

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

August
1967
Vol. 10
No. 4

■ポイント陰極を用いて得られた高解像度電子顕微鏡像

——HU-11B形 日立電子顕微鏡による1.02 Åの撮影—— 矢田慶治* 日比忠俊*

筆者等はHU-11B電子顕微鏡にポイント陰極を用いることによって、軸上照射でも2 Å程度の格子像を撮影できることを報告したが、¹⁾その後さらに狭い格子像も軸上照射で撮影できることが判った。こゝではポイント陰極の二三の性質を述べると共に、得られた結果を紹介したい。



電子顕微鏡はHU-11B形を用いた。(図1)

ポイント陰極はヘヤピン状のタングステンループに短いタングステン線をウエルトし、電解研磨したもので、ループから先端まで約0.2mm、先端の曲率半径は1μ前後である。これをウエネルト円筒の孔に充分中心合せを行なつて、ヘヤピン陰極の場合と同様に、数μAのビーム電流を流してビームを出すと、一般に最初は図2の(a)や(b)に見られるような2-3箇の非対称なスポットが現われる。こゝで、電子銃とコンデンサーレンズの水平調整を、ヘヤピン陰極の場合と同じように、交互に繰返し、(d)に示すように一つの中心ビームとそれを対称に取巻くドーナツ状のビームが出るように調整する。照射系がよく調整されるとビームの対称性がよくなる。しかし、ポイント陰極の先端がウエネルトの孔に対して充分中心合せが行われていないと、いくら前述の照射系の調整を行なつても、対称性のよいビームは得られず、ビームの輝度も損われる。従つて、ポイント陰極を最適条件で使うためには、ヘヤピン陰極以上にウエネルトの孔に対する中心合せと、照射系の調整に留意することが必要である。

ポイント陰極からのビームの模様はヘヤピン陰極の場合にくらべ、バイアス電圧によって非常に敏感に変わり、最適のバイアス電圧の範囲は極めて狭いので、筆者等はバイアス電圧の回路の一次側に適当な可変抵抗を入れて連続的な微細調整ができるようにした。***

ウエネルトの孔径もビームの形状及び輝度に相当影響を与えるが、一般に孔径の小さいものゝ方が輝度が高く、スポット径が小さい。^{2),3)} 図3は0.5mmの孔径のウエネルトを用い、(a)-(f)と次第にバイアス電圧を減らしてビーム電流を多くした場合、試料平面上にフォカスしたビームの形状を観察した1例である。(f)よりも更にバイアス電圧を減らすと、図2(d)のような一つの中心ビームとそれを取巻くドーナツ状ビームになる。これから判るように、ビーム内に対称性をもつ内部構造があり、これは在来のfield emission patternとの類似性から、結晶面の仕事函数の差によるものと解釈でき、(b)、(d)のように各結晶面に指数がつけられる。こゝで注目すべきことは、(b)と(d)では、ビームの内部構造が180°入れかわっていることゝ、ビームの輝度が(d)の状態で最高の値に達することである。実際に照射ビームとして使うには(d)か(e)の状態が適している。

一般に、陰極の加熱による電子銃各部の熱膨脹や僅かな變形、あるいはバイアス電圧のドリフト等のため起こるビームの移動や變形はヘヤピン陰極の場合に比べて著しく、一応の熱平衡に

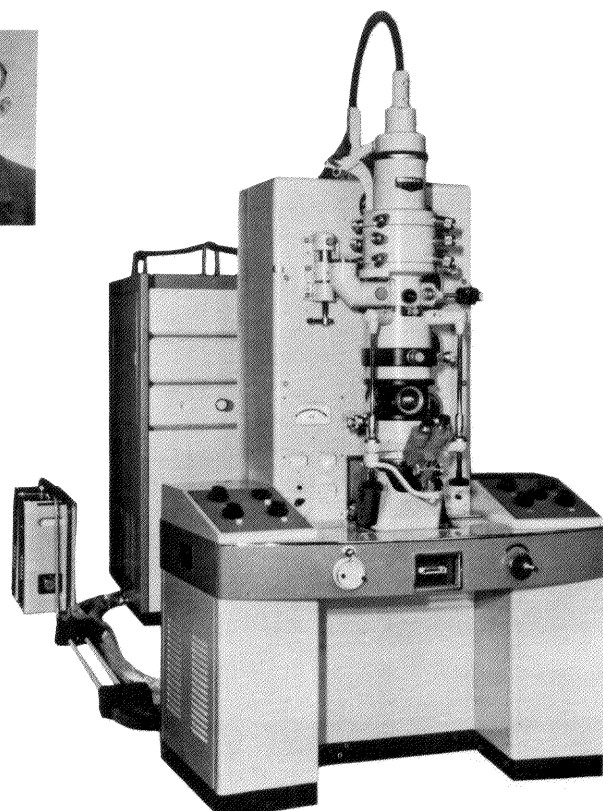


図1 HU-11B形 日立電子顕微鏡

達した後でも時々調整を必要とする。

以上述べたように、ポイント陰極はヘヤピン陰極に比較して、その操作が幾分難しいが最適状態に於ては、同一温度で比較した場合、数μA以下の非常に少ないビーム電流で数倍高い輝度と、半分以下の小さいスポットを得ることができる。スポットサイ

目次

■ポイント陰極を用いて得られた高解像度電子顕微鏡像	
——HU-11B形 日立電子顕微鏡による1.02 Åの撮影——	
矢田慶治 日比忠俊	1
■汎用形高性能電子顕微鏡 HU-125形の開発	
赤堀 宏、岩間 章、吉田仙治、出来文弘	3
■R-20形日立高分解能核磁気共鳴装置の測定例	
宮島剛	5
■124形日立ダブルビーム分光光度計による応用記録例	
小森律夫、皆川定雄	7
■F6D形日立昇温ガスクロマトグラフによるアミノ酸分析について	
杉山謙吉	9
■034形日立液体クロマトグラフと、2, 3の応用例	
蘆野重威、左藤猛英	11

* 東北大学科学計測研究所

*** HU-11B形以降の機種ではそのように改められている。

ズを 1μ 以下に小さくできることは、塩化ナトリウムなど、電子線に対して変化するイオン結晶のような試料を高倍率で観察する上に大きな利点がある。ただし、金属薄膜のような熱伝導の良い試料では、試料温度が上らないため却って汚れが著しくなるので、筆者等は標準の汚れ防止装置のほかに、さらに試料の近傍を冷却することで汚れを無視できる程度に減らして使用している。

次に、このような条件のもとで軸上照射で得られた格子像の二三の例を示す。図4はアルカリハライドの1例として塩化ナトリウムの格子像を示すもので(200)面の $2.82\text{\AA}$ の縞と、同時反射による三波干渉でできた $1.41\text{\AA}$ の縞が一部分見られる。

図5は薄い金の単結晶(約 $60\text{\AA}$ 厚)の(220)面の格子像で、 $1.44\text{\AA}$ の縞が明瞭に分解されている。図6は同じく金の単結晶の(200)と(200)の同時反射を起こしている部分を撮ったものである。(a)と(b)は乾板の密着焼きであるが(a)は約 0.6μ 不足焦点にして透過波と反射波が一致した状態(b)はそれから 1μ 過焦点側にずらした状態で、透過波と二つの反射波とによる三つの像が、中央の試料の孔や細い双晶帯について夫々分かれて

見えている、(c)は(a)の矢印の部分拡大したもので、 $1.02\text{\AA}$ の三波干渉による格子縞が見られる。⁴⁾撮影条件は図5、6とも100KVで直接倍率が42万倍、照射角は約 5×10^{-4} radian(コンデンサー絞り 150μ)、露出時間約6秒、ビーム電流約 $2\mu\text{A}$ である。尚、このような条件に於ては、パイロフライイトやマイカの $4.5\text{\AA}$ の格子縞を螢光板上でルーペを用いてははっきりと目で見ることが出来る。

以上述べたように、ポイント陰極を用いることにより、軸上照射で $1-2\text{\AA}$ の格子像が観察できる。軸上照射の場合には、孤立して不規則な方位で分布している試料でも、斜照射の場合のような技術的な困難を伴はないで格子像を観察できるだけでなく、高い分解能の電子顕微鏡像も観察できる。この意味から今後物性研究に広く応用できるものと思われる。

