶出容量 ml	分析上の特長
アスパラギン酸	Asp	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	(150cm カラム) 147	溶出位置が変動しやすい
スレオニン	Thr	$-\text{CHOH}-\text{CH}_3$	154	} 分離に注意
ゼリン	Ser	$-\text{CH}_2\text{OH}$	166	
プロリン	Pro	 $-\text{COOH}^*$	218	
グルタミン酸	Glu	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	231	} 定量精度が悪い E ₄₅₀ > E ₅₇₀ > E ₆₄₀ 溶出位置が変動しやすい E _{640mμ} > E _{450mμ}
グリシン	Gly	$-\text{H}$	273	
アラニン	Ala	$-\text{CH}_3$	286	
バリン	Val	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	350	} 分離に注意
シスチン	Cys	$-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$	368	
メチオニン	Met	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	408	
イソロイシン	Ileu	$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	416	} 従来は分離が悪いように思はれてきたが完全に分離する
ロイシン	Leu	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	430	
チロシン	Tyr	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	498	
フェニルアラニン	Phe	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	510	} 分離に注意
トリプトファン	Try	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}$ 	(15cm カラム)	
リジン	Lys	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$		
ヒスチジン	His	$-\text{CH}_2-\text{NH}$ 		
アンモニア	NH ₃	NH ₃		
アルギニン	Arg	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$		

* このものだけはアミノ酸で、全構造を示し、一般の構造式の R ではあらわしていない。

表 1.b. アミノ酸類縁化合物

類縁化合物	略号	構造	溶出容量 (ml)	分析上の特長
ホスホゼリン	PS'er	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ $\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	(150cm カラム) 57	} 分離しない
システイン酸	CySO ₃ H	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$		
グリセロホスホエタノルアミン	GPEA	CH_2OH CHOH OH $\text{CH}_2\text{O}-\text{PO}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	62	
ホスホエタノルアミン	PEA	$\text{H}_2\text{PO}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	70	
タウリン	Tau	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	82	
尿素	Urea	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	91	
ヒドロキシプロリン	Hyp		130	
アスパラギン	AspNH ₂	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ CH_2CONH_2	173	
グルタミン	Glu NH ₂	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$	173	
ザルコシン	Sar	$\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$	181	
チトルリン	Cit	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCONH}_2$	238	} 発色率低い
α-アミノアデピン酸	αAAA	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	312	
α-アミノ-n-酪酸	αAnBA	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ CH_2CH_3	319	
シスタチオニン	Cyt	$\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2$	393	

表1 b つづき

グルコサミン	GlcNH ₂		447	} 分離しない
ガラクトサミン	GalNH ₂		447	
β-アラニン	βAla	H ₂ NCH ₂ CH ₂ COOH	568	
ホモシスチン	HoCys	H ₂ NCHCOOH HOOCCHNH ₂ CH ₂ CH ₂ S-SCH ₂ CH ₂		
β-アミノ-iso-酪酸	βAiBA	H ₂ NCH ₂ CHCOOH CH ₃	601 (50cm カラム)	
ヒドロキシリジン	Hylys	H ₂ NCHCOOH CH ₂ CH ₂ CHOHCH ₂ NH ₂	157	
アロヒドロキシリジン	Aohylys		164	
γ-アミノ酪酸	γABA	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	178	
オルニチン	Oru	H ₂ NCHCOOH CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	197	
モノエタノールアミン	MEA	HOCH ₂ CH ₂ NH ₂	224	
1-メチルヒスチジン	1MeHis		276	
3-メチルヒスチジン	3 MeHis		357	
アンゼリン	Ans	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CONHCHCOOH CH ₂ C=CH	372	
クレアチニン	Cre		419	発色率低い
カルノシン	Car	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CONHCHCOOH CH ₂ C=CH N NH CH	438	

15cm のカラム各1本とを備えている。この3種のカラムを用いて後述するような実験条件で、表1, a, b に示するようなアミノ酸および類縁化合物が分析できる。150cm カラムは中性および酸性のアミノ酸を、15cm カラムは塩基性アミノ酸を分析するのに使用するが、尿や血清などのような生体液に含まれる複雑な塩基性成分を分析するには15cm カラムでは不十分であるので50cm カラムがとくに設けられている。

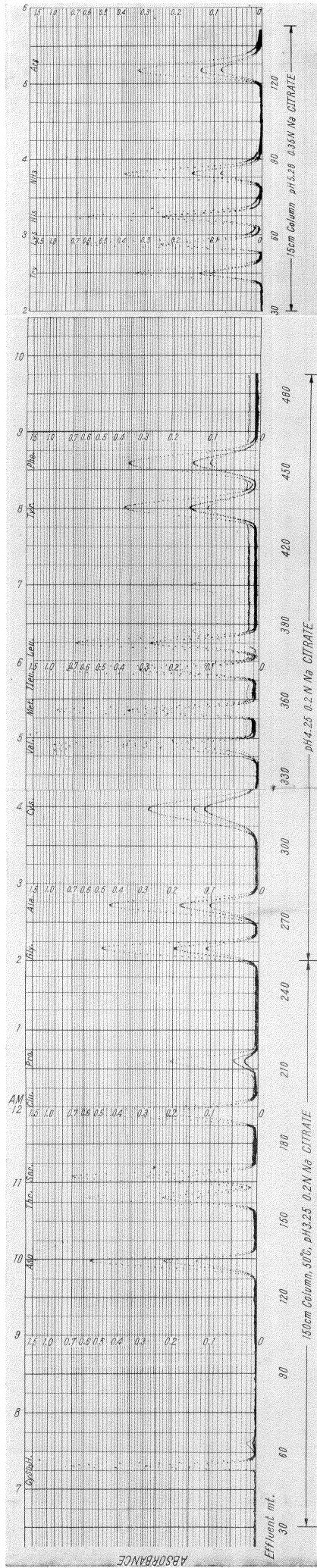
短いカラムは再生する必要はないが、150cm カラムの再生には長時間を要するので、一方を使用している間に他方を再生することによって再生に要する時間を節約することができる。カラムは30° および50° の恒温で操作できるようにいつでも恒温水循環用の外套管が付けてあり、付属の恒温槽と循環ポンプにより1l/時の恒温水が循環する。カラムの連結には平面ジョイントを用い、スクリュウ止めにしてあるので溶出に用いる5~6気圧の圧力に耐えて漏れることはない。

