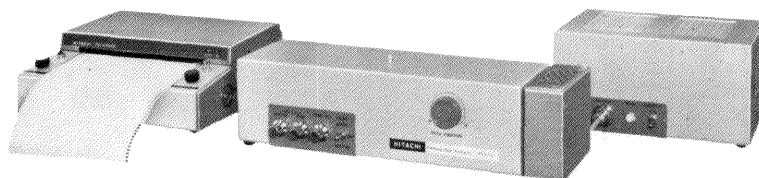


# THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

April  
1967  
Vol. 10  
No. 2

## ■ PSA-2形日立光走査迅速粒度分布測定装置による粒度分布測定

上田 康\* 内海良治\*



### 1. はじめに

粉体の粒度分布の測定にはいろいろな方法が適用されている。その内の一つに、液体中における粉体粒子の沈降速度が粒子径により相違することを利用して粒度分布を測る方法がある。試料粉体を液中に均一に懸濁させ、しばらく放置すると、最初均一であった粒子濃度が、時間の経過とともに沈降筒の高さ方向に変化し、濃度こう配が生ずる。この濃度こう配を測定し、粉体粒子の沈降の式より解析すると、試料粉体の粒度分布を求めることができる。沈降筒の一定深さの点の濃度の時間に対する変化を測定する方法に、その点の懸濁液の比重を直接的に測るための比重計法<sup>1)</sup>、および、間接的にその点に光を当て、その点に存在する粒子によるしゃへい<sup>2)</sup>の割合を受光量から求める光透過法<sup>2)</sup>とがある。また、一定時間経過後の濃度こう配を連続的に測定するため、比重を測定する方法として、比重天秤法<sup>3)</sup>、光透過法の原理を使用する方法に光走査法とがある。

懸濁液の濃度の変化を測る方法は、他の沈降法に比べ、測定点の深さを浅くし得るので、沈降に要する時間が短かくてすむ。特に、一定時間経過した後、濃度こう配を測る方法はさらに沈降時間を短かくできる。光走査法は、比重天秤法に比べ走査時間を短かくできて有利である。また、光透過法、光走査法のいずれの方法においても、沈降筒の外側から光をあてるのみであるから、光による熱対流を考えなければ、機械的に懸濁液を攪拌することもないので測定誤差が小さいとも言える。

### 2. 再現性

PSA-2形は光走査式の粒度測定器であるので、一度試料粉体の懸濁液を作れば時間の経過と共に何回も測定を繰り返して行うことができる特徴をもっている。この特徴を利用して再現性を調べてみた。割合粒度分布範囲の狭いホワイトアランダム#1500を試料として、沈降時間を変えて数回測定した記録紙を重ね合わせたものが図1である。この図より、時間が増加してもほぼ同じような傾向を示すことがわかった。

粒子の沈降速度が、Stokesの式に従うものとすれば、粒子

半径  $r$  (cm) と沈降距離  $h$  (cm) および沈降時間  $t$  (sec) との関係は、

$$r = \sqrt{\frac{9\mu h}{2g(\rho_s - \rho)t}} \quad (1)$$

で表わすことができる。ここで、 $\mu$  ( $g/cm \cdot sec$ ) は沈降液の粘性係数、 $\rho_s$  ( $g/cm^3$ ) は粒子の真密度、 $\rho$  ( $g/cm^3$ ) は沈降液の密度である。

いま、半径  $r$  の粒子に着目したとし、 $h$  と  $t$  との関係を求めると

$$\sqrt{h} = \sqrt{\frac{2g(\rho_s - \rho)r^2}{9\mu}} \times \sqrt{t} = K\sqrt{t} \quad (2)$$

で表わすことができる。沈降時間を 60 sec とすると

$$\sqrt{h_{60}} = K\sqrt{60} \quad (3)$$

となり、

$$K = \sqrt{h_{60}/60} \quad (4)$$

2) 式に代入すると

$$\sqrt{h} = \sqrt{60/t} \times \sqrt{h_{60}} \quad (5)$$

となる。

沈降時間の異なった図1の曲線を(5)式により 60 sec 沈降に換算したものが図2である。測定時間が、55 sec か

### 目 次

- PSA-2形 日立光走査迅速粒度分布測定装置による  
粒度分布測定……………上田 康 内海良治……………1
- 日立電子顕微鏡付属の微小部 X線分析装置の応用例  
藤安辰雄 赤堀 宏……………3
- RSP-2形 日立ラピッド・スキャン形分光光度計による  
“Benzene-水” 界面でのBTB ブロムチモールブルー：pH  
指示薬) のスペクトル測定…臼井義春 奥田典夫……………5
- 原子吸光分析法による血清Ca濃度の測定  
……宮崎好信 加奈川宏 瀬口悦子……………6
- KLA-3A形 日立アミノ酸分析計によるTryptophanの  
迅速定量法……………篠野雄……………8
- 203形 日立分光蛍光光度計の測定例 ……嶺岸久子……………10

\* 名古屋工業技術試験所 第1部第1課長  
\*\* 名古屋工業技術試験所 第1部第1課 技官

ら125 secまでの曲線には多少差があるが、145 sec から325 sec までの曲線はほぼ同一曲線と見なしてよいと思われる。試料として使用したホワイトアランダム#1500は、図3に示すように粒度分布範囲が狭いので、透過光束が点でなく面積をもつことを考えると、沈降時間が長い程、濃度こう配がゆるやかになって、測定精度が上がるものと考えられる。

### 3. 測定方法私案

図4は前試料に比べ粒度分布範囲の広いフライアッシュを、沈降時間を変えて測定した例である。この場合、粒度分布が広いので図1のような曲線群とはならなかった。一般的に言って、沈降時間を変化させた測定例は大体このような傾向を示すものである。これらの曲線から所定の解析を行い粒度分布を求める場合、各曲線に現われる最大粒子径は沈降時間が長いほど小さくなり、大きな径の粒子は沈降してしまって測定できなくなる。従って試料全体の最大粒子径を見つけない場合、沈降時間を長くすることはできなくなる。この最大粒子径は、図1の曲線群において右下の横軸と平行になっている部分より読み取ることができ、曲線が横軸と平行でなくな

る点の $\sqrt{h}$ より粒子半径 $r$ を決定することができる。従って、粒度分布範囲の広い粉体を測定する場合、沈降時間が短かく、右下部分に横軸と平行な部分をもつ曲線と、さらに沈降時間が長く、透過光強度が大きくでる曲線とを求め、まず平行部分のある曲線を解析しておき、求めた他の曲線の最大粒子径以上の粒子の量を加えて解析すればよい。

この方法により、フライアッシュの最大粒子径は沈降時間10 secの曲線より求めることができ、微小粒子径の部分は130 secより解析した方がより正確に求められる。このようにして求めた結果が図5である。

### 4. むすび

PSA-2 形光走査式粒度分布測定装置は、同一試料を同一条件で分散した状態で再現性がよく、何度も繰返えて測定できる特性を利用して、相当広い粒度分布を短時間で測定できると考えられる。

1) 2) 3) 粉体工学研究会編：粉体粒度測定法，養賢堂，(昭40)

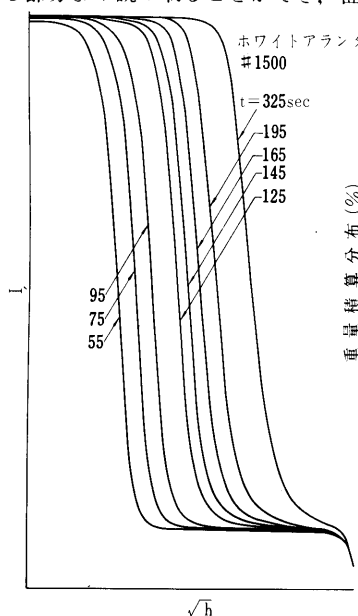


図1.  $I - \sqrt{h}$  曲線の時間による変化

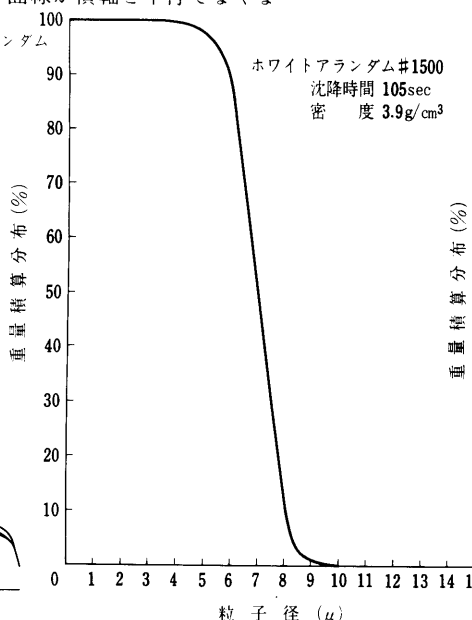


図3.