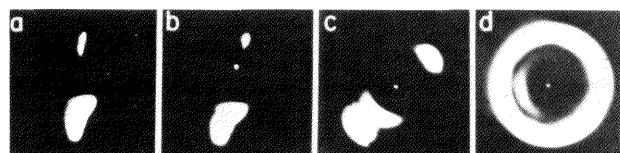


図 2

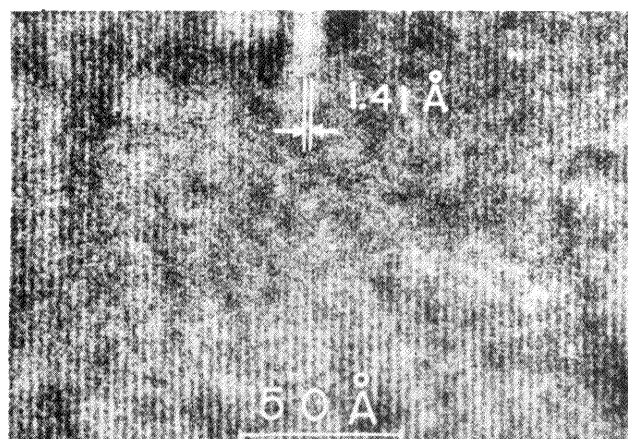


図 4

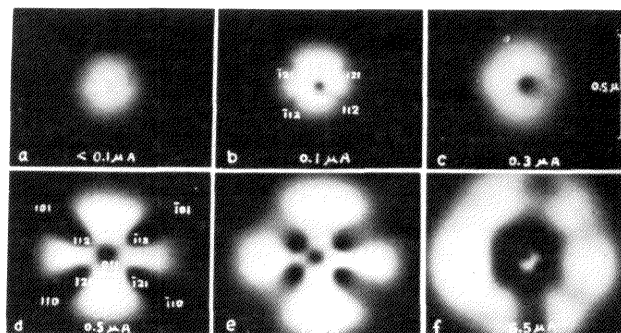


図 3

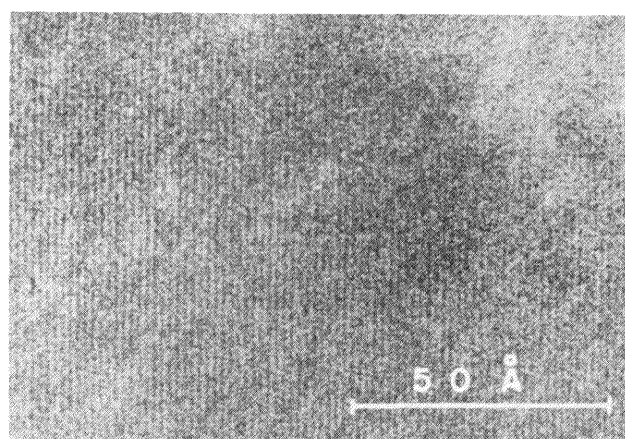


図 5

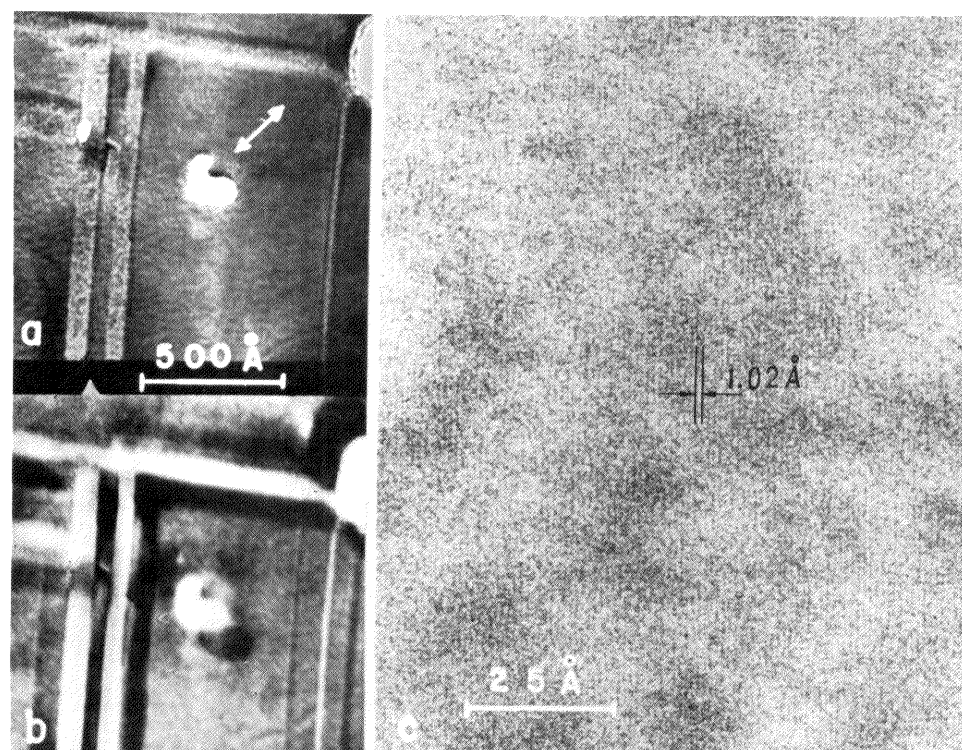


図 6

参考文献

- 1) K. Yada and T. Hibi, Proc. 6th Internat. Congr. E. M., Kyoto (1966) Vol 1, P. 25
- 2) S. Maruse, Proc. Eur. Reg. Conf. E. M., Delft (1960) Vol 1, P.73
- 3) K. Yada and H. Fernández-Morán, J. Appl. Phys. to be published.
- 4) K. Yada and T. Hibi, Japan. J. Appl. Phys. 6 (1967) 1007

汎用型高性能電子顕微鏡「HU-125形」の開発

赤堀 宏,* 岩間 章,* 吉田 仙治,* 出来 丈弘**

緒言

電子顕微鏡が普及し、その応用分野が拡大されるに従い装置そのものに対する要求も多岐にわたってきた。電子線の加速電圧もその一つである。従来、市場にある高性能電顕としては50 kVから100 kVのものが最も多く、試料作製技術もそれに適するように研究されてきた。しかし、試料の状態のみでは解決されない問題があり、ときには更に低い加速電圧を、あるいはより高い加速電圧を要求されるわけである。低加速電圧の効果は吸収コントラストが増加することで、主として生物の超薄切片試料などコントラストのつきにくい試料に有利である。一方高加速電圧は電子線の物質を透過する能力が増大すること、電子線回析の精度が向上することなどにより金属薄膜の透過像観察や、結晶試料の解析に有利である。今回上記の特長を加味した高性能電顕としてHU-125(図1)を開発した。この装置は高性能電顕として定評のあるHU-11D形に低加速電圧として25 kVを、高加速電圧として125 kVを追加したものである。以下その変更点と特長について述べる。

HU-11Dとの相違点

HU-125形の特長はHU-11D形の高性能をそのまま125 kVまで延長させた点にある。従って電子レンズの諸条件はすべてHU-11D形のままで、加速電圧が125 kVになったと考えてよい。鏡体部での相異点は電子銃および高圧ケーブルが125 kV耐圧に改良されている。絶縁ガイシは沿面放電を防止するように有効距離を30mm長くし、高圧ケーブル端末での電界分布を平均化するようにシールドキャップを施してある。フィラメントはプリセントリードフィラメントを採用したので、フィラメントとウエネルト円筒との関係位置は一度正確に調整しておけば、次のフィラメント交換からは調整する必要がなく、常に同一条件で使うことができる。図2は電子銃部を開いたところで、図3に電子銃カソード部の断面を示す。ウエネルトキャップには無調整のものほかに調整可能のものも用意しており、ポイントカソードなど特に厳密に調整する場合に使用する。

収束レンズ系はダブルコンデンサで、試料面上でのスポットサイズは $2\mu\phi$ を保証している。照射系軸調整はHU-11Dと同

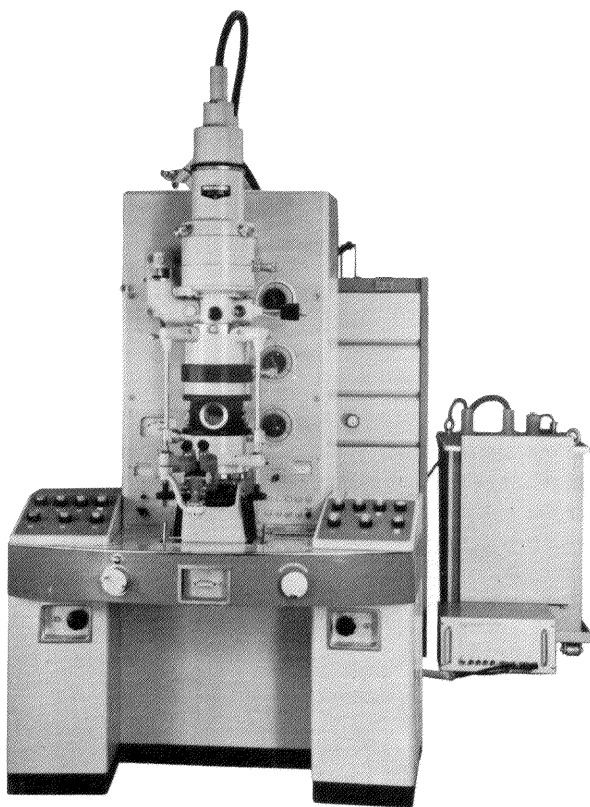


図1 HU-125形 日立電子顕微鏡

じく二段偏向の電磁方式で、試料への電子線の入射角は軸調整の場合 $\pm 1^\circ$ 、暗視野観察の場合は $\pm 2.7^\circ$ (125 kV)まで傾斜調節が行なえる。第2コンデンサのスチグマトールは電磁方式である。

試料室は付属装置取り付けを考えた万能形とし、結像系は対物、中間、投射の三段拡大で、中間レンズと投射レンズの間に高分解能回折試料室が設けてある。対物、投射両レンズは強励磁として軸外色収差補償を行ない、中間レンズで倍率変換を行なう。本機での倍率範囲は下表の如く特に高倍率側へ延長した。