表2 3波長におけるアミノ酸のニンヒドリン呈色強度

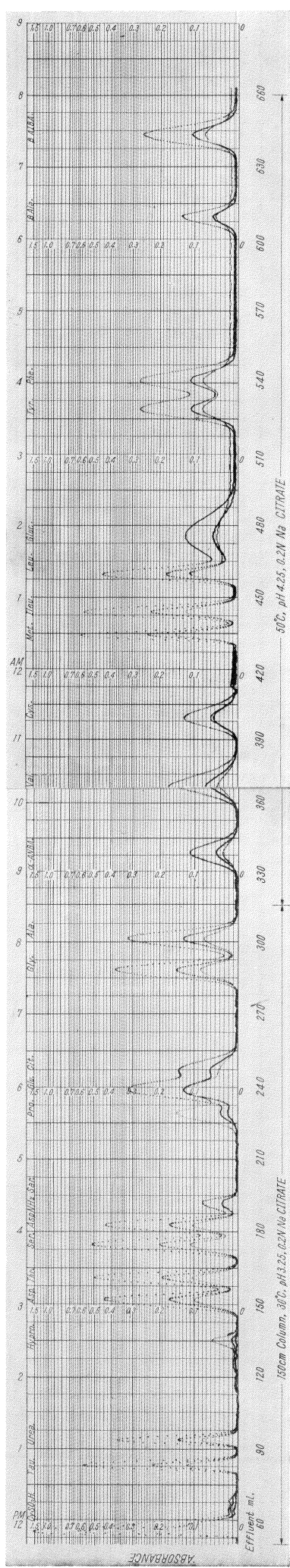
アミノ酸	呈色比強度 *			クロマトグラム ** 面 積 比			注 意		呈色比強度 *			クロマトグラム ** 面 積 比		
	570mμ	440mμ	940mμ	570mμ	450mμ	643mμ			570mμ	450mμ	940mμ	570mμ	450mμ	643mμ
CySO ₃ H	0.288	0.033	0.086	12.1	2.77	5.15		Met	0.156	0.092	0.142	10.0	2.81	4.29
Tau	0.424	0.058	0.133	8.01	1.97	3.09		Ileu	0.486	0.064	0.149	11.0	2.50	4.60
Asp	0.532	0.075	0.151	9.21	2.25	3.61		Leu	0.556	0.077	0.160	10.4	2.35	4.10
Thr	0.536	0.068	0.142	9.24	2.25	3.91		Tyr	0.482	0.068	0.142	10.4	2.50	3.90
Ser	0.474	0.058	0.146	10.0	2.64	4.15		Phe	0.477	0.068	0.150	10.2	2.58	4.14
Glu	0.465	0.168	0.120	10.1	4.52	4.02	E _{643mμ} < E _{45 mμ}	Try	0.442	0.111	0.143	7.75	2.19	3.05
Pro	0.046	0.057	0.025	0.58	2.32	0.33	E _{45 mμ} < E _{45 mμ}	Lys	0.508	0.205	0.148	10.4	3.82	4.09
Gly	0.498	0.063	0.166	9.14	2.36	3.90		His	0.488	0.108	0.153	11.4	3.61	2.91
Ala	0.453	0.052	0.136	9.48	2.31	4.07		NH ₃	0.554	0.078	0.172	9.17	2.11	3.84
Cys	0.416	0.228	0.144	6.57	3.01	2.61	E _{643mμ} < E _{450mμ}	Arg	0.604	0.097	0.179	10.7	2.44	4.23
Val	0.494	0.061	0.157	10.2	2.65	4.14								

* 1 μmole/25ml で測定

** この波長はフィルタの特性により呈色比強度の波長と少し異なってくる。1 μmole の値



第2図 a



第2図 b

クロマトグラフで分離された試料は後述の定流量送液ポンプにより毎時 30ml の定速で送られるが、第1図のアロクダイヤダラムに示すように、この前に毎時 15ml の定速でニンヒドリン試薬が同じじょうな送液ポンプにより送られ混合される。したがってこのアフロロニン染色管中にはこれら混合液が毎時 45ml の定速で送られてくる。これが14.5mlにわたる染色管の中を流れるのに15分間かかるので、アミノ酸がニンヒドリンと反応して定量的に発色するの必要にして十分な時間加熱が行なわれることになる。このようにして発色が完了した液が光電比色計に送られる。

定流量送液ポンプ

この分析計は連続流動方式を採用しているが、この方式による定流量分析の成否はすでに前述した通り定流量送液ポンプの精度にかかっている。この分析計にはこのために特に設計製作した流量一定の定流量送液ポンプを用いているので、毎時 30ml の溶出液と毎時 15ml のニンヒドリン試薬とをききわけて高い精度で定量的に送りつづけることができる。このポンプは常圧下における流量の変動は全くなく、1 kg/cm²の加圧による変動も、また24時間連続運転中の変動も 0.5ml/hr を超えることはない。これらわかつとおりこの分析計は日立微量定流量ポンプを使用することにより、きわめて高い精度で定流量分析が可能である。

光電比色計

光電比色計もこの分析計のためによくに設計製作したもので、

570 mμ, 440 mμ, 640 mμ の3種の干渉フィルタを用い、厚さ2 mm の測定用セルを備えている。570mμ はふつうのアミノ酸のニンヒドリン発色の吸収の最大波長で、440mμ はプロリンとヒドロキシプロリンの測定のためのものである。このほかに640mμ のフィルターを備えているのは、この波長における吸収度が570mμ の極大吸収度の約1/2に相当するので、これを記録することによって570mμ の吸収がスケールアウトして定量的に記録を来すような場合にその難を救うためである。アミノ酸のニンヒドリン発色の吸収におけるこれら3種の波長におけるそれぞれの吸収度の比は表2に示してあるが、アミノ酸によってはこの比が特異なものがある。これらがアミノ酸の定性に役立つことがある。光源はタンダステンランプを用いているが、電源に定電流装置を用いたので基線のふらつきが全くない。

記録計

この分析計は電子管式平衡電位差記録計を用い、570mμ の吸収は緑色、440mμ は青色、640mμ は赤色の点でしかも4点毎に×点で記録するようにになっている。打点間隔は7.5秒であるから各点の曲線の打点間隔は22.5秒で、各波長とも毎時 160 点で記録される。分析結果の一例を第2図に示す。グリシンやアラニンのようにふつうの紫色のニンヒドリン発色をとり、アミノ酸は上から緑、赤、青と並んだ曲線として記録される。ところがアルタミン酸とシスチンとは640mμ の吸収が440mμ の吸

取より小さく緑、青、赤と並ぶ。またプロリンとヒドロキシプロリンとは間知のようにニンヒドリン発色が黄色で、これが記録の上では上から青、緑、赤と並ぶ。これらは沢山並んだゼークの中で特異なものであるから、これが定性的同定に役立つものである。

表 3. a. アミノ酸分析用薬品

品名	数 量 *	用 途	購入上の注意
ニンヒドリン	100 g	発色試薬	本 文 参 照
メチルセロソルブ	10 l	発色試薬溶媒	本 文 参 照
チオソジグリコール	100 g	溶出時の酸化防止剤	本 文 参 照
Brij-35 (ポリオキシエチレンラウリルアルコール)	100 g	溶出液の表面活性剤	本 文 参 照
塩化第 2 錫	25 g	発色試薬	白色粉末は不可 半透明結晶粒の方がよい
クエン酸	5 kg	溶出緩衝液	
酢酸ナトリウム	5 kg	発色緩衝液	
水酸化ナトリウム	1 kg	発色緩衝液	
塩 酸	500 g	溶出緩衝液	
石 炭 酸	500 g	溶出緩衝液	
ピロガロール	500 g	溶出緩衝液	
流動パラフィン	500 g	溶出緩衝液	
淡化カリウム	500 g	溶出緩衝液	
窒 素	25 g	脱 酸 素	
窒 素	1 ペンベ	過 酸 化 物 検 出	