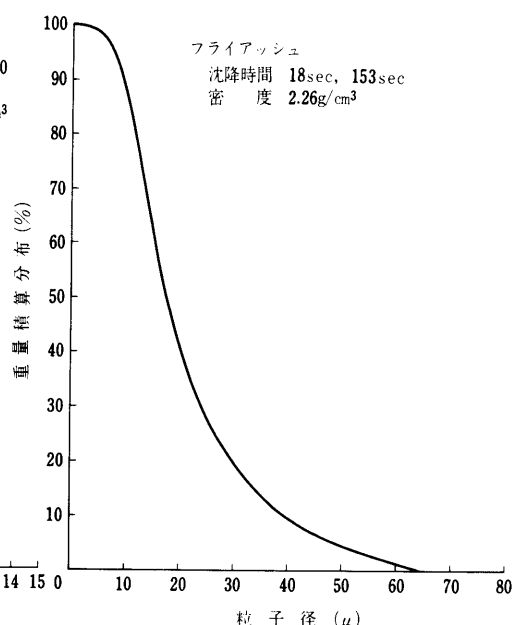


図5.

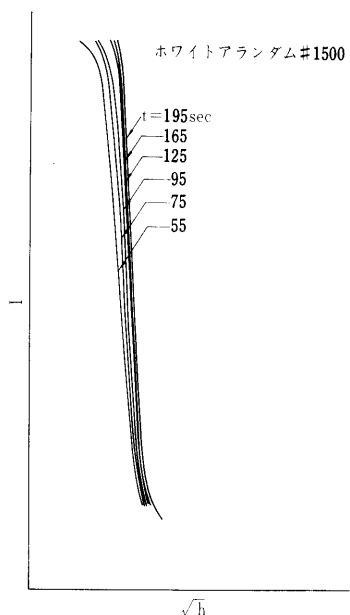


図2.

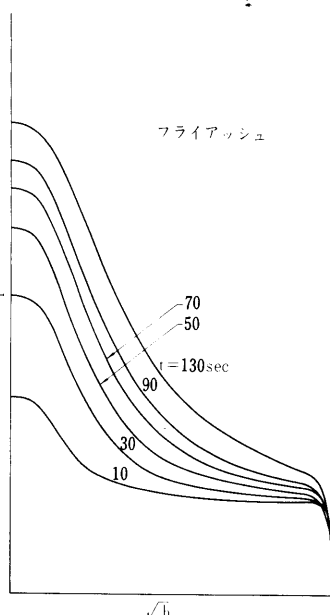


図4.  $I - \sqrt{h}$  曲線の時間による変化

# ■ 日立電子顕微鏡附属の微少部X線分析装置の応用例

赤堀 宏\* 藤安辰雄\*

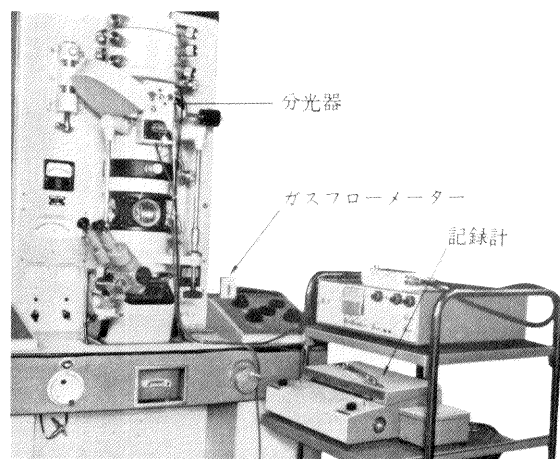
## I. 緒 言

電子顕微鏡の附属装置として開発された微少部X線分析装置は、薄膜試料の成分元素分析、その同一視野での形態観察、結晶構造解析が可能であるという特長を生かし、既に各方面で種々の成果を出しつつある。しかしこの装置のように、微少領域(2 $\mu\phi$ 程度)のしかも薄膜(厚さ1 $\mu$ 以下)を対象としている場合は、検出強度を極力高めるようにしなければならない。本装置では分光結晶にマイカ結晶を使用し分光器の回転範囲は20°~80°(2 $\theta$ 表示、 $\theta$ :ブラッグ角)となっている。従ってその分析範囲は1, 3, 5次の反射及びK, L両系列のX線を扱い、U( $\lambda=0.126\text{\AA}$  Z=92)からNa( $\lambda=11.909\text{\AA}$ , Z=10)迄が分析出来る事になる。これ等のX線に対する検出強度は、試料による事他に検出器の量子効率及び結晶の反射強度により決定される。

検出器の量子効率はその構造によって各波長に対しある分布をとるが、長波長のX線に対する検出効率の低下は、X線入射窓の膜の材質、厚みに依存する所が大きい。そこでこれらの要素を補うため長波長X線に対しさらに優れた反射強度を有する結晶を検討した。使用した結晶はKAP(Potassium acid Phthalate:  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ )で2 d spacingとして26.6328 $\text{\AA}$ をもつ斜方晶系の結晶である。第1図に本装置の外観図を示す。

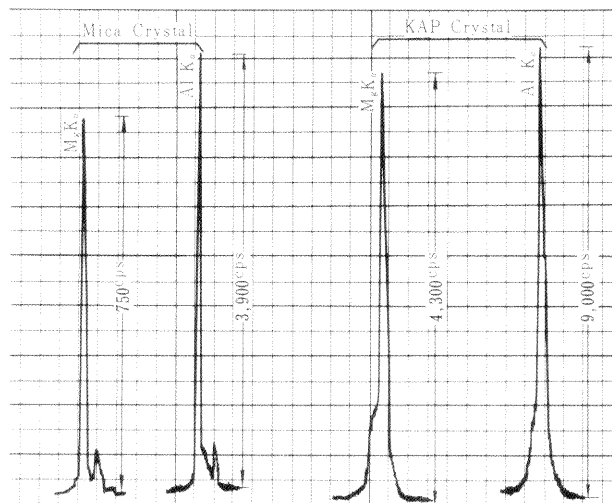
## II. 結 果

第2図は純Al及びMgに対するPeak Profileである。右側がKAPを、左側がマイカを使用した場合のものである。本実験ではKAP結晶を使用した時の検出器の窓の厚みとマイカの場合のそれとが異なるので、その違いによる強度の相違及び試料電流の違いを校正するとAlの場合に約3倍、Mgの場合に



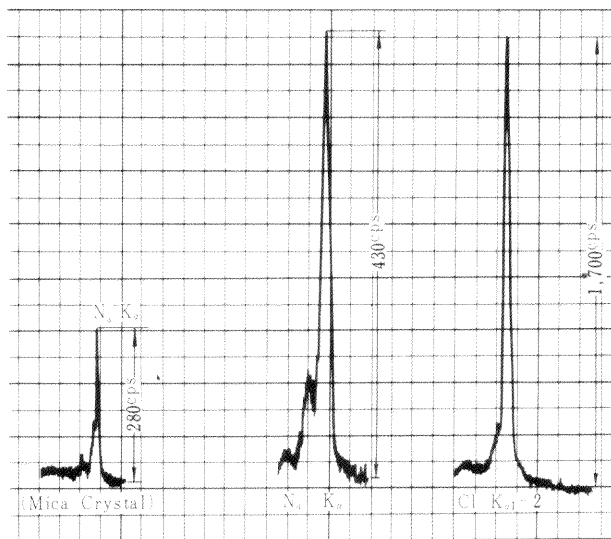
第1図 装置の外観図

は約8倍の検出強度がKAP結晶を使用する事により得られている。第3図はNaClの分析例である。Naの検出強度はKAPを使用した場合の方が約13倍増加している。第4図及び第5図はKAP結晶を使用した場合のAl, Si, Mg合金の分析例でその含有量はAl 95%, Mg 1%, Si 4%である。第4図でのAl, Mg, Siの強度比は36:1:2であるが、同一試料で視野を変えた場所では、第5図に示すように強度比は2:1:9となっており、この試料が偏析の多いものである事が解る。第6図は含有量がAl 99%, Mg 0.6%, Si 0.4%の合金の分析例