加速電圧	倍 率 範 囲	
	高分解能	高コントラスト
25KV	700~100,000	—
50KV	700~500,000	400~300,000
75KV	700~340,000	400~200,000
100KV	700~250,000	400~150,000
125KV	700~200,000	400~120,000

加速電圧を高めることは電子回析の利用範囲の向上につながるが、本電顕は回析試料室が投射レンズの上にあり、投射レンズを動かせばカメラ長を固定の450mmから最大10m位まで延長することができるので、高分散回析や高分子結晶などの回析に適している。

電源部での相違点は高圧発生装置としてのトランス、および基準抵抗タンクが125 kV用として新に設計された。回路方式はHU-11Dと同じで50、または60サイクルの商用周波入力をトランスで昇圧後セレン整流器で2倍圧整流している。基準抵抗は1000 M Ω を、高圧トランスとは別のタンクに収め、水冷により温度制御している。何れもHU-11Dのものよりひと回り大形にしてタンク内でのノイズ発生を防止している。なお電子銃フィラメントは直流加熱であり、グリッドバイアス電圧は1000 Vまで連続可変の半固定方式であるからポイントカソードを理想状態で使用することができる。

本機の特長と性能仕様

高い加速電圧の利点としては試料に対する電子線の透過能が

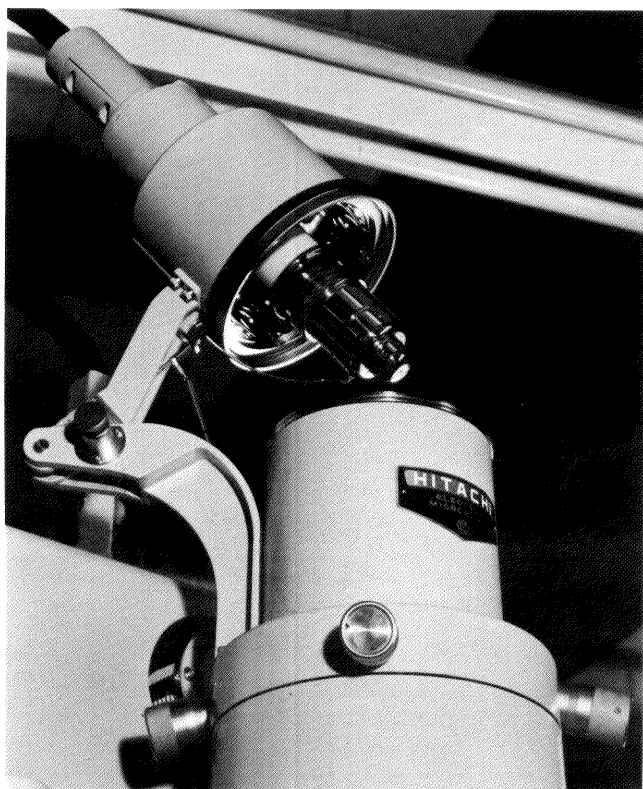


図2 電子銃部を開いたところ

*日立製作所 那珂工場 電子装置部

**日立製作所 亀戸工場 レントゲン設計課

増加するとともに、試料中での電子線のエネルギー損失の割合が減少するので色収差による像の乱れが軽減する。図4は写真用フィルムの乳剤部の超薄切片写真で、ゼラチンの中の臭化銀粒子の形は明らかに125kVの方が明瞭である。電子回折を行なう場合も電子線の波長が短い程制限視野回折の最小視野径が小さくなる。図5に加速電圧に対する電子線の波長と、100kVを1とした場合の電子線の透過能を示す。制限視野径は波長の3乗に比例するから100kVに対して125kVの最小制限視野径は1/1.5となり、暗視野像の解像度が向上する。

低加速電圧2.5kVの効果については改めて報告する。
 本HU-125形の性能仕様をまとめると下記の如くなる。
 加速電圧：25, 50, 75, 100, 125kVリモート切換式。
 加速電圧 安定度：25, 125kV $1 \times 10^{-5}/\text{min}$
 50, 75, 100kV $3 \times 10^{-6}/\text{min}$
 倍率範囲 400～500,000倍

分解能 4.5Å結晶格子像、又は5Å点間隔（高分解能条件）

6.9Å結晶格子像（付属装置用レンズ）
 対物レンズ励磁安定度 $1.5 \times 10^{-6}/\text{min}$
 最小焦点調節幅 120Å／ノッチ（高分解能条件）
 電子回折分解能指数 高分解能回折 1×10^{-6}
 制限視野回折 5×10^{-6}
 最小制限視野面積（試料上で） $0.5 \mu\text{m}^2$
 露出計、作動範囲（終像スクリーンで） $10^{-9} \text{ A/cm}^2 \sim 10^{-12} \text{ A/cm}^2$
 電磁式自動シャッター付
 観察室、三方窓、8倍双眼顕微鏡付、視野選択用、焦点調節用、軸合せ用の三段螢光板設置
 カメラ、プレートサイズ、82.5×119mm
 露出面積 80×50mm または 80×80mm
 装てん枚数 18枚
 エアロックシステム

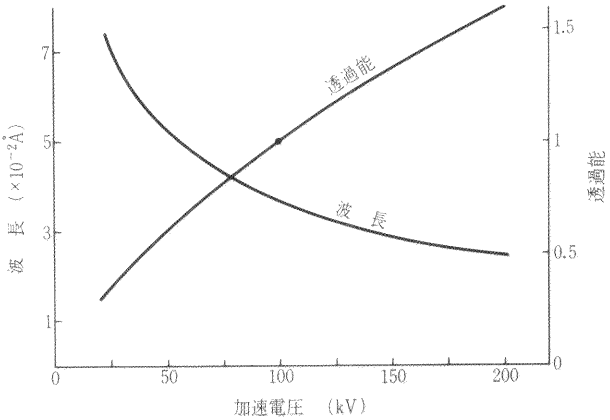


図5 加速電圧に対する電子線の波長と透過能の関係

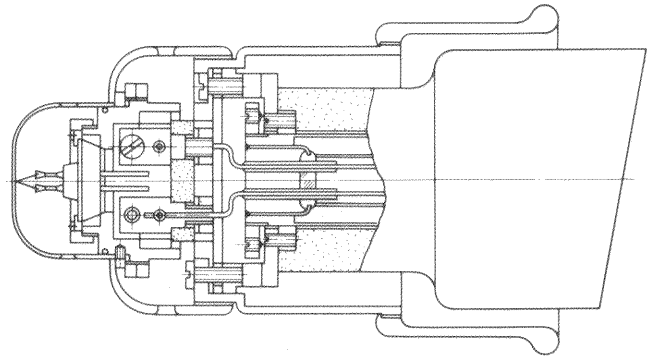
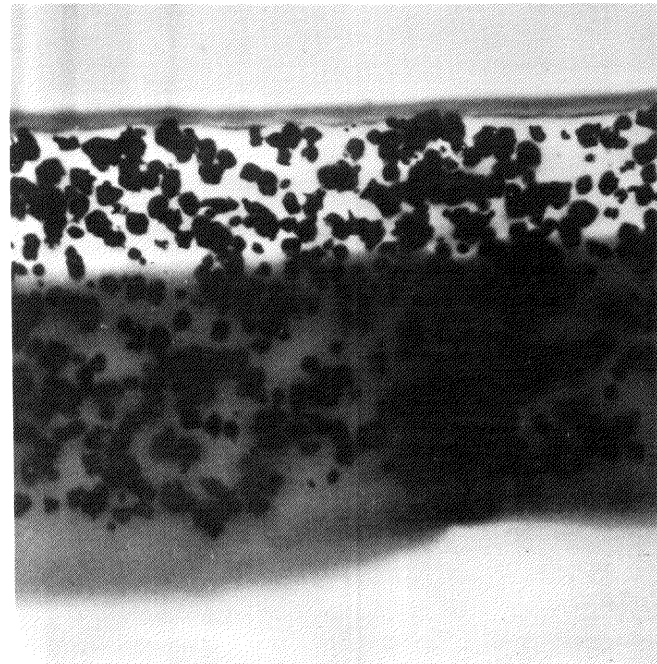
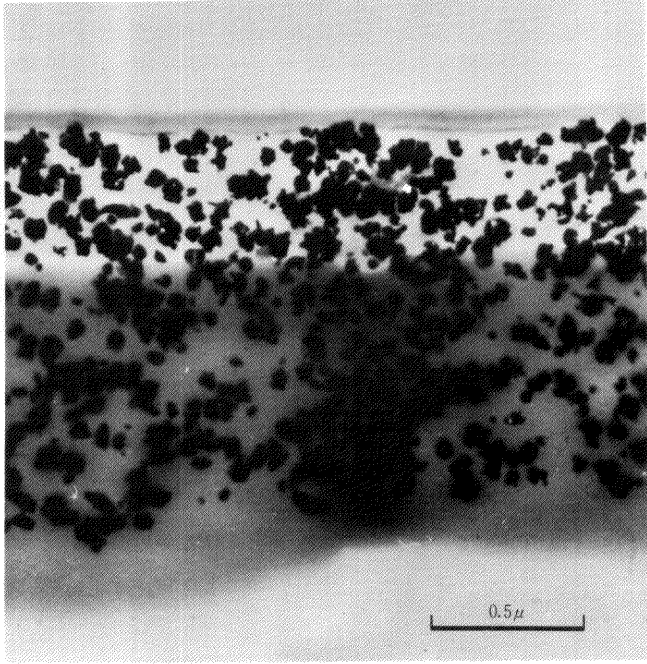