* 初回に、さしあたって購入するに適當な量である。もちろん輸入に補給を要する。

表 3. b. アミノ酸分析計用器具

品 名	規 格	数 量 *	用 途	購 入 上 の 注 意
蒸 留 水 製 造 装 置		1 台		イオン交換式は望ましくない
pH メーター	精 密 級	1 台		本文参照
真 空 ボ ン ブ		1 台	脱 気 用	$1/10 \sim$ 数 mmHg ひけばよい
分 析 用 化 学 天 秤	秤量 100 g 感量 $1/10$ mg	1 台		直示式が便利
調 剤 用 上 皿 天 秤	秤量 500 g 感量 $1/2$ g	1 台		
ガ ス 洗 浄 ビ ン	容量 250 ml	5 個	脱 酸 素 用	
ガ ス 乾 燥 塔	高さ約 35 cm	1 個		
汙 過 ビ ン	1 l および 2 l	各 1 個	脱 気 用	
ビ ー カ ー	50, 100, 200, 300, 500, 1000, 2000 ml	各 2 個		
ポ リ エ チ ビ ン	20 l	10 個	緩 衝 液 容 器	
メ ス シ リ ン ダ ー	10, 20, 100, 50., 1000, 2000 ml	各 1		
メ ス フ ラ ス コ	50 ml	20		
細 口 共 栓 試 薬 ビ ン	25 ml	5		
秤 量 ビ ン	60 ml	20	アミノ酸溶液容器	
秤 量 ビ ン	径 10 mm × 高 30 mm	20	アミノ酸秤量用	
ホ ー ル ピ ペ ッ ト	0.5, 1, 2, 5, 10 ml	各 5 本		
メ ス ピ ペ ッ ト	1, 2, 5, 10 ml	各 5 本		
駒 込 ピ ペ ッ ト (ゴ ム 付)	2 ml	10 本		
ロ ー ト (ガ ラ ス)	径 30 mm	20		
ス プ ー ン ス パ チ ャ ラ		1 組		

* 表 1 a に同じ。

プログラミング装置

この分析計の本格的な自動分析計としての大きな特長の一つは分析操作の設定や自動操作のために、単能のタイマーで操作を設定するだけではなくて、プログラミング装置を備えていることである。この装置はモーター駆動式のドラムに刻まれた日盛溝に棒磁石を挿入し、これによってあらかじめ設定されたプログラムにより分析計の始動と停止、ニンヒドリン試薬の添加開始と停止、溶出液の切り替え、カラム温度の切り替えなどの操作が自動的に行なわれるから分析者は夕刻帰宅前にプログラムを設定しておけば、夜間に分析は自動的に行なわれて翌朝には分析が自動的に完了する。

分 析 操 作

この分析計を用いてアミノ酸およびそのほかのニンヒドリン反応陽性の類縁化合物、例えばアンモニア・アミン類・尿素・アミノ糖などをも分析する方法の要点と注意を述べよう。この分析計の分析操作は Stein & Moore の分析法の原理に基いているがいろいろな理由でこの分析計のために二三改変したところもある。

分析器具と試薬の準備

この分析計の操作に必要な器具と薬品は表 3. a. b. に示してある。以下特に準備に際して注意すべき要点を述べるが、ここにふれるもの以外のものは表に注記してあるとおりの注意をもって、ガラス器具ならば硬質の高級品を、薬品ならば分析用の特級品を選ぶようにする。

a pH メーター この分析に用いる溶出用緩衝液の pH は後に述べる理由のために小数点以下二桁目まで正確に読み取る必要がある。このために精密級のしかも標準緩衝液の確実なものを付属した pH メーターを選ばねばならぬ。例えば筆者の使用経験では日立-堀場 M-4 形 Beckman G 形とか pH メーターなどがこれに合うものである。

b ニンヒドリン 定量用の最純品を選び、購入前にあらかじめサンプルを用いて発色テストを行ない発色率が定量に差支えないことを確かめておく。定量的発色テストは $\frac{1}{1000}$ M のグルタミン酸溶液 1 ml を原法に従い発色させ、25 ml に定容して 1 cm のセルで測定した吸光度が 0.7 以上であればよい*。

*波多野博行，江頭暁，光電比色法各論 1, p56~65(1958)，南江堂

c メチルセロソルブ あらかじめニンヒドリン試薬による発色がないことを確かめておく。また 4% の沃化カリ水溶液を 3 ml メチルセロソルブ 3 ml に加え発色しなければ過酸化物が存在しないから使用して安全である。

試 薬 の 調 製

溶出用緩衝液は 0.1 M の pH 3.25 と pH 4.25 のクエン酸緩衝液を用いる。調製に当ってはすべてあらかじめ煮沸した蒸留水を用い表 4 の処方に従えばよいが、pH の許容誤差は ± 0.01 を厳重に守らねばならぬものがある。何故ならこの程度の pH の誤差が分析結果に鋭敏に影響し、えられた各成分の溶出位置を著しく変動させ、チャート上のピークの定性的同定を困難ならしめるからである。調製後は必ずニンヒドリン反応のテストを行ない安全を確かめてから脱気して密栓して貯える。

ニンヒドリン試薬は塩化錫を用い表 4 の処方に従って調製する。発色には 4 M の酢酸緩衝液を用いて発色に最適の pH 5.0 を維持するようにする。

カラムの調製

イオン交換樹脂カラムは付属品として供給される Amberlite CG-120 を用い径 0.9 cm、長さ 150 cm のものを作る。15 cm カラムの調製には特に粒度の細かいものを用いねばならぬ。50 cm カラムにはこれよりやや粒度の粗いものを用いる。これらの樹脂の充填は約 2 kg/cm² の加圧下に行なう。これは窒素ポンプを用いてやればよい。カラムの分析計への連結はジョイントをしっかりとくっつけばとりたてて問題はない。ただ配管がつまったりカラムが通り難くなったために圧力が上がることがあるのでジョイントは入念に締めつけておく必要がある。

樹脂の再生はカラムを連結したまま 0.2 N 苛性ソーダ液をカラム容量の $\frac{1}{2} \sim \frac{2}{3}$ 流し、ついで所要の緩衝液で pH を調節することによって行なう。これにより一方のカラムによる分析が終了したていついて新たな試料の分析を行なうことができる。

試 料 の 調 製

この分析計で分析できる試料は非常に広範囲にわたり多種多様なものがあるので個々の試料の調整法についてはそれぞれの分析例と共に次稿で詳述する。この方法によって調整された試料は一般に約 0.01~0.1 N の酸性である。もちろん混濁物やひどい着色は避けねばならぬ。この分析計で分析できる試料の量は各アミノ

表4a 溶出用緩衝液の調製法

用 途	150cm カラム用	150cm カラム用	50cm カラム用	15cm カラム用
pH	3.25 ± 0.01	4.25 ± 0.02	4.26 ± 0.02	5.28 ± 0.02
ナトリウム濃度 N	0.20	0.20	0.38	0.35
クエン酸量 g	840	840	532	491
水酸化ナトリウム (97%) g	330	330	312	288
濃塩酸 (35%) ml	426	188	307	136
石炭酸 ml	4	4	2	2
チオジグリコール* ml	200	200	—	—
Brij-35 溶液 ml	80	80	40	40
調製終容量 l	40	40	20	20