第2図 純Al, MgのPeak profile

|                                              |                                              |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| SAMPLE: PURE Al, Mg                          | SAMPLE: PURE Al, Mg                          |
| SAMPLE CURRENT: $1.3 \times 10^{-8}\text{A}$ | SAMPLE CURRENT: $1.1 \times 10^{-8}\text{A}$ |
| CRYSTAL: MICA                                | CRYSTAL: KAP                                 |
| ACC. V: 50kV                                 | ACC. V: 50kV                                 |
| F. W. H. M.: 0.043 $\text{\AA}$              | F. W. H. M.: 0.094 $\text{\AA}$              |



第3図 NaClの分析

|                                            |                                              |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
| SAMPLE: NaCl                               | SAMPLE: NaCl                                 |
| SAMPLE CURRENT: $1 \times 10^{-8}\text{A}$ | SAMPLE CURRENT: $3.8 \times 10^{-8}\text{A}$ |
| CRYSTAL: MICA                              | CRYSTAL: KAP                                 |
| ACC. V: 50kV                               | ACC. V: 50kV                                 |

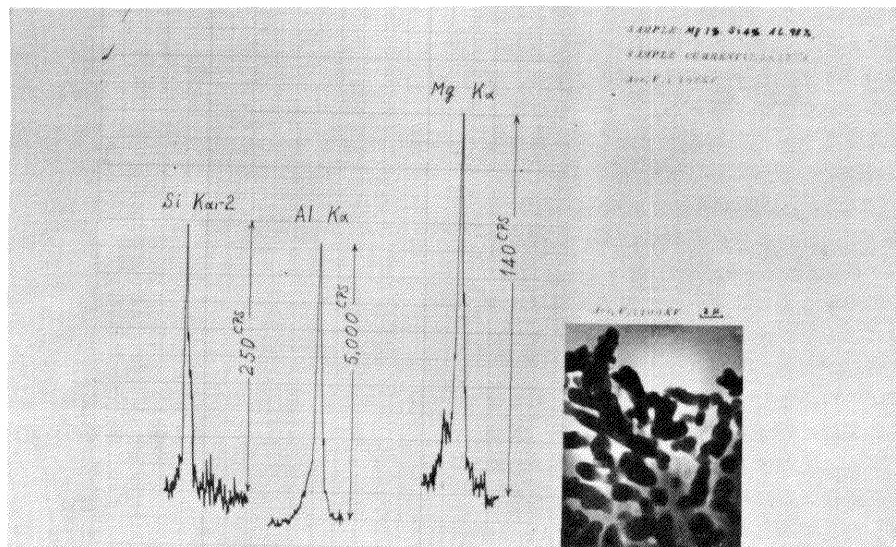
である。この試料に於ては0.6%のMgは検出されているが0.4%のSiは検出されていない。これはSi X線のAl及びMgに対する吸収係数が3500~4500という大きな値であることによるものと思われる。

### III. 結 言

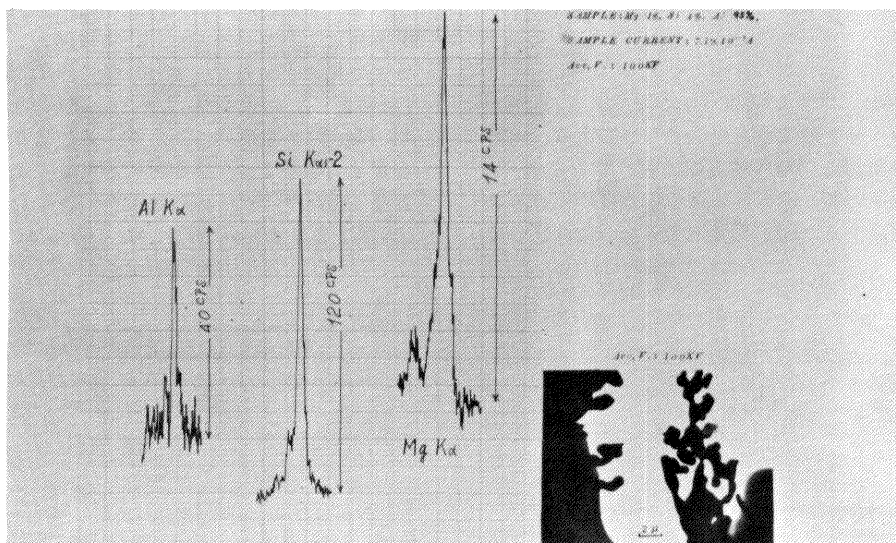
KAP結晶を使用した場合の長波長元素に対する検出強度の有位性を示した。本分光器にこの結晶を使用した場合、1次反射のX線を使用する事により、その分析波長範囲は4.7

~17 Åであり、Na(Z=10)からCl(Z=17)迄が分析可能である。高次のX線を使用すればその分析波長範囲はさらに広げられるが、KAPの場合1次以外の高次反射のX線に対しては反射強度が劣り、高次反射には使用しないのが普通である。

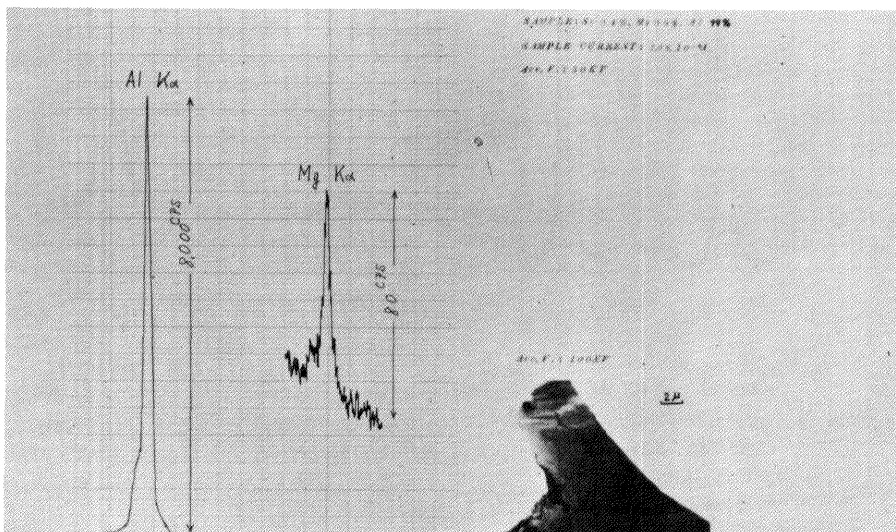
最後に本実験のためにAl合金試料を御提供下された日本軽金属研究所、渡辺良雄博士に厚く御礼申し上げます。



第4図 Al, Mg, Si, 合金の分析



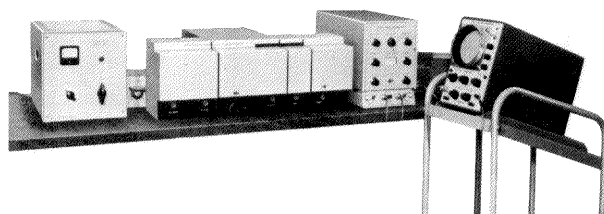
第5図 Al, Mg, Si, 合金の分析



第6図 Al, Mg, Si, 合金の分析

# ■ RSP-2形日立ラピッド・スキャン形分光光度計による“Benzene-水”界面でのBTB(ブロムチモールブルー・pH指示薬)のスペクトル測定

臼井義春\* 奥田典夫\*



界面でのpH指示薬の吸収スペクトルを測定する際に、発泡安定剤(例えばDodacyl benzene sulfate)の影響を除くため、それを含まぬ系で測定する必要がある。測定には日立RSP-2(ラピッド・スキャン形分光光度計)が好適と思われ、予備的に界面のSpectraを迅速測定した結果を述べる。

## ＝測定＝

試料A：pH 8～6位の約6種のリン酸塩緩衝液を2 cc，試料B：特級ベンゼン2 cc，試料C：BTB(Bromothymol Blue;ブロムチモールブルー)を適当量とる。以上3種の試料を混合しセルへ移してから、約20秒程度振盪した後スペクトルの変化をラピッド・スキャン形分光光度計で追跡する。