図3 電子銃カソード部の断面図



100kv



125kv

図4 写真用フィルムの乳剤部の超薄切片写真

■R-20形 日立高分解能核磁気共鳴装置の測定例—— 宮島 剛*

永久磁石を使用した高分解能核磁気共鳴装置の取扱の容易さ、安定性等については、既にH-60形において実証されている。ここでは、永久磁石を更に改良すると共に、“Two Sample Lock-on方式”を採用する事により、より高い再現性、安定性が得られたR-20形日立高分解能核磁気共鳴装置について述べる。

図1にR-20のブロック図を示す。高分解能核磁気共鳴装置の性能は、分解能、感度、積分精度、再現性、安定性等により判定される。以下順にR-20で測定したデータを見ながら詳述する。

分解能の表示試料としてアセトアルデヒド(CH_3CHO)が一般に使用されている。分解能は次式で定義される。

$$\text{分解能(R)} = \frac{\text{半値巾(4重線の最大ピークの半分の高さにおける巾(CPS))}}{\text{共鳴周波数(CPS)}}$$

この場合、4重線とはアルデヒド基($-\text{CHO}$)の信号を指している。又試料管の内径及び掃引条件が明記されなければならない。R-20では、006cps/s、外径5.0mmのガラス管が使用され、掃引条件は0.06cps/sec.である。図2はアセトアルデヒドのアルデヒド基の4重線の測定データである。半値巾0.3cps、共鳴周波数60Mcであるから、

$$R = \frac{0.3 \text{ cps}}{60 \times 10^6 \text{ cps}} = 5 \times 10^{-9}$$

R-20を用いて 5×10^{-9} の高分解能が得られている。永久磁石方式では、磁石本体に熱源がなく一電磁石は磁場発生する一種のヒータと考えてよい。保温が良ければ熱的に安定であり、このために分解能の安定性が良好で、ルーチン測定用に適している。感度の表示試料としてエチルベンゼン($\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_2\text{H}_5$) 1%(v/v)四塩化炭素(CCl_4)溶液が一般に使用されている。感度は次式で定義される。

$$\text{感度(S)} = \frac{\text{メチレン基}(-\text{CH}_2\text{)の4重線の最大ピーク値(s)}}{\text{実効雑音(Ne)}}$$

$$\text{Ne} = \frac{1}{2} \times \text{雑音の最大値} \times 0.8$$

この場合も、試料管内径、掃引条件、測定時定数を明記しなければならない。R-20では内径4.2mm管を使用し、掃引条件は2.4cps/sec.時定数は0.1~0.25secである。図3はエチルベンゼン1%(v/v)四塩化炭素溶液の10p.p.m.全スペクトラムである。左からフェニール基($-\text{C}_6\text{H}_5$)、メチレン基($-\text{CH}_2$)、メチル基($-\text{CH}_3$)、TMS($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$)の各信号が現われている。S=22.2

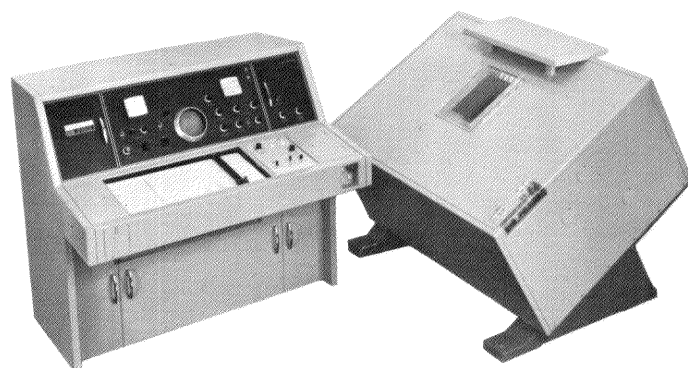


図1 R-20形 日立高分解能核磁気共鳴装置

目盛、 $\text{Ne} = \frac{1}{2} \times 25 \times 0.8 = 1.0$, $S = 22.2 / 1.0 = 22.2$

60Mcの装置では、一般に感度は15程度であるが、R-20で測定したこのデータでは20を越す高感度を示している。高感度を得るには、高分解能が安定しており、ベースラインが安定である事、又電気回路系(特に高周波増幅器)が低雑音でなければならない。

再現性、安定性については、どのような試料で又どのような方法で表示するか、高分解能核磁気共鳴装置では難かしいが、ここではエチルベンゼン5%(v/v)四塩化炭素溶液の積分5回繰返し測定及び、アセトアルデヒドのアルデヒド基4重線の5回繰返しの2つの例が示されている。図4では、図3と同様10p.p.m.の測定データですが、積分曲線が5回繰返し重ねて記録されているが、非常によく一致して重なっている。落差の比は、各信号に寄与する水素核の数の比であり、左から、5:2:3で C_6H_5 、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_3$ の水素の数の比を示している。積分曲線が重なる為には、やはりベースラインが安定しており、信号強度(即ち分解能)の安定性、信号位置の安定及び積分器そのものの安定性が良好である事が必要である。次に、図5では、アセトアルデヒドのアルデヒド基4重線が5回繰返し重ねて記録されている。掃引条件は0.24cps/secで記録紙の1目盛は0.6cpsである。データから判るごとく、5回のズレは、僅か0.1cps以下である。この例は安定性、再現性のチェックにしばしば用いられる。この様な優れた安定性、再現性は分解能及びLock-on系の安定性のすぐれている事を証明している。

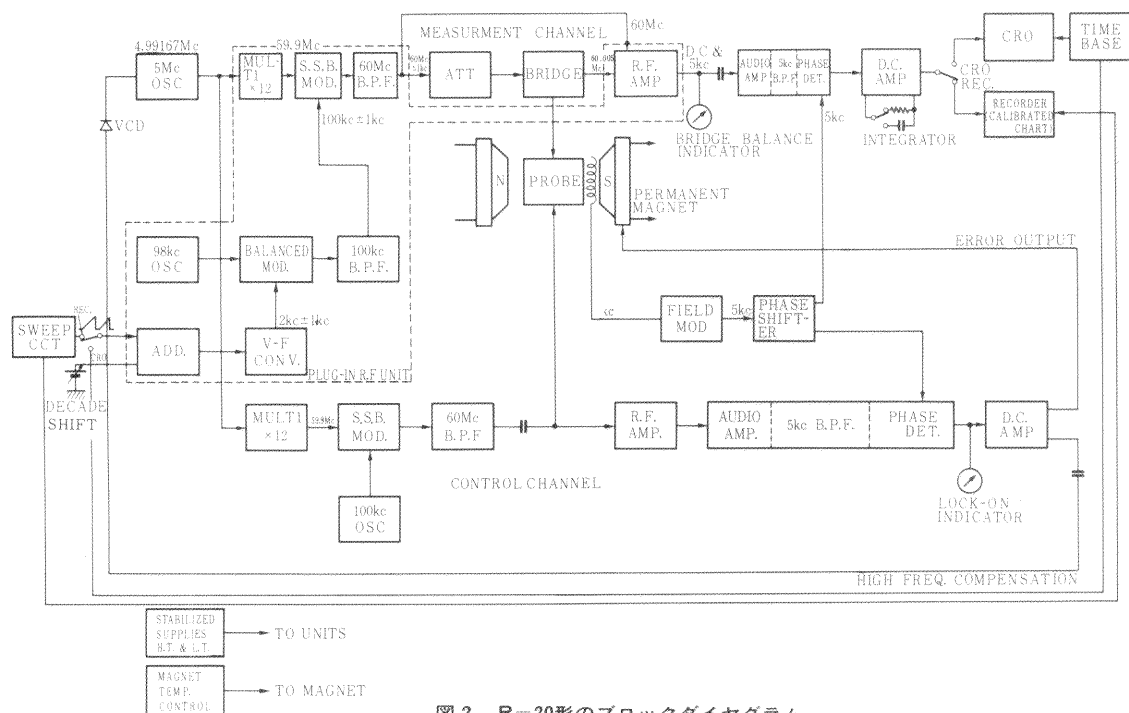
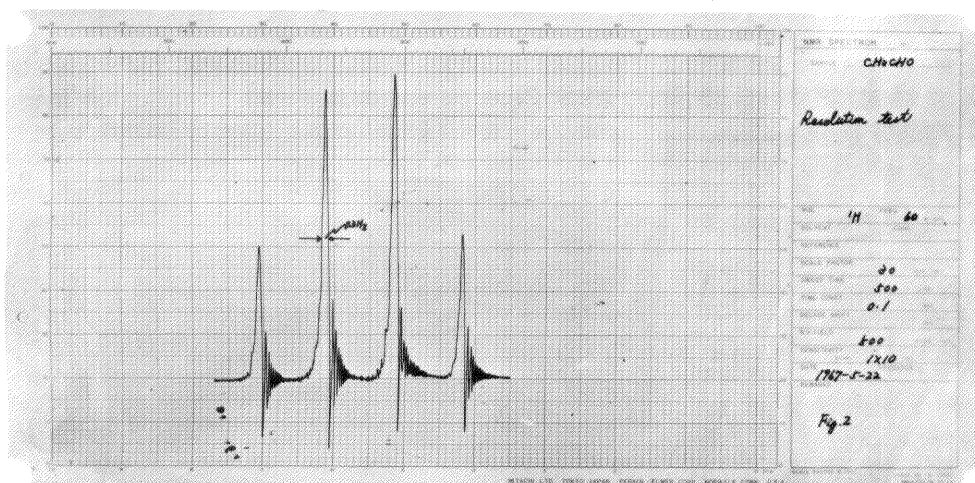
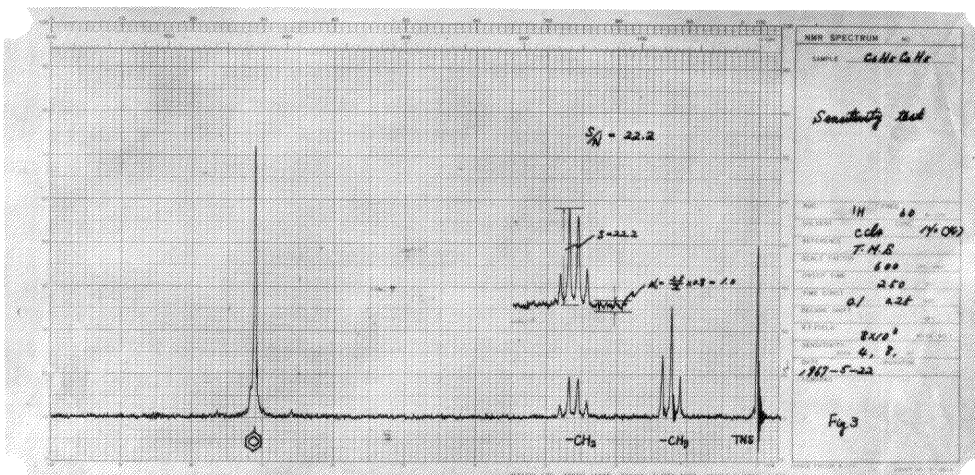