* 酸化防止用緩衝液にはこれの倍量を用いる

表.4.b. 発色試薬および緩衝液調製法

発 色 試 薬	酢 酸 緩 衝 液
メチルセロソルブ 3 0 0 0 ml	酢酸ナトリウム 5 5 4 g } 蒸 留 水 4 0 0 ml } pH=5.51±0.03 氷 酢 酸 1 0 0 ml } これに蒸留水を加えて 1000ml とする
酢酸緩衝液 1 0 0 0 ml	
ニンヒドリン 8 0 g	
塩化第一錫 1.5 g	

酸の量にして 0.1 μ mole から 3.0 μ mole にわたるが、最も適当な量は 0.5~1.0 μ mole である。カラムにつける試料の容量は 1ml~5ml が適当である。希薄溶液で上述の適量をとるためにはさらに大容量の試料を用いねばならぬ場合には、試料溶液の pH を 2.0 にして試料を全部カラムの樹脂床に一旦吸着させるようにすれば分析できる。

試料の添加

試料の添加法は手動法の場合と全く同様である。調製されたカラム上部の緩衝液をちょうど樹脂床まで除き、管の内側壁につかないように試料を静かに流し込む。この際樹脂床が乱れないように細心の注意が必要である。定量的に流し込みがすんだら加圧して試料を樹脂床までおし込む。次に約 1ml の $1/100$ N の塩酸または pH 2.2 の緩衝液を同様の操作で押し込み、しかる後に展開に必要な所定の溶出用緩衝液を管内に満たして試料の添加を終る。

プログラムの設定

この分析計のプログラミング装置は次のように設定する。

(i) 溶出用緩衝液の切替——プログラミングドラムの第 2 列 (BUFF) の 8 時間 40 分目の溝に棒磁石を挿入する。これにより分析計始動後この時間に pH 3.25 の緩衝液が pH 4.25 の緩衝液に自動的に切り替えられる。

(ii) ニンヒドリン試薬の添加——ドラムの第 4 列 (NIN) の 30 分目の溝に棒磁石をそう入する。これにより始動 30 分後にニンヒドリン試薬が自動的に添加され始め、約 1 時間後には基線の調整を行なうことができる。

(iii) カラム温度の切替——ドラムの第 5 列 (TEMP) の所定時間目の溝に棒磁石を挿入することにより、始動後この時間に循環恒温槽の第二ヒータが入り、これより約 40 分後にはカラムの温度ははじめの 30℃ から新たな 50℃ に達する。

(iv) 分析計の停止——ドラムの第 6 列 (END) の 17 時間目の溝に棒磁石を挿入する。これによりこの分析計では始動後 17 時間目にニンヒドリン試薬の添加が終り、その後 30 分たつと緩衝液の添加が止って、分析計の運転は停止する。

分析計の運転

試料の添加とプログラムの設定とが終り、循環恒温槽が 30℃ の水をカラムに循環し、加熱装置が 100℃ の蒸気を反応槽に送っていることを確かめた後、分析計を始動すれば分析は自動的に行なわれる。基線の調整は始動後約 1 時間後に 3 つの波長についてそれぞれのセンシティブティノブを用いて行なう。この後の分析計の

操作はプログラムの指示に従って全く自動的に行なわれる。

分析結果の検討

記録された結果から各アミノ酸の量を算出するには、各アミノ酸のピークが定性的に充分確かめられている必要があることはいうまでもない。クロマトグラムのピークの定性的同定は普通は溶出液の容量に基づく位置によって行なうが、ほかに特に有効なのはすでに述べたシスチン、グルタミン酸、プロリンのように 570 m μ 、440 m μ 、640 m μ における吸光度の記録曲線の順序が他の普通のアミノ酸と異なるアミノ酸があることである。このような特異性をうまく利用すれば始めからの溶出容量とこれら特異ピークの相対的位置との関係から各ピークの定性的確認を行なうことができる。この際溶出緩衝液の pH のわずかな変動によってその溶出位置が著しく変動するアミノ酸、例えばシスチンのようなアミノ酸の挙動は特に注意しなければならない。この他調製されたカラムの個体差によっても溶出位置が変わることがあるから注意を要する。この分析計におけるセリンとスレオニンとの分離率は 98% 以上であるからこれより悪い場合は一般にカラムの調整が悪いとみなければならない。

分析結果の算出

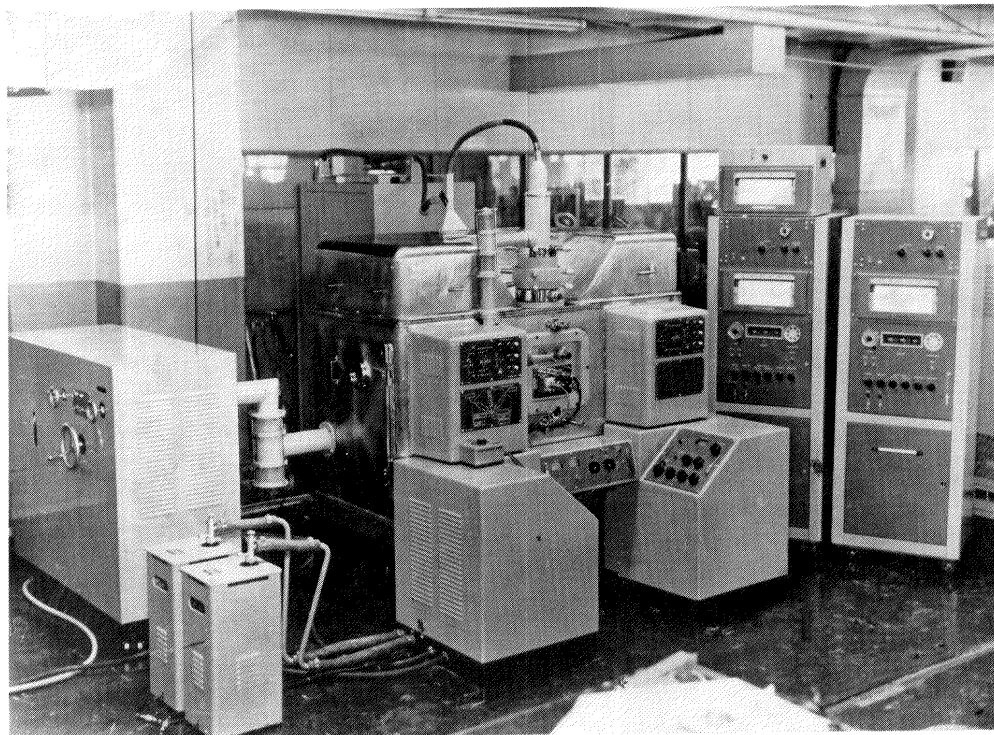
これらの曲線から各アミノ酸の量を算出するにはクロマトグラムの各ピークの面積がそのアミノ酸の量に比例するからえられた曲線がガウス形の曲線に近い場合はそのピークの最大吸光度と半値幅との積からその面積の近似値を算出すればよい。ただガウス形曲線でない場合や 2 つ以上の曲線が重なって複雑な形になっている場合などには各打点における吸光度を積算する。いずれの場合も標準アミノ酸と比較して計算するからこの際各アミノ酸の呈色比強度は問題でない。570 m μ の曲線を用いないで 640 m μ の曲線を使って算出する場合にも標準アミノ酸の場合と比較して計算すればよいが、表 2 に三つの波長における各アミノ酸のクロマトグラムの面積比を掲げておいたから、この値を用いてもよい。