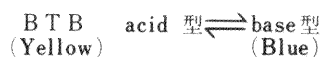
## ＝結果＝

結果の代表的な例をFig.1A～3Aに示す。これは縦軸に透過率T%，横軸に波長を取ったものである。

Fig.1 B～3 Bは、Fig.1 A～3 Bを光学密度に計算したものである。

メモリ・スコープ写真では泡の変化(消失)によるOptical densityの変化が指示薬の吸収変化と重り合うため等吸収点は見られないが、補正することにより図1 A～3 Aで示すI

Bの様に等吸収点が見られ明らかに



の平衡が

泡の表面で起っていると思われる。

## ＝問題点＝

1. Referenceを“水-ベンゼン”のみの泡に出来なかったこと。
2. 反射(散乱)が多いのでオパール・ガラスを用いる必要がある。

以上、RSP-2形で“Benzene-水”界面でのBTB Spectra測定の報告である。

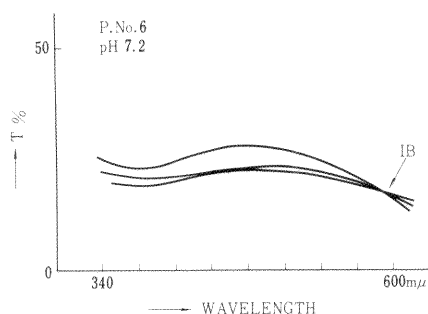


図 3 A

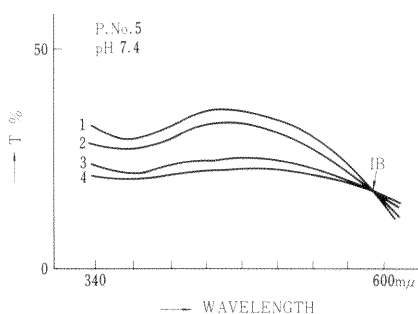


図 2 A

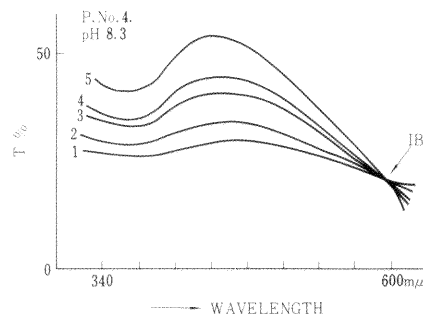


図 1 A

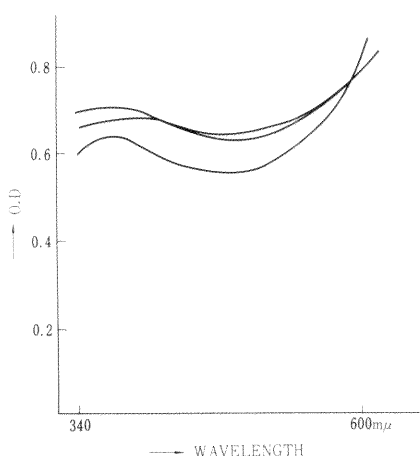


図 3 B

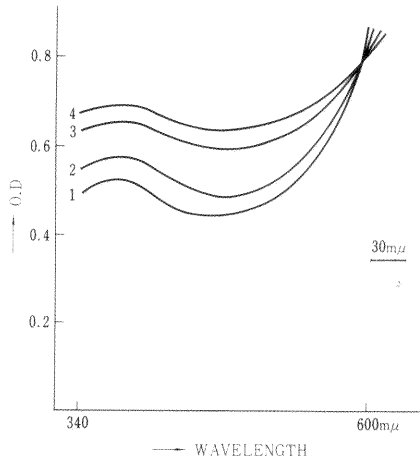


図 2 B

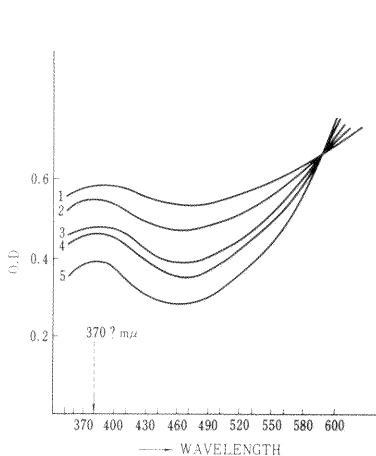


図 1 B

## ■ 原子吸光分光分析法による血清Ca濃度の測定

宮崎 好信・ 加奈川 宏\*\* 瀬口 悦子\*\*\*



宮崎 好信



瀬口 悦子



加奈川 宏

血清Caの定量は臨床生化学では重要な検査項目であり、是非とも中央検査室で実施しなければならない項目の一つである。然しその測定方法は非常に多数報告されているが、正確性、迅速性、精度、試料の必要量等から見ると満足出来る方法は少ない。

焰光分光分析法によるCaの定量法はその操作が比較的単純で迅速性があり、さらにまた少量の試料で足りる等の特徴があるため、現在、臨床検査にも広く用いられているようである。然し生体試料では共存物質の影響、殊に磷の共存による影響を無視出来ないと考えられるので、日常臨床検査法として取入れるには一考を要する。

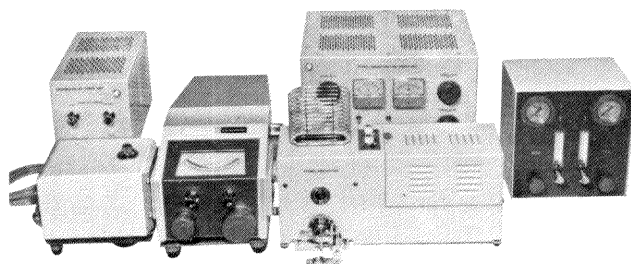
このような欠点を補うためWalsh<sup>(1)</sup>によって提案された原子吸光分光分析法(Atomic Absorption Spectrophotometry)が注目されてきた。本法によるCaの測定法についても、Willis<sup>(2)</sup>、Zettner<sup>(3)</sup>、Sunderman<sup>(7)</sup>等の報告があるが、殊にZettnerのPerkin Elmer Model 214型原子吸光分光光度計を使った報告は測定精度、干渉、回収試験等について精細に検討しており、その実用的価値を充分認識出来る。又Willis<sup>(2)</sup>、武内<sup>(4)</sup>等は焰光、原子吸光分析で考えられる焰中の共存物質の影響を次の3点に分けて論じている。即ち①分光的干渉(spectral or radiation interference)：測定に用いるスペクトル線が分光器で完全に分離出来ないために生じる現象 ②励起干渉(excitation interference)：共存物質のため、わづかの温度変化によっても励起原子の数に大きな変化が起り、発光強度が、大きく変化する現象 ③化学的干渉(chemical interference)：共存物質が被検元素と化学的に結合し、焰中で容易に解離しない物質に変化する現象、である。

原子吸光分光分析法では以上の3点のうち、分光的干渉は焰光法と異り、光源より出る共鳴線(resonance line)の吸収を測定し、発光強度を測定するのではないので考慮する必要がなく、励起干渉は原子吸光分光分析で主役を演ずる基底状態(ground state)の原子数が励起原子数に比べて非常に多く、焰の温度が多少変化しても殆んどその数の変化がないため無視出来る。従って本法では化学的干渉を防ぐ方法を構ればよいので、共存物質多数を持っている生体試料では本法による測定が秀れていると考えられる。

我々も以上のような特徴を持つ原子吸光分析法は臨床検査として適しているものと考え、当中央検査部でも本法による血清Caの定量法について検討を加えてきたので、その結果を報告し、御参考に供し度。

### 実験方法

1. 測定装置：日立製139型分光光電光度計に原子吸光付属装置を付加して使用した。
2. 測定条件：波長 422.7mμ, スリット幅 2.0mm, 放電電流



20mA, アセチレン圧 0.4kg/cm<sup>2</sup>, アセチレン流量 1.5ℓ/min., 空気圧 1.4kg/cm<sup>2</sup>, 空気流量 7.0ℓ/min.