図2 R-20形のブロックダイアグラム

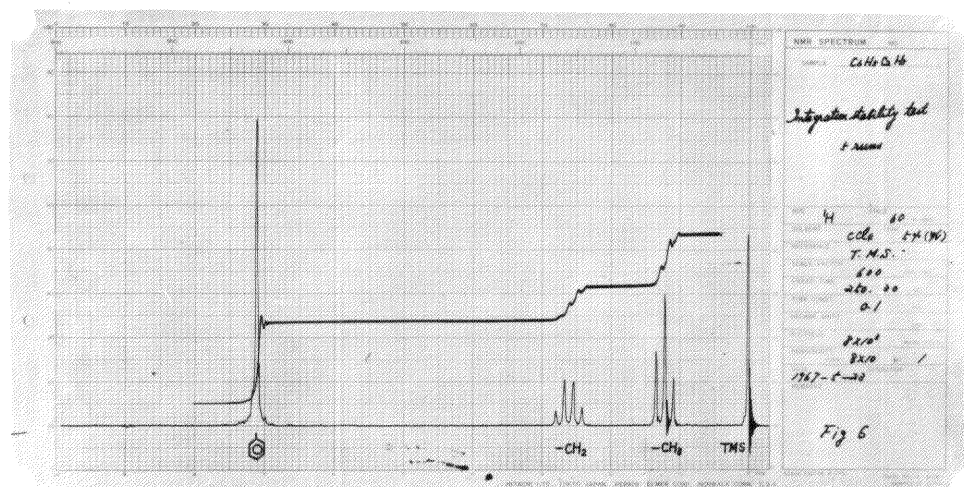
*日立製作所 那珂工場 電子装置部



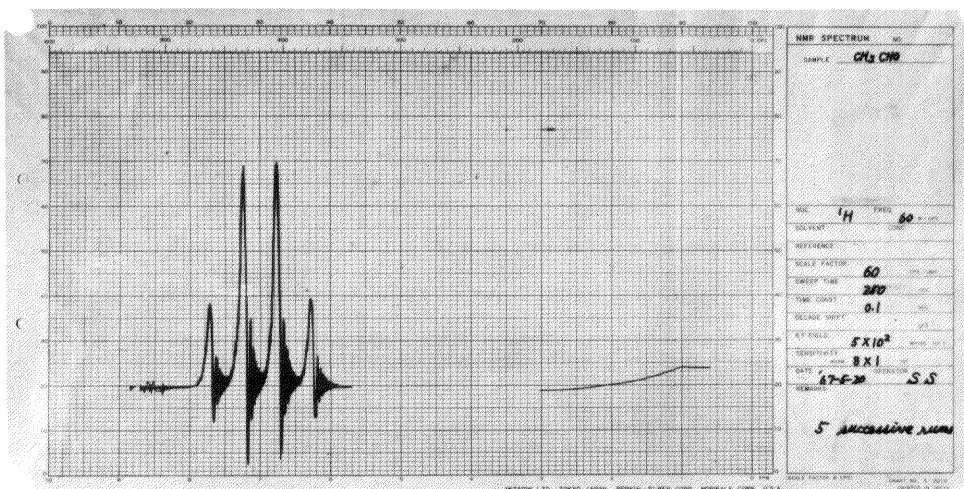
☒ 3



☒ 4



☒ 5



☒ 6

1. 緒言

吸光度分析は分析化学で主要な位置を示しており、これを除いては現代分析化学は成立しないと云っても過言ではないと思はれる。従来の手動形の光度計の普及は目ざましいものがある。一方自記分光光度計も普遍化の傾向にあるが、使用目的に照して過剰品質である場合もあり、これら2者の中間的な装置が期待されるに到った。これ即ち、時代の要求と思われる。使用者側からみての要望は、次の様な諸点に集約される。

1. 0%及び100%の調整の不要
2. 読み取りの容易、一般に透過率リニアであるため吸光度は、不等間隔目盛であり読み取りが煩しい。特に高濃度では読み取り精度が落ちる。
3. 吸収スペクトルの自動記録化
4. 取扱操作の簡易化及び試料室が大きいこと

等である。これらに対して日立製作所では20年にわたる分光光度計の製作経験にもとずいて、124形ダブルビーム分光光度計を開発したので、こゝに装置の概要及び測定データを紹介する。従来の装置が内在的に持っていた諸欠点を根本的に解決したものと考える。本器の具体的特長は、下記の通りである。

1. 分光器から出た単色光をチョッピングして、標準側、試料側に分け、ダブルビームとした。
2. 入力信号に対して、高性能のLog変換回路を使用している為、吸光度リニアでメータを指示出来る。
3. 本体内に波長送りモータを内蔵した為、波長を自動送り出来る。又記録計送りと波長送りが連動出来るので自動記録が可能である。
4. グレーテング(自社製)を使用し波長目盛は等間隔とした。
5. 試料室が広く(120×160mm)、4セル切換装置等の装着により特殊測定が出来る。

2. 装置

本装置では分散子にグレーテングを、検知器としては、広波長域光電子増倍管を使用している。光学系統図を図2に示した。グレーテングは精密な回転機構と相まって、大きな分散、高い波長精度、良い波長再現性を実現しており、スリット幅は測定中は一定で、グレーテングの分散が全波長に対して一定である事から一定単色幅での吸収スペクトルが測定される。このスリット幅は単色幅0.5, 1, 2mμになる様切替えが可能である。分光器からの光は回転半円鏡によって交互に2つの光路を通り光路中にセットされた試料、標準を通過する。即ち従来、高級な自記分光光度計のみに使用されていたダブルビーム方式を採用している。このため測定波長を変えらるごとに0, 100%(吸光度測定ではAbs.0) 合せをする必要がない。電気系統はホールド



図1 124形 日立ダブルビーム分光光度計

回路を採用し整流子も平滑回路も使用しないで脈動信号を直流化しているのが本器の大きな特長の一つである。高い安定性、速いレスポンス、安全な直線性を有する。又、初段増巾器で対数変換を行うため、出力信号はLogリニアになっており、メータ指示は吸光度リニアであり、市販の記録計(10mV)を用いても吸光度リニアの記録が可能である。装置前面のスケール切換えツマミでAbs 0-1, 0-2と簡単に切替えられ後者を用いた場合は高い吸光度も、良い再現性で測定出来る。又稀薄溶液でも記録計1mVフルスケールを使用すれば、Abs 0-0.1で拡大記録が可能である。

試料室は充分大きく、流通セルの使用、3波長切換装置との組合せで液体クロマト装置の検知部としての利用も出来、又、4セル切換装置による反応追跡等にも応用出来る。

3. 測定例

4, 5, 6図にNdガラスフィルタ及びHolmiumガラスフィルタの透過吸収スペクトルの測定記録を示した。吸光度リニア測定も、透過率リニア測定も、切替スイッチ1つで簡単に測定が出来る。

7, 8図に過マンガン酸カリウムによる検量線の測定結果を示した。よく直線性が保たれている。低濃度の測定では、記録計1mVレンジを使用すれば、フルスケールAbs0.1で記録が可能である。