以上今回発売された K L A-2 形日立アミノ酸分析計についてその構造と特長および使用法の概略を述べた。この種の分析計の特長の一つとして単に構造や機能上の問題ではなく、分析操作、運転操作が結果に大きく影響する。特に分析計に添加するまでに至る試料の調整法は分析の成否を左右する重要な操作であるので次稿ではこれを改めて詳述し、これによってえられた分析例を掲げてみたい。

XMA-M1形日立微小部X線分析装置について

渡辺 宏*・岡野 寛*・原 行一**・三村忠治**

第1図 日立XMA-M1形 微小部X線分析装置（ダブルチャンネル）外観



* 日立中央研究所

**日立那珂工場

未知試料の極微小部を非破壊的に定性ならびに定量分析する有力な手段として発達した微小部X線分析装置（Electron Probe Microanalyzer）は特に融点の低い多元素から構成された試料に対して、多素子のX線分光器で同時にX線を分光することにより短時間に分析結果を得ることが可能となる。多元素の構成といえども、問題となる対象元素は3～5種を限度とするのが通常であると思われる。従来のいわゆる線分光器が1台のシングル・チャンネルでは（XMA-4は全波長領域にわたり測定可能となっているが、分光器が2台でも他社のほとんどのものは、分析波長範囲を分担している）たとえば、3元素の構成の場合、3回の操作が必要となる。

これらを解決する方法としては、X線分光器を多数台設置し、同時に多種のX線を分光することにより目的を達する。この装置においては、線分光器を5台まで設置可能である。しかしながら、多元素含有試料が常に軽元素のみ5種、重元素のみ5種ということは、一般的ではないので、5台のうち2台を全波長X線分析可能（ユニバーサル形分光器）、2台を短波長X線分析専用、残りの1台を長波長X線分析専用となっている。無論、対象元素が軽元素のみあるいは重元素のみである場合とか、2～3種のみをroutineに取り扱う場合は、台数を減じた構成とする。

X線分光器の分析波長範囲は、ユニバーサル形分光器に対して $0.846\text{Å} \sim 16.757\text{Å}$ 、短波長専用分光器に対して $0.846\text{Å} \sim 3.383\text{Å}$ 、長波長専用分光器に対して $4.189\text{Å} \sim 16.757\text{Å}$ である。長波長専用分光器では、短波長X線の高次線を利用できるので、試料内のある種の元素に対して、元素含有率によっては、ユニバーサルに使用することも考えられる。またこれら分光器に使用する分光結晶は標準にLiF〔2.0.0〕面（ $2d=4.0276\text{Å}$ ）およびMica〔0.0.2〕面（ $2d=199.49\text{Å}$ ）を使用しているが、他に水晶、ADP、EDDTなどを使用することも可能である。ユニバーサル形分光器では、分光結晶が2枚背面合わせに、LiFとMicaがセットされ真空ケース外部より電気的に容易に交換できる構造を持っている。

この装置においては、試料を分析中に試料表面を特殊光学顕微鏡にて観察することが可能である。すなわち微細構造を観察する場合は高倍率（高分解能を要することは勿論として）で観察するが分析視野選択に際してはむしろ低倍率を用いるのが便利である。前者には、有孔反射対物鏡を使用し、後者には、屈折対物レンズを使用している。これらは真空内にセットされており、交換ツマミにより真空外より容易に切り替えが可能である。分析筒処を含めた視野は、接眼部に接写カメラを取り付けることにより写真撮影可能である。対物レンズは公称73倍と8.3倍であり、接眼レンズは10倍、5倍交換可能である。標準総合倍率は365倍と83倍である。

高低倍率切替可能とした構造により、光学軸と電子線軸は斜交しており、また光学顕微鏡対物レンズは試料面に垂直にしなければならぬから、試料面は水平面に対し 33.5° 傾斜している。このことは所謂X線分光器に対するX線取出角度は大となり、試料の凹凸の影響を少なくしている。

電子線加速電圧は、 $^{12}\text{Mg} \sim ^{92}\text{U}$ に対して、最低10kV、最高50kVで、この間5kV毎段階切り替え可能である。高圧電源は電子顕微鏡と同じく負帰還方式を採用し、 $\sim 10^{-5}/10\text{min}$ 、orderの安定度が得られている。電子レンズは2段の集束レンズを用いており試料面で直径約 1μ の電子線束を得る構成となっている。

この装置には、試料面上の凹凸によるX線出力の変化あるいは、試料衝撃電子流の変化による分析精度の低下を補正するモニター装置をも装着している。またスキャニング像観察装置と組み合わせ、試料面上の2次元分析も可能で、多素子の観察系との組み合わせにより多元素の同時表示も可能とすることができる。

以上述べた如く、X線分光器を多素子にすることにより、短時間に多元素を同時分析する方法として極めて有利であり、光学顕微鏡の対物レンズ切換方式の採用の結果生じたX線取出角度が大となる利点も効果がある。

第1図はX線分光器を2組装着したダブルチャンネルの外観である。

IM-K形 日立赤外顕微鏡装置について

福田 俊雄*・植竹 敏文**

赤外分光光度計の標準使用状態での試料の大きさはほぼ $6 \times 20 \text{ mm}^2$ 必要であるが、さらに小さい試料面積での測定を必要とする場合がしばしば起る。

a) 希望する試料が少量しか得られない場合

微量しか得られない天然物、クロマトグラフなどで分離される試料

b) 測定する試料の形が小さい場合

単結晶、高分子、生体組織などをそのままの形で調べることが必要とする試料

このような場合には赤外顕微鏡を必要とする。

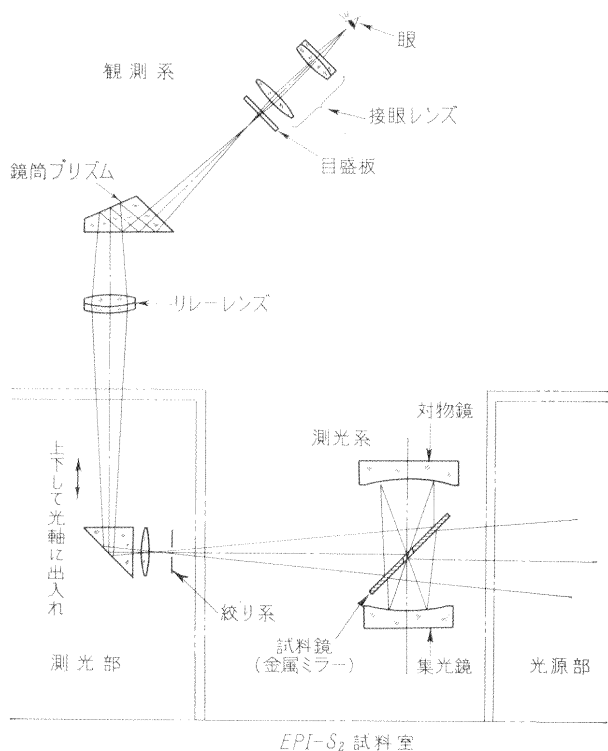
これらの目的にマッチしたものとしてすでに市販されている、EPI-2形赤外分光光度計用IM-2P形赤外顕微鏡があるが簡易赤外分光光度計のアタッチメントとしての顕微鏡は、アルカリハライド結晶のレンズを使用したものは市販されているが、絞り系、観測鏡を備えた反射形のものすなわちIM-K形赤外顕微鏡を今回開発した。