3. 血清希釈液：塩化ランタン(LaCl<sub>3</sub>)0.5%(w/v), Butanol 6%(v/v), Octanol 0.02%(v/v)になるように0.1N塩酸を用いて希釈液を調製し、これで血清を20倍に希釈して測定に供した。
4. 標準液の作製：第一化学製Ca標準液(1mg/ml)から、0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 13.0, 15.0mEq/Lになるよう0.9%生理食塩水で希釈して各種標準液を作製した。
5. EDTA滴定法：柴田<sup>(5)</sup>の記載する方法によった。

### 実験結果

#### A. 基礎実験

1. 中空陰極ランプの最適電流値の選定：中空陰極ランプの電流値を15mAから30mA迄変化させて、8.0mEq/LのCa標準液を測定した結果は第1表に示す通りで、電流値が最も低い15mAのとき吸光度が最大であったが、測定値が動揺し易い傾向があるため、吸光度が比較的大で、安定な20mAが測定条件として最も適当であることが分った。
2. Blankの選定：試料測定時のBlankに蒸留水を使用した場合と、試料を希釈する有機溶媒を使用した場合を0.5mEq/Lから15.0mEq/L迄の各種標準液について、それぞれの吸光度を比較してみると、第2表に示すように余り大差がなく、又有機溶媒をBlankにした場合はburnerの汚染が早いため、蒸留水をBlankとして測定することにした。
3. 血清希釈用溶媒の検討：第3表、第1図に示すように各種標準液をLaCl<sub>3</sub>, Butanol, Octanolを含む有機溶媒で希釈した場合と、蒸留水で希釈した場合とを比べてみると、有機溶媒を使用した場合は4mEq/Lまで直線性があり、それより高濃度になると、やや凸型の湾曲を示し、蒸留水で希釈した場合は6mEq/Lまで直線性があり、それ以上の濃度で、やはり同様な傾向を示していた。又第1図から容易に分るようには、有機溶媒を使用することによって蒸留水の場合に比べて、約1.7倍の感度増加が得られた。

#### B. 血清Ca濃度の測定

1. 原子吸光分光分析法とEDTA滴定法との比較：同一血清について上記基礎実験で得られた測定条件で測定した値および、EDTA滴定法による値は、第4表に示す通りで、20例について夫々の平均値をみると、原子吸収法では4.6±

\* 熊本大学医学部産婦人科学教室 講師  
熊本大学医学部附属病院中央検査部  
\*\* 熊本大学医学部附属病院中央検査部 助手  
\*\*\* 熊本大学医学部附属病院中央検査部 検査技師

0.28mEq/Lで、EDTA滴定法では  $4.7 \pm 0.25 \text{mEq/L}$  で、前者がやや低い傾向を認めるが、両値の差の平均は  $\pm 0.23$  であり、両値の標準偏差以内の値であった。

2. 回収試験：本法による測定値、4.05, 4.05, 4.45, 4.40 mEq/Lの血清に、測定値5.00, 3.20, 6.00mEq/LのVersatolを等量、充分に混合して、夫々の値を原子吸光法で測定し、その計算値と比較してみると、第5表のように実測値は計算値よりやや、低く、95.0%の回収率であった。

次にEDTA滴定法<sup>(5)</sup>による回収試験の成績は第6表の通りである。柴田<sup>(5)</sup>によればEDTA滴定法は蛋白の影響が少いといわれるので、各Ca濃度の血清に各種Ca標準液を等量に混合して、その実測値と理論値を比較してみた。その回収率は99.2%で原子吸収法よりやや、良好であった。

## む す び

我々は日立製139形分光光電光度計に原子吸収附属装置を付加して、血清Ca濃度の測定条件、測定精度を検討して次の結果を得た。

1. 中空陰極ランプの放電電流値は20mAが最も適当である。
2. Blankには蒸留水を使用しても、血清稀釈に使用する有機溶媒を使用してもその吸光度は大差がない。
3.  $\text{LaCl}_3$  0.5% (w/v), Butanol 6% (v/v), Octanol 0.02% (v/v) 含有の0.1N塩酸を血清稀釈用溶媒として使用すれば、20倍稀釈血清で良好な測定成績を得ることが出来る。又蒸留水で稀釈した場合の1.7倍の感度増加が得られる。

第1表 中空陰極ランプ電流値と測定値(吸光度)の変動

|       | 第1回   | 第2回   | 第3回   | 最大値—最少値 |
|-------|-------|-------|-------|---------|
| 15 mA | 0.250 | 0.245 | 0.245 | 0.005   |
| 20 mA | 0.242 | 0.240 | 0.240 | 0.002   |
| 25 mA | 0.230 | 0.220 | 0.220 | 0.010   |
| 30 mA | 0.230 | 0.223 | 0.220 | 0.010   |
| 35 mA | 0.220 | 0.212 | 0.210 | 0.010   |

Ca: 8mEq/L

第2表

| 標準液<br>mEq/L | Blankの種類     |               |
|--------------|--------------|---------------|
|              | 蒸留水<br>(吸光度) | 有機溶媒<br>(吸光度) |
| 0.5          | 0.023        | 0.020         |
| 1.0          | 0.032        | 0.026         |
| 2.0          | 0.054        | 0.050         |
| 4.0          | 0.095        | 0.090         |
| 5.0          | 0.112        | 0.109         |
| 6.0          | 0.132        | 0.126         |
| 8.0          | 0.170        | 0.166         |
| 10.0         | 0.202        | 0.200         |
| 13.0         | 0.250        | 0.250         |
| 15.0         | 0.284        | 0.284         |

有機溶媒を使用する意義については Zettner<sup>(3)</sup>は Butanol には感度増加作用よりもburnerに蛋白凝固物の沈着するのを防ぎ、OctanolはButanolを加えることによって生ずる泡沫の発生を抑制する作用があり、 $\text{LaCl}_3$ は感度増加作用があるといっている。又 Butanolを8%よりも6%とし、塩酸で酸性化するのは Butanolによる蛋白の沈澱を防ぐ作用があるといっている。従ってこの組成の有機溶媒は感度増加のためだけでなく、蛋白を含む血清を試料とする場合に好都合である。

4. EDTA滴定法と一致した成績を得た。

5. 回収率は95.0%であった。

以上の成績よりEDTA滴定法が原子吸収法よりやや勝っているように思えるが、前者では相当の熟練を必要とし、多数の検体を能率よく処理するには不適當である。従って中央検査室等では原子吸収法が適當であると考ええる。

## 参 考 文 献

1. Walsh, A. Spectro. Chemica Acta, 7, 108, 1955
2. Willis, J. B. Clin. Chem., 11, 2, 251, 1965
3. Zettner, A. Clin. Chem. 10, 10, 869, 1964
4. 武内：原子吸光分光分析法 南江堂 昭39
5. 柴田：臨床化学の技術 金原 241頁 昭38
6. Willis, J. B. Nature, 186, 249, 1960
7. Sunderman, F. W., Am. J. Clin. Path. 43, 4, 302, 1965

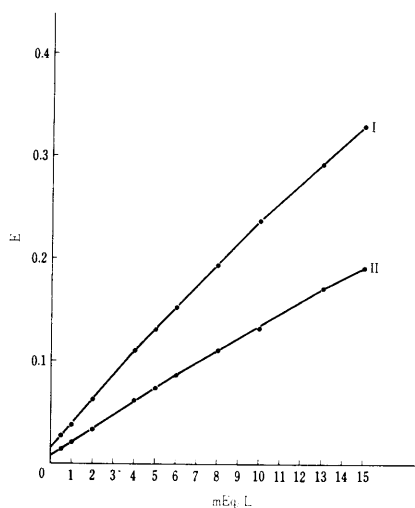
第3表 稀釈液の吸光度に及ぼす影響

| mEq/L | 蒸 溜 水 | 有 機 溶 媒 |
|-------|-------|---------|
| 0.5   | 0.014 | 0.027   |
| 1.0   | 0.020 | 0.037   |
| 2.0   | 0.033 | 0.062   |
| 4.0   | 0.062 | 0.110   |
| 5.0   | 0.073 | 0.130   |
| 6.0   | 0.086 | 0.152   |
| 8.0   | 0.110 | 0.192   |
| 10.0  | 0.130 | 0.236   |
| 13.0  | 0.170 | 0.290   |
| 15.0  | 0.190 | 0.328   |

第1図 Ca 標準曲線

使用標準液：Ca 1mg/mlを0.9%NaClで各濃度に稀釈

- I. 標準液0.5ml+有機質含有溶媒  $\begin{Bmatrix} 0.5\% \text{ LaCl}_3 \\ 6.0\% \text{ Butanol} \\ 0.02\% \text{ Octanol} \end{Bmatrix}$  in 0.1% HCl 9.5ml
- II. 標準液0.5ml+H<sub>2</sub>O 9.5ml