図9にチトクロームCによる応用例を示した。図9は還元形、酸化物の吸収スペクトルの記録を、図10は、Abs0ラインをずらして、この差スペクトルを測定した。Abs0ラインを任意の位置に移動し差スペクトルを記録出来るのも大きな特徴であろう。

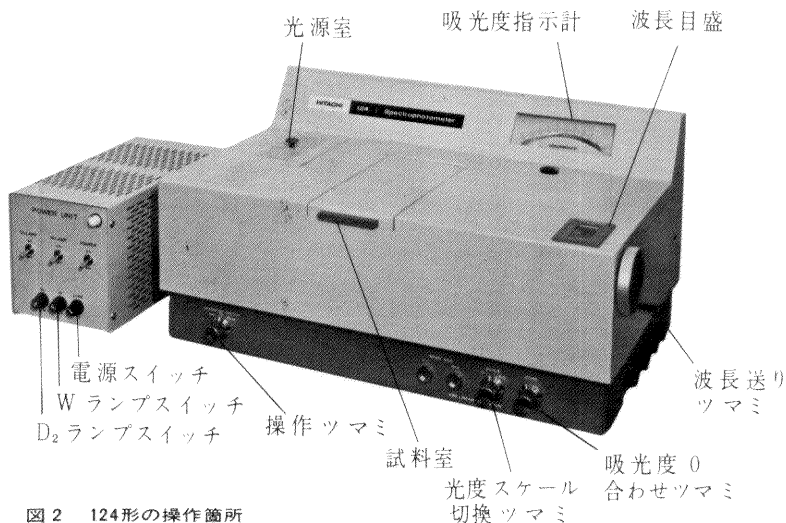
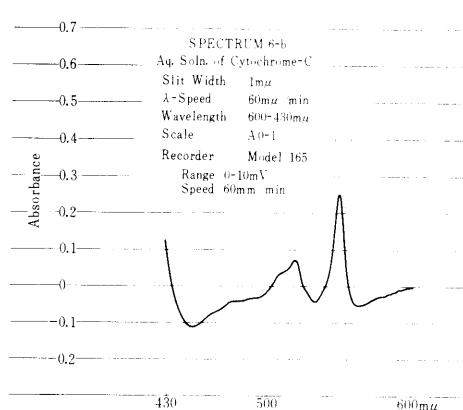
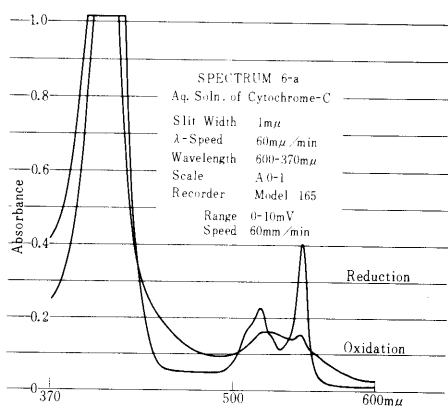
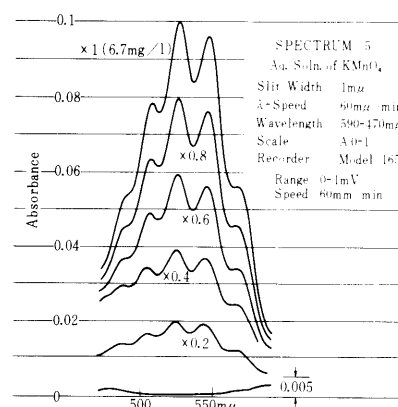
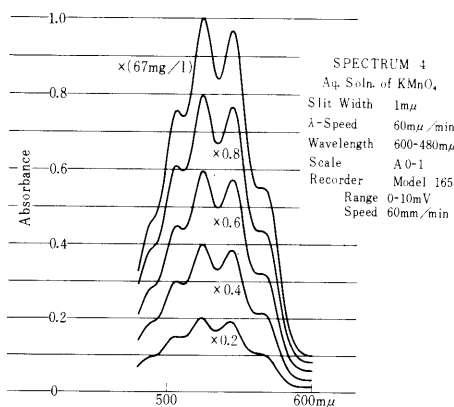
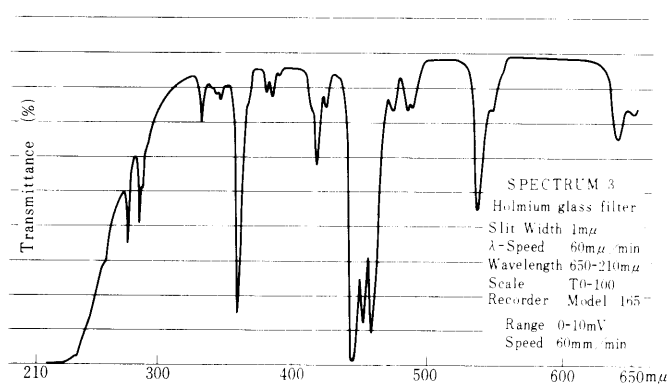
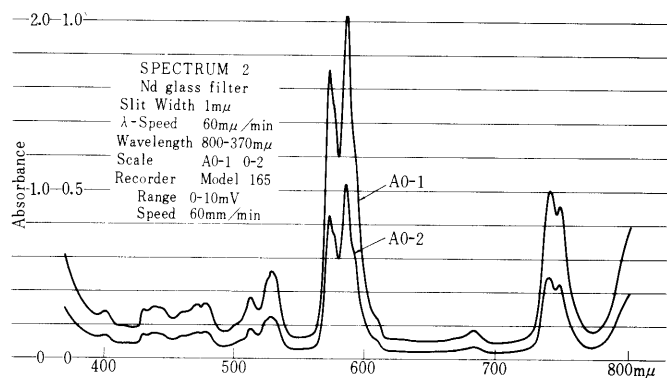
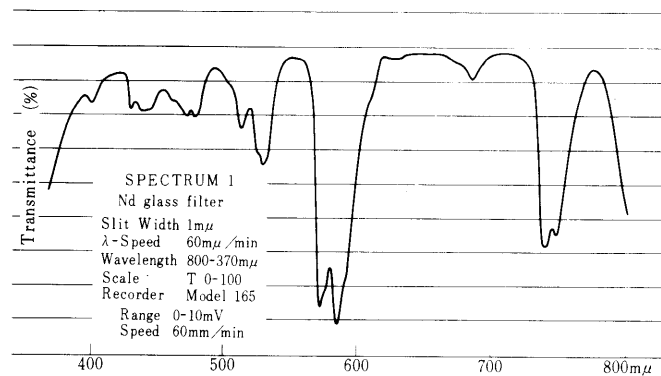
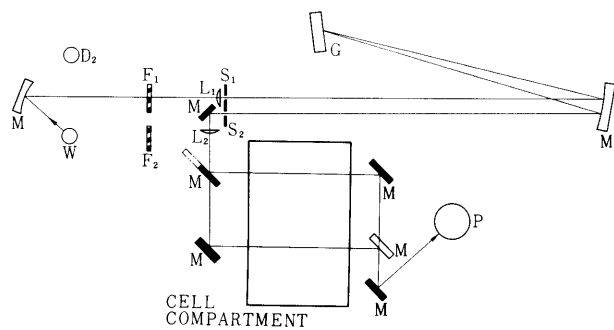


図2 124形の操作箇所

*日立製作所 那珂工場 理器技術部

**日立製作所 那珂工場 光学装置部



■F6-D形 日立昇温ガスクロマトグラフによるアミノ酸分析について

杉山謙吉*

緒言

アミノ酸分析については述べるまでもなく現在ではアミノ酸アナライザーの発達により迅速かつ精度よく分析を行いうところである。又古くはペーパークロマトグラフィー、近年の薄層クロマトグラフィーによっても分析可能となっている。しかし、前者においても、分析時間は4～5時間ばかり、まだ分析機器も高価でアミノ酸専用機である。後者においては、再現性、精度、テクニックの点で問題があり、今回、F6-D形日立ガスクロマトグラフを用いて、分析を試みたところ、高沸点エステルにもかかわらず、再現性及びベースラインドリフトもない良好なクロマトグラムが得られたのでここに報告する。



実験

1. 実験の概要

アミノ酸をガスクロマトグラフィーにより分析を行う場合、アミノ酸を易揮発性物質に分解するか、或いは適当な誘導体にして分析する。分解による方法^{1,2,3,4}は適当な酸化剤でアミノ酸を炭素数の1つ少ないアルデヒドに分解して行う。又誘導体については多くの化学者が検討を行い、メチルエステル⁵、又更にアミノ基をAcyl化して、N-T, F, Acetateにする方法^{6,7,8,9,10}ステロイド分析に用いられるトリメチルシリルエーテル誘導体にして行う方法もある¹¹。筆者も以上の方法をいろいろ検討したが、アミノ酸の誘導体生成の再現性、安定性等から、N-T, F, A, -n-Butylesters^{12,13,14,15}が一番良好で



1



あったのでこのものについて種々検討を加えた。

2. N-Trifluoroacetic-n-Butylestersの合成方法

2-1 試薬

- ① 5% HCl (無水) 含N-Butylalcohol
- ② Dichloromethane (無水芒硝を入れ一昼夜放置後使用)
- ③ N-Trifluoroacetic anhydride sol. (N-T, F, Acetic acidをこの液25gに2, 3滴加えアミノ酸のラセミ化を防ぐ。)
- ④ 冷却用エタノールトラップ, (ドライアイスで-10°～-20°に冷却したものを使用する。)