第1図はIM-KおよびEPI-S₂形赤外分光光度計に取り付けた写真である。

この装置は測光系、絞り系、観測系よりなっており光学系は第2図のごとくで光学常数は第1表に示す。

測光系の有効光束はF1:7.0で設計され、対物鏡集光鏡共に軸外しは零度であるため、コマ収差は視野中心においては全くなく視野周辺(スリット上下端)でも少ない。観測鏡視野には試料の大きさが直読できるように目盛がうたれている。

試料は試料鏡中央部の試料ホルダーに入れて測定する。この試料鏡には金属ミラーを採用しているので、指紋、試料などで汚れた場合は簡単に布でぬぐえる。



第2図

有効な試料面積は $0.4 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ であるが絞り系により有効スリット巾および長さを絞って、さらに小さな試料を効率よく測定できるようになっている。

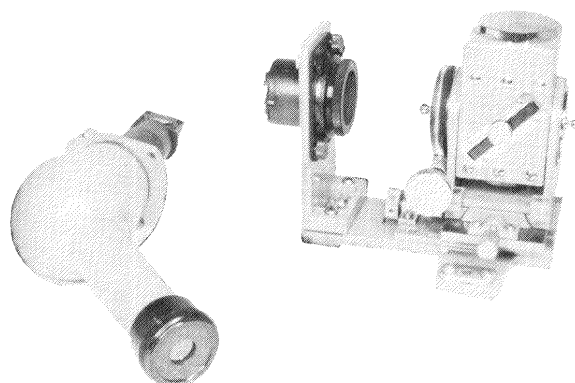
この装置を使用する時には、補償側に可変絞りを使用して100%ラインの調節を行なう。

この装置を使用した場合の光路ののびはIM-2Pに比してはるかに少ないので光路補正用のセルは必要とせず標準側には100%ラインの調節用に可変絞りを使用する。

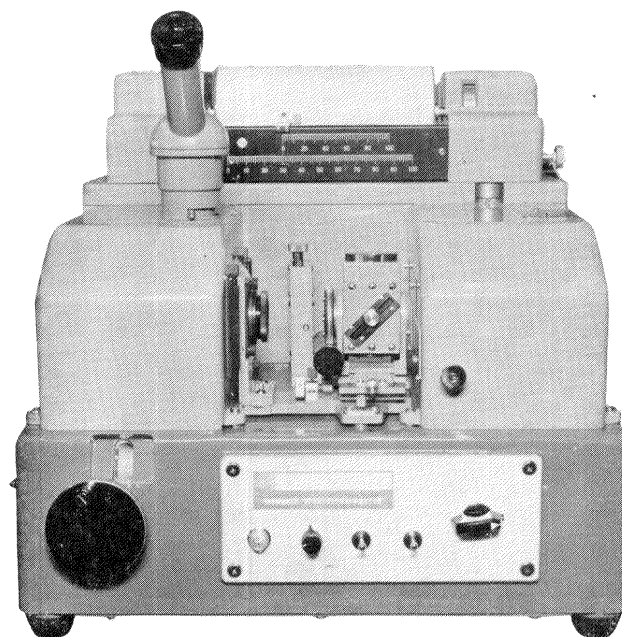
次にこの装置での測定例を紹介する。

第1表 IM-Kの光学常数

光 学 常 数			
開	口	数	0.5
測	光	倍 率	5
観	測	倍 率	50
有 効	ス リ ッ ト 長		10 mm
有 効	試 料 面 積		$0.4 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$



第1-a図 IM-K形赤外顕微鏡装置



第1-b図 EPI-S₂形赤外分光光度計に取り付けたところ

* 日立製作所那珂工場

** オリンパス光学工業KK

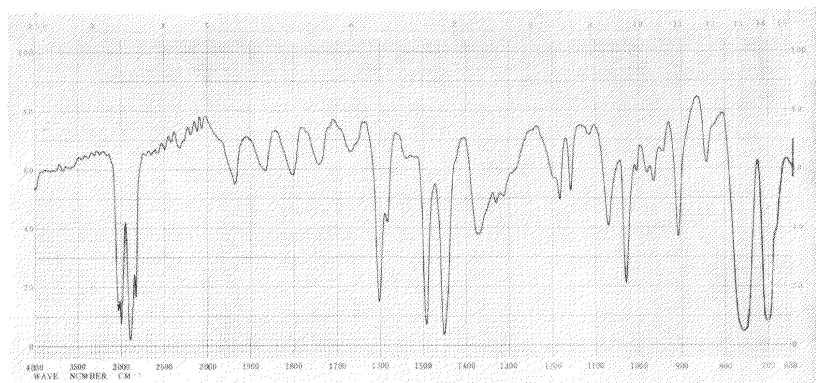
1) フィルムの測定

- 第3図 a) ポリスチレンフィルムを2mm角に切り試料ホルダーにそう入し標準のスリット中で測定した。
b) 絞り系のスリット巾を 50μ 、長さ方向を1mmにして測定したもので十分ポリスチレンの特性吸収

を示している。

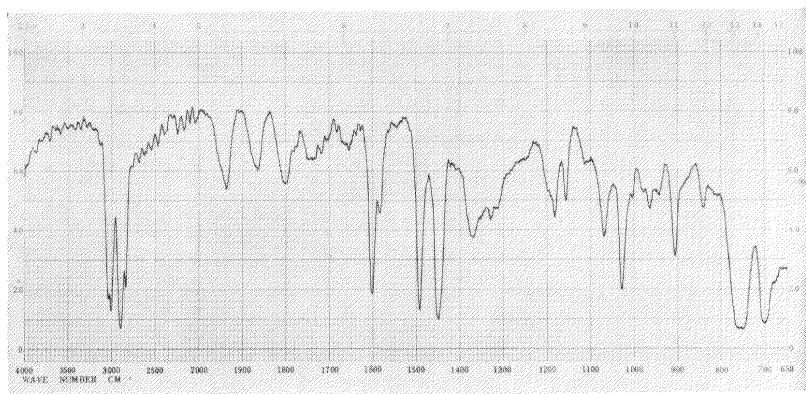
フィルムの場合は2mm角程度のデッキガラスの上に直接フィルムを作りそのまま測定できる。