第4表 原子吸光分光分析法とEDTA滴定法の比較

| No.    | 原子吸光<br>(mEq/L) | EDTA滴定<br>(mEq/L) | EDTA値-原子吸光値<br>(mEq/L) |
|--------|-----------------|-------------------|------------------------|
| 1.     | 4.8             | 4.8               | 0.0                    |
| 2.     | 4.5             | 4.6               | +0.1                   |
| 3.     | 4.4             | 4.7               | +0.3                   |
| 4.     | 4.4             | 4.3               | -0.1                   |
| 5.     | 4.5             | 4.7               | +0.2                   |
| 6.     | 4.4             | 4.6               | +0.2                   |
| 7.     | 4.2             | 4.3               | +0.1                   |
| 8.     | 4.3             | 4.6               | +0.3                   |
| 9.     | 4.8             | 4.5               | -0.3                   |
| 10.    | 4.7             | 4.6               | -0.1                   |
| 11.    | 4.6             | 4.7               | +0.1                   |
| 12.    | 4.6             | 4.6               | 0.0                    |
| 13.    | 4.7             | 4.4               | -0.3                   |
| 14.    | 5.2             | 4.8               | -0.4                   |
| 15.    | 4.2             | 4.6               | +0.4                   |
| 16.    | 4.7             | 4.7               | 0.0                    |
| 17.    | 4.4             | 4.6               | +0.2                   |
| 18.    | 4.6             | 4.6               | 0.0                    |
| 19.    | 4.8             | 5.2               | +0.4                   |
| 20.    | 5.2             | 5.3               | +0.1                   |
| m±S. D | 4.6±0.28        | 4.7±0.25          | 差の平均値±0.23             |

第5表 回収試験（原子吸光分光分析法）

| 添加血清Ca濃度 | 原 血 清 Ca    濃 度    mEq/L |                |                |                |
|----------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|
| mEq/L    | 4.05                     | 4.05           | 4.45           | 4.40           |
| 5.00     | 4.15<br>(4.53)           | 4.15<br>(4.53) | 4.35<br>(4.73) | 4.15<br>(4.70) |
| 3.20     | 3.55<br>(3.63)           | 3.55<br>(3.63) | 3.55<br>(3.83) | 3.55<br>(3.80) |
| 6.00     | 5.00<br>(5.03)           | 5.00<br>(5.03) | 5.10<br>(5.23) | 5.10<br>(5.20) |

( ) 内の数値は計算値を示す。回収率95.0%

第6表 回収試験（EDTA滴定法）

| 添加Ca濃度 | 原 血 清 Ca 濃 度 mEq/L |                |                 |                 |
|--------|--------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| mEq/L  | 5.10               | 4.90           | 5.00            | 4.90            |
| 2.00   | 3.20<br>(3.55)     | 3.30<br>(3.45) | 3.40<br>(3.50)  | 3.40<br>(3.45)  |
| 5.00   | 5.00<br>(5.05)     | 5.10<br>(4.95) | 5.00<br>(5.00)  | 5.00<br>(4.95)  |
| 10.00  | 7.30<br>(7.55)     | 7.50<br>(7.45) | 7.60<br>(7.50)  | 7.60<br>(7.45)  |
| 15.00  | 10.00<br>(10.05)   | 9.80<br>(9.95) | 9.80<br>(10.00) | 10.50<br>(9.95) |

( ) 内の数値は計算値を示す。回収率99.2%

## ■ KLA-3A形日立アミノ酸分析計によるTryptophanの迅速定量法

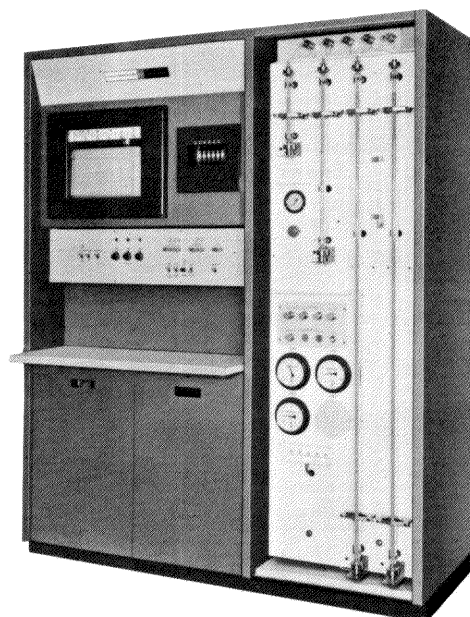
篠野雄一\*

迅速アミノ酸自動分析計の普及により、従来20時間以上を要した全アミノ酸の分析が4～5(註)時間で測定可能となり、我々の関係している食品、飼料分野に於ても、短時日の間に数多くのデータが集められ、研究の急速な進展が見られる様になった。各アミノ酸を正確に分離定量する方法は色々検討され問題点は殆ど無い様であるが、Tryptophanについては測定法が充分とは云えない様に思える。



標準アミノ酸混液の場合には、9×150mmカラムで、pH 5.28クエン酸緩衝液により、Lysineの前に鮮明なTryptophanピークが現われるが、実際の試料では対称性の良いシャープなピークは得られず、Lysineとの分離も悪く吸光度法で辛うじて計算は出来るが信頼度は低い。(このピークは後に述べる様に他物質の重なりのあることがわかった)

Tryptophanは含有量の少い必須アミノ酸で、定量値の僅かな違いが栄養価の判定に影響する処が大きく最も正確な値が



\* 大洋漁業株式会社 大洋研究所 主任研究員

要求されるアミノ酸であるので自動分析計による定量法として精度の良い方法が何か無いのかと探していた処、溶離緩衝液にベンジルアルコールを添加すると分離が良くなると云う報告<sup>1)</sup>があり、これに従って幾つかの試料を用いて測定を試みた結果、従来に比べはるかに分離の良いピークが得られHW法により計算が可能となった。しかし測定の回を重ねるうちに、一部の試料の価が同じものを微生物法で測定したのに比べ高目に出ることに気付き、Tryptophan以外のピークの重なりが疑われる様になった。そこで溶離条件を色々変えて検討してみた処、果して今までTryptophanのみと思っていたピークに他のピークの重なりのあることが明らかとなり、その量も試料によってはTryptophanの量以上に達するものがあることが解った。

本法によれば対称性の良いTryptophanのピークが従来の迅速法(9×150mmカラム)より少し速い35分程度で正確に定量することが出来、便利な方法と思うのでここに御報告する。

### 実験の部

#### 装置と定量法

分析計：日立アミノ酸自動分析計 KLA-3A型

カラム：9×150mm

樹脂：日立球状#3105

溶離緩衝液：0.35N Na-Citrate (pH 5.28)

緩衝液流速：60mL/h

上記溶離緩衝液にベンジルアルコールを1%添加し、カラム温度を60℃に上げて溶離を行う。

#### 試料の調製

Merck(Hammarsten)のカゼインをGreene<sup>2)</sup>らの方法によりBa(OH)<sub>2</sub>で加水分解したものを試料とした。

### 実験結果

緩衝液にベンジルアルコールを添加しない常法で溶離した場合、第1図(A)の如く50分から60分の処にLysineピークと分離不完全な状態でTryptophanピークが現われる。同じ溶媒でカラム温度を60℃にすると第1図(B)の如くTryptophanピークは少し速く45~50分に現われ、50℃の場合よりは分離が良いが尚重なりがある。次にベンジルアルコールを添加したものは、40℃では第2図(A)の如くピークは重なったままで対称性も悪い。50℃では第2図(B)の如くシャープな対称性の良いピークとなる。測定の当初は気付かなかったのがこのピークにはTryptophan以外のピークが含まれている。60℃に上げると第2図(C)の如く35分でTryptophanのシャープな対称性の良いピークが現われ、次で現われる他のピークと完全に分離する。カゼイン以外の試料の多くはベンジルアルコール添加溶媒により50℃の溶離で単一ピークを形成するが、60℃で溶離を行うと殆ど全てにTryptophan以外のピーク1つ或は2つの存在が認められた。

以上の結果から完全な定量を行うには緩衝液にベンジルアルコールを1%添加することと、カラム温度を60℃で溶離すると云う二つの条件を組合せる必要があり、何れか一つの条件だけでは分離は不完全で正確な定量値は得られないことが解った。尚6×100mmカラムではこの方法でも分離は不充分で、9×150mmカラムによる35分分析が現在の処最も迅速な方法と考えられる。