2-2 処理方法

50mg以下のアミノ酸混合物を100ml ナス形フラスコにとり、25ml 5% HCl Butylalcoholを加え、約1時間30分置流する。この時、冷却管の先きにCaCl₂のトラップをつけ無水状態を保つ。還流し終ったアミノ酸のButylesters sol.をマイクロ蒸留装置にうつし、減圧下60℃で蒸留する。又更に残留HClとアルコール及び反応で生成した水を除く為、5mlのジクロロメタンを加え再蒸留する。この操作を3回繰返す。その残渣に3～5mlのジクロロメタンを加え、あらかじめ冷却しておいたトラップ

表-1 (別条件1)

Gas Chromatography	Hitachi-Perkin-Elmer F6-D
Sample	Amino acids N-T, F, A-n-Butylesters
Volume	0.1μl
Column	Cromosorb w (acid wash, twice treated dichlorodimethylsilane) 1% Carbowax 20M 4m×2.5mm
	Refe Column 10% Carbowax 20M 1m×2.5mm
Inj. Temp.	350℃
Temp.	110℃～230℃, 10℃/min (after 5mins)
Carrier gas	N ₂ , 30ml/min, 1.0kg/cm ²
Chart Speed	10mm/min.
Seus,	Atte. Range 100, Attenuation 1

表-2 (条件2)

Column	Cromosorb w (acid wash, twice treated dichlorodimethylsilane)
Column	1% Carbowax 20M 2m×2.5mm
	2% Neopentylglycolsuccinate 1m×2.5mm
Carrier gas	N ₂ 30ml/min 0.8kg/cm ²

*森永製菓株式会社 食品研究所



に入れ充分冷却し、T, F, A, anhydrideをコマゴメで0.5ml～0.7mlを振とうしながら加え、先きに使用したCaCl₂トラップをつけ充分攪拌し、室温に2時間以上放置する。反応が終わったらそのまゝの状態、アスピレーターで残留T, F, A, anhydrideを除去する。更にジクロロメタン2～3ml加え、蒸留しこれを3回繰返して完全にアミノ酸のN-T, F, A, -n-Butylesters, Sol. (固体の時もある)にする。これをガスクロマトグラフィー試料とする。又実際の試料をHCl分解したアミノ酸混合物ではそれをガラスフィルターで濾過し、アスピレーターで吸引しながら水分を回収し、更にジクロロメタンを加え、蒸留乾固させ、5酸化リンデシケーター中に一昼夜放置し、前述の処理をする。

2-3 ガスクロマトグラフィー条件

アミノ酸のN-T, F, A-n-Butylesterについてのガスクロマトグラフィー条件の報告は沢山あり、筆者もSE-30, D, E, G, S., Carbowax 1540, Carbowax 20M, Neopentyl, G, S., golay HB2000, 等で検討した。又担体はいずれもCromosorb wをジメチルジクロロシラン処理を行い固定相液体は1～3%前後である。その結果条件1, 条件2のようになった。

3. 結果及び検討

まず1% Carbowax 20Mの条件で検討したR, T, 及びアミノ酸のN-T, F, A-n-Butylestersがガスクロマトグラフィーに対する感度が異なるのでそのmethionineに対する感度補正を表-3に示した。又それらのクロマトグラムを図1～図4に示す。条件2のクロマトグラムを図5に示した。実際のコーヒー豆を塩酸分解したクロマトグラムを図6に示す。この他実際のサンプルについては、ジュース中の遊離アミノ酸をイオン交換樹脂で回収し、前述の処理をし、良好なクロマトグラムが得られている。しかしまだシスチン、塩基性アミノ酸等については検討の予地がある。

この研究の発表をご許可いただいた森永製菓K, K. 食品研究所の大橋所長、増田課長に感謝いたします。

(S. I. News 編集部,)

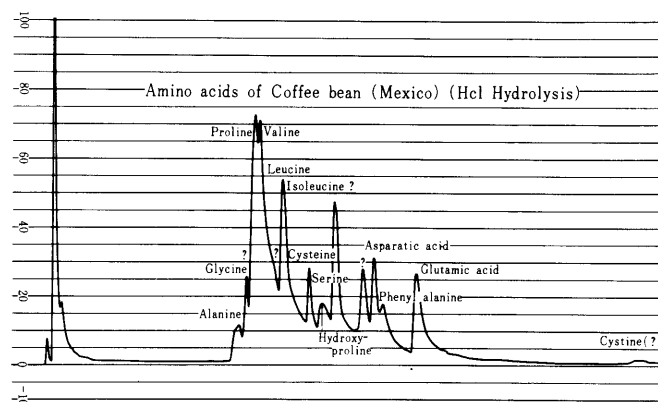
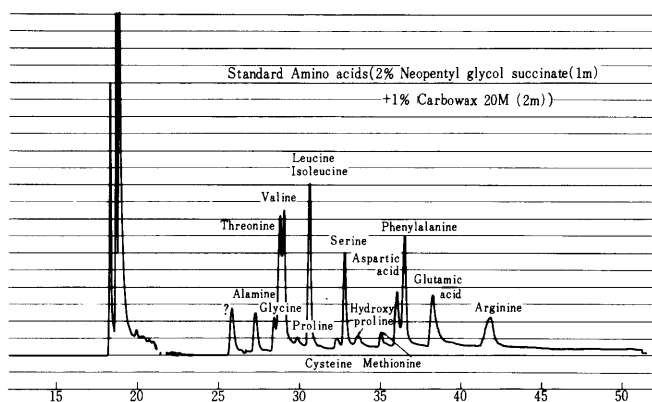
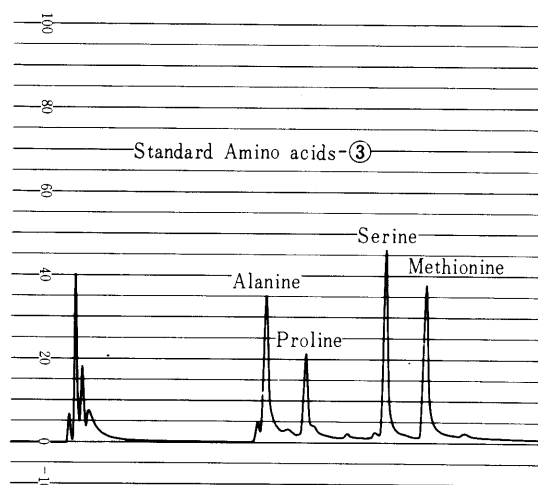
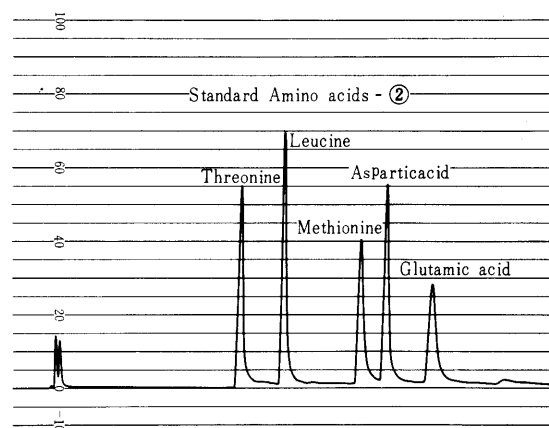
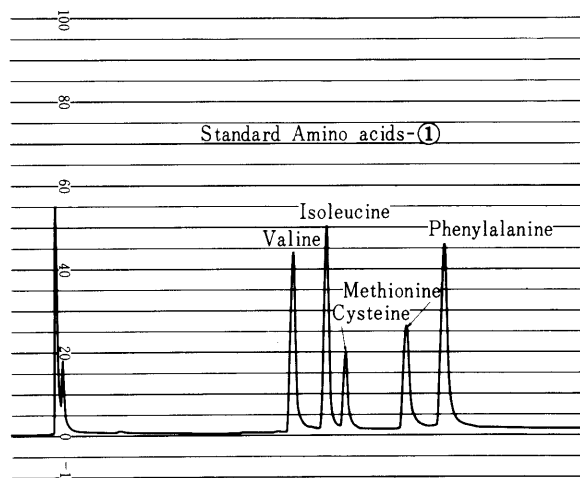
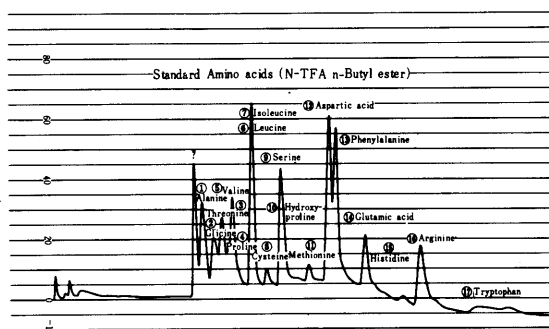
Standard Amino acids (N-TFA-n-Butyl esters)