2) KBr マイクロダイによる微量試料の測定



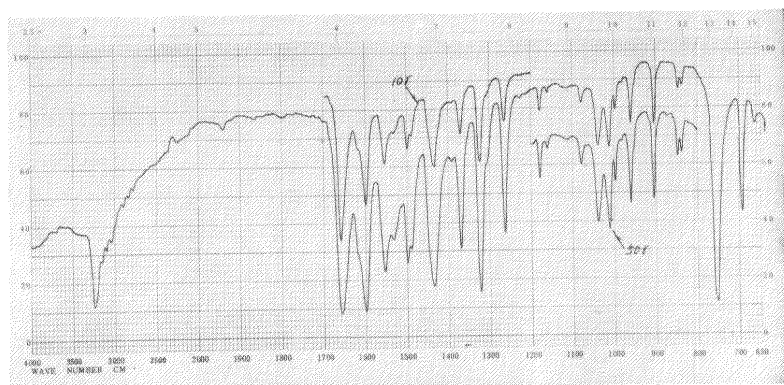
第3-a図 ポリスチレンフィルムの測定例

絞り系スリット $0.4\text{mm} \times 2\text{mm}$
分光器分解能 $4\text{cm}^{-1}/10\mu$
ゲイン 3
記録速度 15分



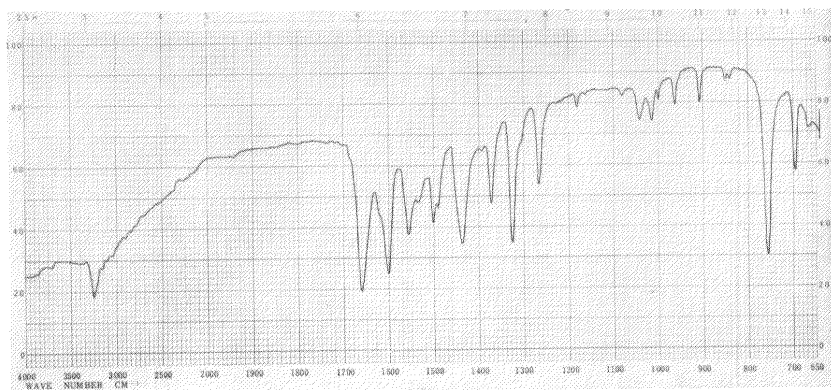
第3-b図 ポリスチレンフィルムの測定例

絞り系スリット $0.05\text{mm} \times 1\text{mm}$
ゲイン 2
記録速度 15分



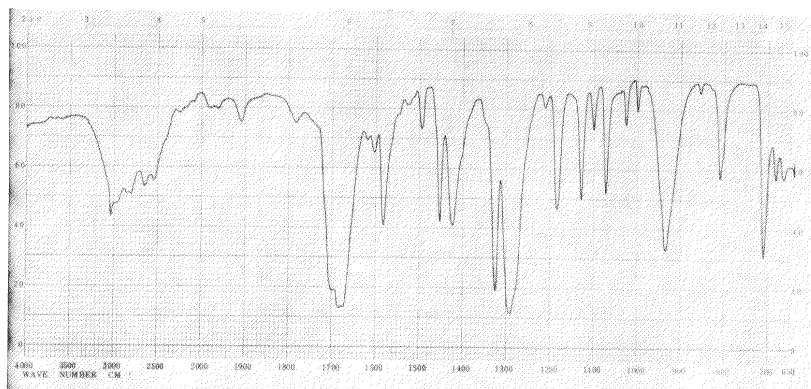
第4-a図 アセトアニリドのKBr マイクロダイによる測定例

試料量 25 γ (10 γ , 50 γ) KBr 5mg
絞り系スリット $0.1\text{mm} \times 2\text{mm}$
分光器分解能 $4\text{cm}^{-1}/10\mu$
ゲイン 3
記録速度 15分



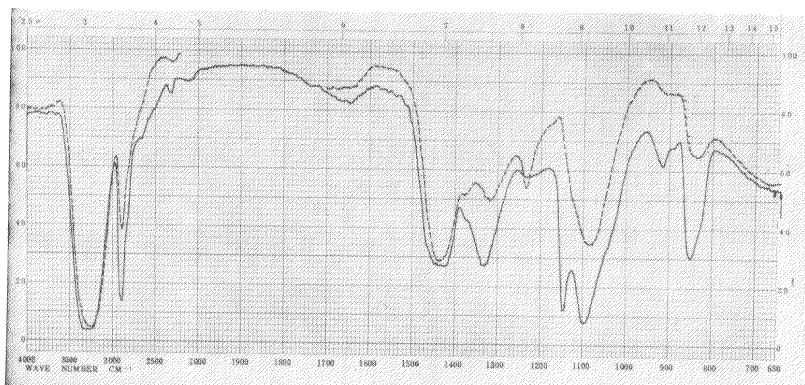
第4-b図 マイクロダイの中心にのみ試料を入れた

試料量 5 γ KBr 5mg
ゲイン 3
記録速度 15分



第5図 単結晶安息香酸の測定例

絞り系スリット 0.3mm×2mm
分光器分解能 $4\text{ cm}^{-1}/10\mu$
ゲイン 3
記録速度 15分



第6図 赤外二色性の測定例

試料 ポリビニールアルコール
絞り系スリット 0.4mm×1.5mm
分光器分解能 $4\text{ cm}^{-1}/10\mu$
ゲイン 3
記録速度 15分

——電気ベクトルが延伸方向に垂直
----電気ベクトルが延伸方向に平行

第4図 a) 試料はアセトアニリド ($\text{CH}_3\text{CONH C}_6\text{H}_5$) で2.5mmφのKBrマイクロダイにして測定した。試料量は25γ (μg) で部分的に10γ, 25γのデータを入れた。

b) 同じ試料で2.5mmφマイクロダイの中心にのみ試料を集めて5γの試料量で測定した。

サンプリングの工夫によりさらに微量の試料量でも測定可能である。

3) 単結晶の測定

第5図 安息香酸

単結晶の場合はデッキングラスとして KBr マイクロダイのプランクかアルカリハライド結晶を2mm角、厚み0.5mm程度に劈開して使用する。

4) 赤外二色性の測定

第6図 ポリビニールアルコール

赤外顕微鏡を使用して最も威力を発揮するのは偏光赤外線によってフィルム、単結晶の赤外二色性を測定することである。EPI-S₂では分光器スリット前に1個の偏光器をそう入して標準側、試料側両光束共に偏光した赤外線での測定ができるので有利である。試料としてポリビニールアルコールのフィルムを延伸して分子を配向させて延伸方向に垂直と平行の両偏光赤外線を透過させて測定した。

この装置で測定できる最少試料の大きさdは回折の方から限定され(1)

$$d = \lambda / N.A.$$

λ: 波長

N.A.: 開口数

できまる。

この値をIM-2PとIM-Kで比較したものが第2表である。

第2表 IM-2PとIM-Kの比較

	開口数	d	観測倍率
IM-2P	0.83	18 μ	200倍
IM-K	0.5	30 μ	50倍

これからIM-で測定できる最少試料の寸法は40μ~50μが限度である。したがって10μ程度の単繊維の測定は試料ホルダーに数本繊維を効率よく並べて測定する必要がある。