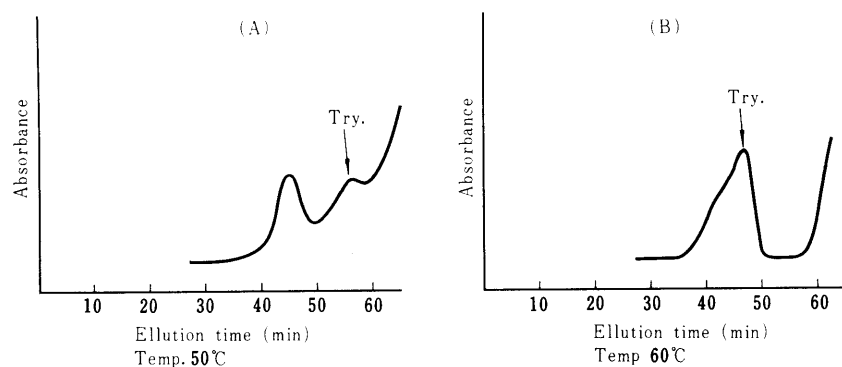
### 文献

1)柳田正・鈴木貞夫：第10回液体クロマトグラフ研究会講演(1966)

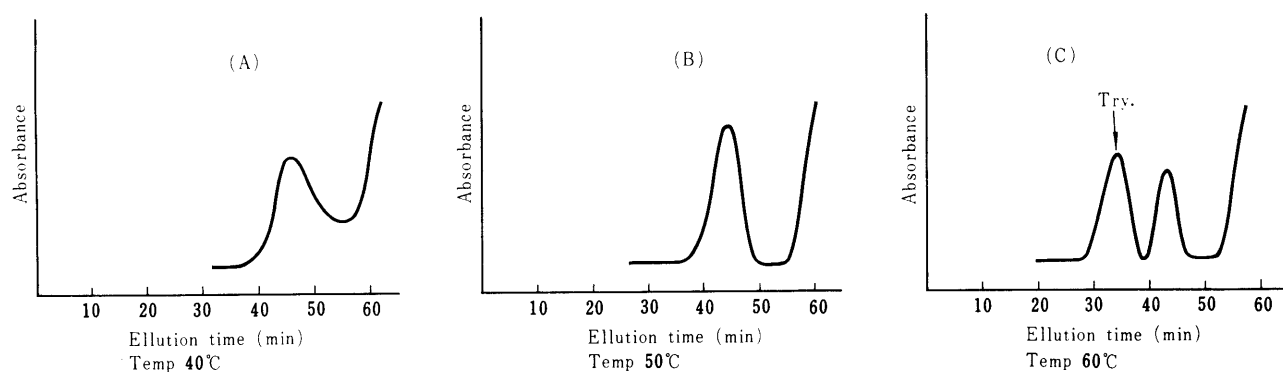
2)Greene, R.D. and Black, A. : J. Biol. Chem., 155 1 (1944)

(註) 最近では110分に短縮されている(Ⓔ 応開)

本報告は 食品工業学会誌に投稿



第1図 150mm column pH5.28 0.35N Na-citrate



第2図 150mm column pH5.28 0.35N Na-citrate + Benzylalcohol (1%)

## ■ 203形 日立分光蛍光光度計の測定例

嶺 岸 久 子\*

203は主に定量を目的とした簡易型の蛍光光度計である。励起側、蛍光側とも回折格子式分光器を組みこんであるため、蛍光強度を測ることによる微量定量はもちろん、蛍光スペクトルも測定できる。したがって、臨床検査などの日常の分析の他に、研究室用としても広範囲に使用できる。

臨床関係で、いくつかの試料に関しては、主にフィルター式蛍光光度計による測定方法が定説化されているが、他の多くの物質に関しては未知の事が多い。したがって新しい試料に関して臨床検査以前の段階で、処理方の発見、励起波長の選択、または蛍光スペクトルの確認などの研究的な仕事が必要です行われるようになってくる。そのためにはフィルター式蛍光光度計では不十分で、当然分光蛍光光度計が要求されるようになってくる。203はその要求を充分満たすものである。

### 1. 装置

図1に203形分光蛍光光度計の全体を示す。蛍光側、励起側とも回折格子を用いたハステイ・エバート型分光器が組み込まれている。スリット巾は $10\text{m}\mu$ 固定である。励起光源として中圧水銀灯( $150\text{W}$ )を用いたので、可視光はもちろん、紫外線( $254\text{m}\mu, 312\text{m}\mu$ )も強いエネルギーを有するから、ほとんどの試料の励起用として使用可能である。定量分析にはメーター直読か、またはレコーダーで蛍光強度を読みとるが、そのとき溶媒の蛍光(ブランク)を0にもっていくため、0点は最大200目盛移動可能とした。なお蛍光スペクトルはプロット・バイ・プロットによって測定する。

### 2. 測定例

臨床関係でよく測定される試料の測定例を示す。ただし試料は生体試料でなく市販試薬を用いた。

#### (1) 硫酸キニーネ

蛍光光度計の感度比較に、または他の試料の蛍光強度の標準物質としてよく使われる。203によれば、 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ (1 p.p.b.)の濃度がフルスケールで検出可能である。

図2に蛍光スペクトル、図3に検量線を示す。励起波長は $\text{Hg } 365\text{m}\mu$ 、蛍光ピーク波長は $460\text{m}\mu$ である。

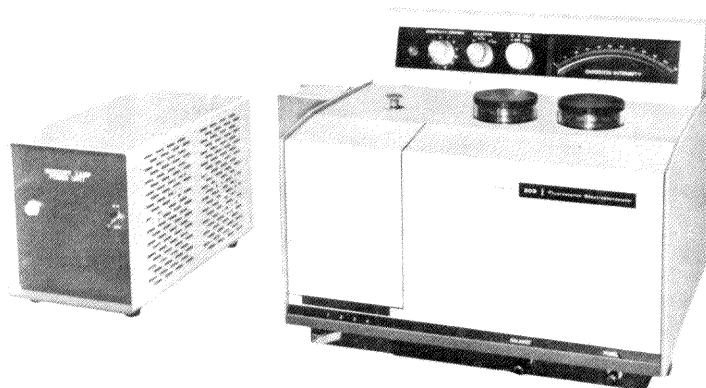
#### (2) セロトニン

市販試薬を3N塩酸で溶解して測定した。図4に蛍光スペクトル、図5に検量線を示す。励起波長は $\text{Hg } 312\text{m}\mu$ 、蛍光ピーク波長は $540\text{m}\mu$ である。検出限界は $0.01 \mu\text{g/ml}$ である。

なお、血液中に正常状態で $0.05 \sim 0.20 \mu\text{g/ml}$ 含まれている。

#### (3) ヒスタミン

そのまゝ、水に溶かしただけでは蛍光は非常に弱く、下記のごとき処理をして測定した。図6に蛍光スペクトル、図7に検量線を示す。励起波長は $\text{Hg } 365\text{m}\mu$ 、蛍光ピーク波



長は $435\text{m}\mu$ である。検出限界は $0.01 \mu\text{g/ml}$ である。なお正常状態では血液中に $0.04 \sim 0.07 \mu\text{g/ml}$ 含まれている。

処理方<sup>1)</sup>

- ① 市販の塩酸ヒスタミンを用いた。  
 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度の0.1N, HCl溶液を試験管に2 ml ずつ数本用意する。
- ② それぞれに $0.4\text{ml}$ の1N, NaOHを加えて攪拌する。
- ③ さらに $0.1\text{ml}$ のオルトフタルアルデヒド(0.1%メタノール溶液)を加えて攪拌する。
- ④ 4分後に $0.2\text{ml}$ の3N, HClを加えて十分に攪拌する。

発光の機構を図8に示す。

#### (4) カテコールアミン

水溶液そのまゝでは蛍光強度は弱く、検出限界は $0.1 \mu\text{g/ml}$ である。蛍光スペクトルを図9に示す。

正常な尿中には最高 $18 \mu\text{g}/100\text{ml}$ のカテコールアミンが含まれている。したがって臨床関係では普通下記のごとき処理をして、より感度よく測定している。処理をしたカテコールアミンの蛍光スペクトルを図10に示す。励起波長は $\text{Hg } 365\text{m}\mu$ 、蛍光ピーク波長は $510\text{m}\mu$ である。