この装置での最も有利な測定対象試料は0.1mm×1mm以上の単結晶、フィルム、試料量1γ~20γ程度の微量試料のKBrマイクロダイによる測定、特に赤外二色性の測定には威力を発揮する。

参考文献

(1) 赤外線吸収スペクトル 第12集 (化学の領域) P. 23

原子吸光分析における干渉について

* 松平俊次・保田和雄

原子吸光度法による金属の分析の特長の一つに、自己干渉あるいは他原子による干渉の少ないことが挙げられる。原子吸光ではフレイム中の原子の基底状態からの遷移を、蛍光発光分析では、原子の励起状態からの遷移を測定している事になる。したがってこれらが干渉を受けるとすれば、原子吸光では基底状態において蛍光発光では励起状態において干渉を受けることとなる。

いま原子吸光度法による金属の測定値は、フレイム中の基底状態にある原子の数に比例し、またこのフレイムの発光強度はフ

レイム中の励起状態の原子の数に比例するものと考え、両者の測定値の相対比から、フレイムの中にできた原子蒸気間の干渉について洞察できる筈である。

すなわち一定濃度のCa塩化物の水溶液に、Na, K, Liの塩化物および塩酸、硫酸、りん酸の各種濃度の水溶液を添加した時のフレイムの中における原子蒸気の相互作用について検討した。

実験には日立分光光度計 EPU-2A およびその原子吸光付

* 日立製作所 那珂工場

属装置 RA-1 を用いた。なお、その際の実験条件を第1表に示す。

1. 陽イオンの影響

陽イオンとして Na, K, Li を選んだ。

Caの濃度に対して $1/10 \sim 10$ 倍の Na, K, Li を添加した時 422.7m μ での吸光度および発光強度の模様を第1図に示す。

第1図の測定値の比、すなわちこれらの物質を添加する事によって起るフレイム中の基底状態の原子数と、励起状態の原子数の相対的变化の模様を第2図に示す。

2. 陰イオンの影響

陰イオンとして 塩酸、硫酸、りん酸を選んだ。

Ca の濃度に対して $1/10 \sim 10$ 倍の塩酸、硫酸、りん酸を添加した時の吸光度および発光強度の様子を第3図に示す。

これらの測定値の相対比を第4図に示す。

第1図、第2図の結果から見ると、陽イオンを添加しても測定値は、実験誤差範囲内で一定値を示す。また吸光度と発光強度の相対比も一定値を示す。

したがって、フレイムの中にできた原子蒸気の間では、陽イオ

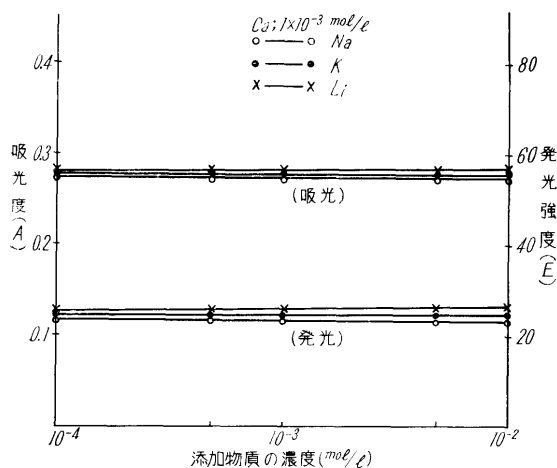
ンの干渉の効果はほとんどない。

一方、第3図の結果から見ると、陰イオンについては、従来の発光炎光に現われるような干渉は、同じように原子吸光にも現われてくる。しかも、第4図のように、吸光と発光強度の相対比はほぼ一定値を示す。この事からして、フレイムの中において、陰イオンのおよぼす共存原子相互の干渉は、原子蒸気が生成してから過程において起るのではなく、原子蒸気が生成するまでの過程において起るものと考えられる。すなわち、金属と陰イオンが何らかの形で化合物のようなものを作り、この事が金属の原子蒸気の生成を妨げるものと考えられる。

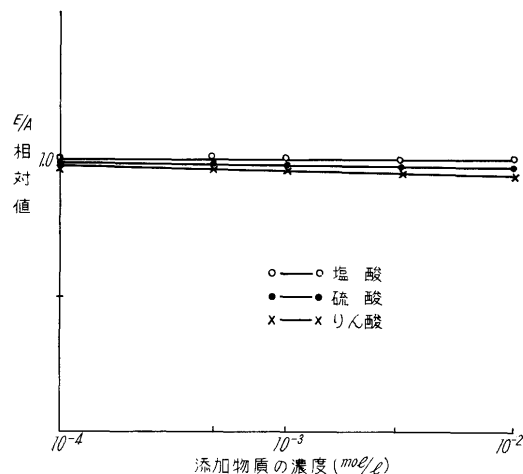
この干渉の問題を更に追求する事は、原子吸光の本質を明らかにするだけでなく、従来の炎光発光のフレイムにおける機構の本質をも明らかにするという意味からも興味深いものである。

第1表 実験条件

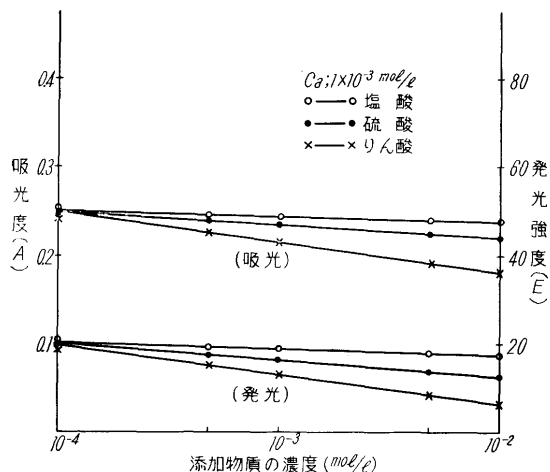
Ca の濃度	測定に用いた波長	分光器のスリット幅	燃料および助燃剤	ホロー・カソード・ランプ電流
$1 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$	4227Å°	0.03mm	アセチレン、空気	60mA



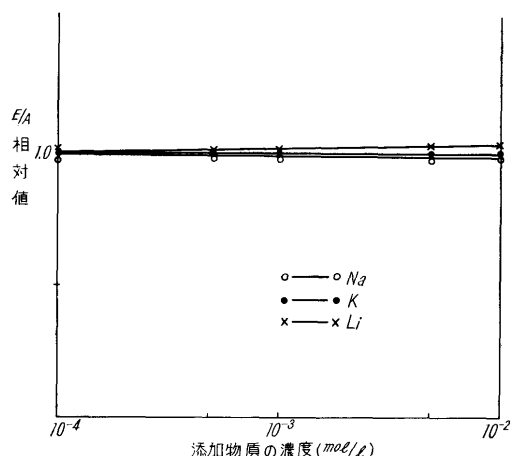
第1図 Ca に対する陽イオンの影響



第2図 吸光度と発光強度の相対比



第3図 Ca に対する陰イオンの影響



第4図 吸光度と発光強度の相対比

日 製 産 業 株 式 會 社

本 社 東京都千代田区神田町1丁目17番地(楠本ビル)

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