処理方<sup>2)</sup>

- ① 試料3 ml(市販のノルアドレナリンの水溶液を用いた)に0.5Mのリン酸ナトリウムを約 $0.9\text{ml}$ 加えて、pHを6.5にする。
- ② 0.25%フェリシアン化カリ水溶液を $0.15\text{ml}$ 加え、混合したのち3分間放置する。
- ③  $1.0\text{ml}$ のアスコルビン酸-NaOH試薬(2%アスコルビン酸,  $1\text{ml} + 20\% \text{NaOH}, 9\text{ml}$ )を加えて測定する。

発光の機構を図11に示す。

### 文献

- 1) 代謝, vol 3, No11, 1966. P 69
- 2) SIDNEY UDENFRIEND "Fluorescence Assay in Biology and Medicine" p.139 (ACADEMIC PRESS, 1962)

図2. 硫酸キニーネの蛍光スペクトル

溶 媒: 0.1N  $H_2SO_4$   
濃 度:  $0.01 \mu g/ml$   
励起波長: H $\gamma$  365m $\mu$   
SENS: 7-8

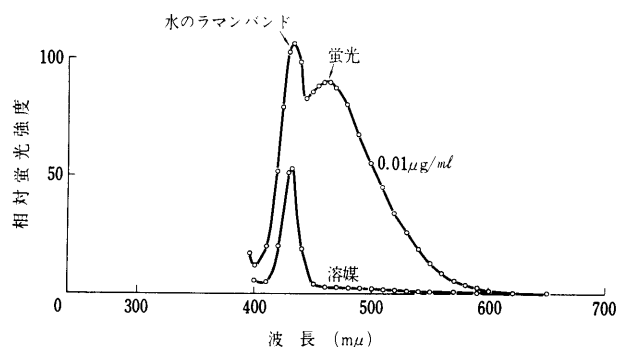


図5. セロトニンの検量線

溶 媒: 3 N HCl  
濃 度:  $0 \sim 1 \mu g/ml$   $0 \sim 10 \mu g/ml$   
励起波長: H $\gamma$  312m $\mu$   
蛍光波長: 540m $\mu$

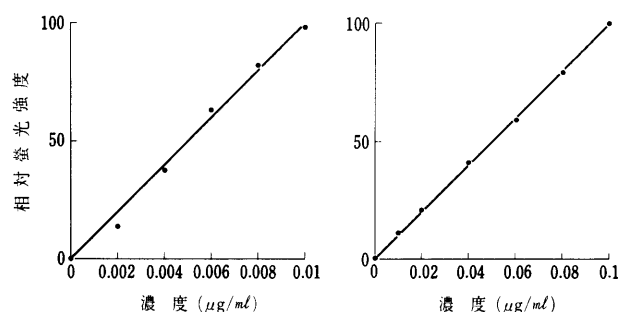


図3. 硫酸キニーネの検量線

溶 媒: 0.1N  $H_2SO_4$   
濃 度:  $0 \sim 0.01 \mu g/ml$   
 $0 \sim 0.1 \mu g/ml$   
SENS: 7-5  
励起波長: H $\gamma$  365m $\mu$   
蛍光波長: 460m $\mu$

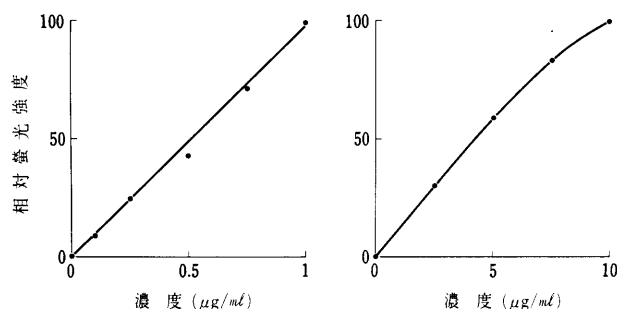


図6. ヒスタミンの蛍光スペクトル

化学的処理を加えた  
濃 度:  $1.0 \mu g/ml$   
励起波長: H $\gamma$  365m $\mu$   
SENS: 3

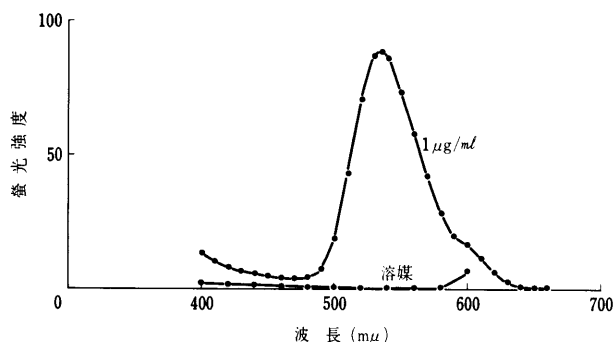


図4. セロトニンの蛍光スペクトル

溶 媒: 3 N HCl  
濃 度:  $1 \mu g/ml$   
励起波長: H $\gamma$  312m $\mu$   
SENS: 6-10

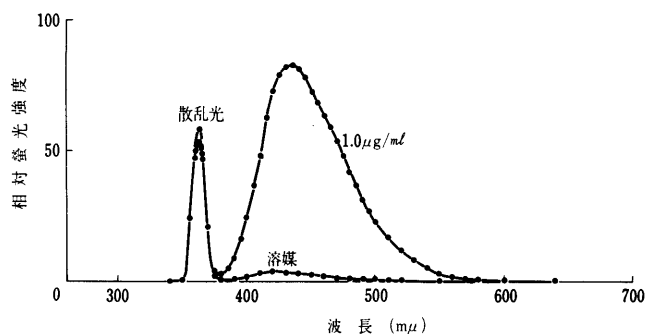


図7. ヒスタミンの検量線

化学的処理を加えた  
濃 度:  $0 \sim 1.0 \mu g/ml$   
 $0 \sim 0.1 \mu g/ml$   
励起波長: H $\gamma$  365m $\mu$   
蛍光波長: 435m $\mu$

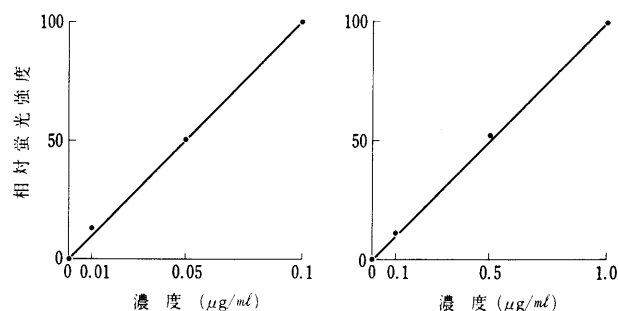


図 8. ヒスタミンの発光

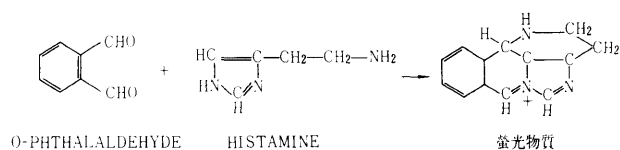


図 9. ノルアドレナリンの発光スペクトル  
(水溶液)

濃 度:  $1 \mu\text{g/ml}$   
溶 媒:  $\text{H}_2\text{O}$   
励起波長:  $\text{Hg } 254\text{m}\mu$   
SENS: 7

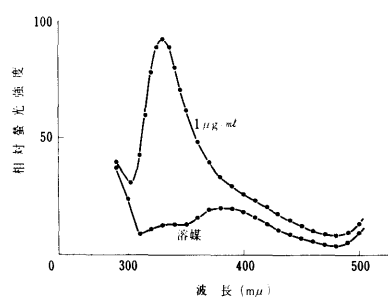


図10. ノルアドレナリン蛍光スペクトル  
(処理済み) 濃 度:  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$   
励起波長:  $\text{Hg } 365\text{m}\mu$   
SENS: 7  
pH: 6.5

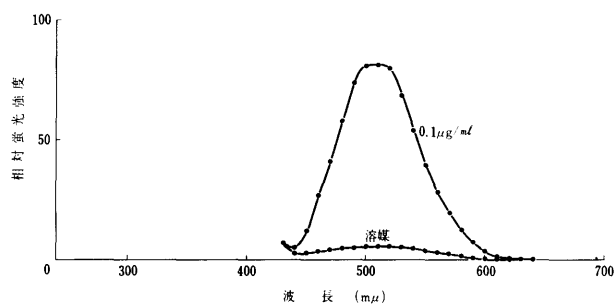


図11. ノルアドレナリンの発光