Amino acids	Time Time	Retention time	Relative sencitivity
1 Alanine	12.2	0.61	0.97
2 Glycine	12.4	0.62	0.78
3 Threonine	13.5	0.67	1.11
4 Proline	14.2	0.71	0.45
5 Valine	14.6	0.73	1.33
6 Leucine	15.8	0.78	1.23
7 Cysteine	16.2	0.80	1.59
8 Isoleucine	17.1	0.85	0.48
9 Serine	17.8	0.90	0.90
10 Hydroxyproline	17.9	0.91	0.74
11 Methionine	20.1	1.00	1.00
12 Aspartic acid	21.5	1.05	1.32
13 Phenylalanine	22.3	1.09	1.93
14 Glutamic acid	24.0	1.18	0.99
15 Histidine	—	—	—
16 Arginine	—	—	—
17 Tryptophane	—	—	—
18 Cystine	45.5	2.30	—

Retention time
Relative sencitivity to Methio nine=1.00

参考文献

1. I. R. Hunter et. al. chem. Ind., 294 '54
2. M. R. Rier et. al. Ann. N. Y. acad. Sci., 72 541 '59
3. A. Zathis et. al. Anal. chem., 30 1156 '58
4. 村田, 竹西 工化., 64 787 '61
5. E. Bayer et. al. Angew. chem., 69 640 '57
6. F. Weygand et. al. Z. physiol. chem., Hoppe-Seyler's 322 38 '60
7. J. Waner et. al. Z. Anal. chem., 183 '61
8. 池川. J. Biol. chem., (japan), 54 279 '63
9. H. A. Saroff et. al. Anal. Biochem., 1 344 '60
10. P. B. Hagen et. al. Cana. j. of Biochem., 43'65
11. Gleunn E. Pollock. J. Gas chromo., 4 '66
12. K. Rüblmann et. al. Angew. chem., 73 113 '61
13. 舟坂渡, 池川信夫 最新ガスクロマトグラフィー応用編 広川書店版
14. Charles W. Genhle Anal. chem., 15 (1) 97 '66
15. Biochemical Application of gas chromatography, Academic Press



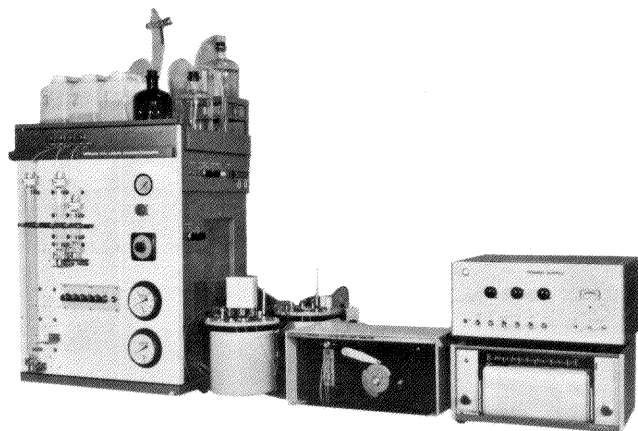
生体成分などのように構造や性質のよく似た多数の物質の混合物を分離分析する手段として液体クロマトグラフィーが、広く各方面で利用されている。これはイオン交換樹脂やゲルろ過剤の開発による分析法自体の応用が広がったことにもよるが、アミノ酸分析計をはじめとして、液体クロマトグラフも自動分析計としての形態を備えてきたことにもよると考えられる。

液体クロマトグラフィーで分離、溶出した液体を検出する方法としては、多くの方法があるが、生体成分には紫外部または可視部に吸収をもつ物質が多いので、これらは比色法によって測定するのが最も便利である。タンパク質はその構造中に含まれているチロシン、トリプトファン、フェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸に起因する260~290m μ の吸収を、また核酸は各ヌクレオチド単位に含まれているピリミジンやプリン塩基による220~300m μ の吸収をもっているの、液体クロマトグラフィーで分離した溶出液を直接紫外部の吸光を測定することによって検出することができる。またポリフィリンやカロチノイドのような天然色素や、染料、食用色素など人工色素のようにそれ自体が肉眼で見て着色しているものや、それ自体は無色で紫外部の吸収を示さないアミノ酸や有機酸は、指示薬や発色試薬を加えて発色させてから可視部の吸収を測定する方法がとられる。

装置の概要

本装置は、このような液体クロマトグラフィーと光電比色計とを組合せて、分析対象や方法に応じて多目的に使用できるユニット方式を採用したもので、クロマトグラフハウジング、多波長流動光度計、記録計からなっている。クロマトグラフハウジングは、混合物質を分離するカラム、溶出液の送液や発色試薬などを混合させるのに必要な各機能を備えている。装置の前面には長さ10~50cmの各種カラムが4本まで装着でき、カラム上方に溶離液、再生液、窒素ガスなどをカラムに供給するサブライコックが、下方には溶出液の流路切換、発色試薬の混合などの操作を行なうセレクトーコックを備えている。またカラムの右側にはポンプおよび窒素ガスの圧力計と調圧弁、タイマーが配列されている。ケース内部には、2台の送液ポンプ、自動流路切換弁、流量を安定に保つためのバックプレッシャー装置などが配置されている。ポンプは日立KLA-3 B形アミノ酸分析計で開発されたダブルピストン方式で、0~30kg/cm²の圧力範囲で、液の粘性やカラムの圧力に関係なく長時間の使用に対して常に安定した流量が得られる。

多波長流動光度計(註)は 紫外~可視域(200~700m μ)に亘って3つの波長が周期的に切りかわり、それぞれの波長の吸光度が、3色で打点記録される。これによって図に示した測定例からも分るように吸収特性の異なった物質も同時に測定記録さ



れ、各波長の吸光度を比較することによって、物質の同定も容易にできる。

これらのほか、カラムを一定温度に保つための循環恒温槽、発色試薬を加えてから加熱発色するための反応槽、クロマトグラフィーで分離、調製するための自動分取調製装置、フラクションコレクターなどが附属装置として備えられている。

分析例

図1は、核酸塩基の標準試料混合物をDowex 1 $\times$ 8 カラムで0.2M NH₄Cl + NH₄OH, pH10.0で溶出したものを、直接230, 260, 280m μ の各波長で測定したものである。

図2, 3は、アジ(鰯)の筋肉を0.4Nの過塩素酸抽出物を死後0日(図2)と死後15日(図3)の試料について、ヌクレオチド、ヌクレオチドを分析した例である。これらのチャートから、イノシン(IR)とイノシン酸(IMP)についてその量比から、魚の死後15日もたつと、イノシン酸が、死後0日のものに比較して約1/20に減少しており、魚の鮮度とイノシン酸の減少とが相関関係にあることが推定される。

図4は、チトクロームC、ビタミンB₁₂、リボフラビンの混合溶液をセファデックスカラムを用いたゲルろ過法で分離溶出したものを440, 570, 640m μ の各波長の吸収を測定した例で、吸収特性の異なる物質を同時に測定記録した例である。

図5は、標準アミノ酸混合物をイオン交換樹脂で分離し、ニンヒドリン試薬を加えて100℃の反応槽で発色し、440, 570, 640m μ の各波長で測定したもので、KLA-3 B形アミノ酸分析計と同じ条件で、4時間法で行ったものである。

こゝでは生体成分の分析例2, 3についての応用例を掲げるに止めたが、今後は多波長流動光度計の特色を利用して、各種金属イオンや核酸、タンパク質などのクロマトグラフィーなどにも広く利用されるものと期待される。

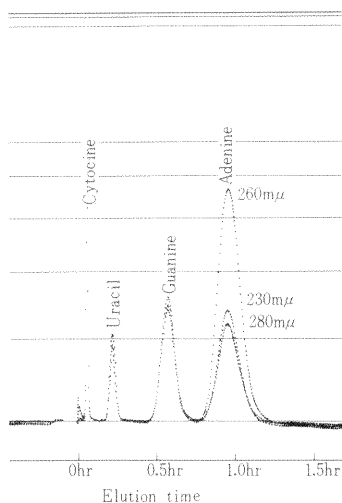


図1. 核酸塩基の分析例

Dowex 1 $\times$ 8 (-400mesh), 0.9 $\times$ 15cm
0.2M NH₄Cl + NH₄OH (pH10.0), 46℃, 120ml/hr

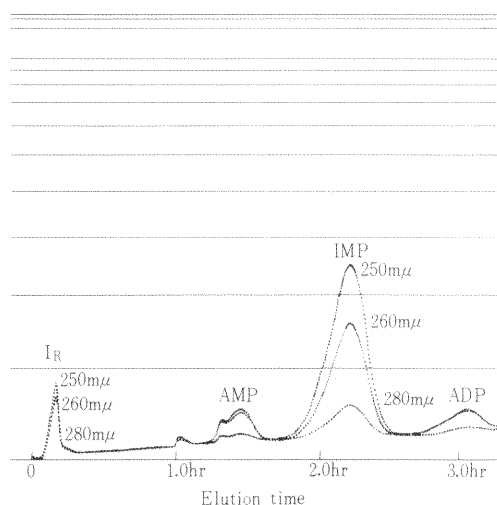


図2. アジ筋肉抽出液の分析例(死後0日のもの)

Dowex 1 $\times$ 4 (200~400mesh), 0.6 $\times$ 6.5cm
0.0005N-HCl 140ml(混合器), 0.15M NaCl + 0.01N-HCl 70ml(貯蔵器)グラディエント溶出法, 室温, 60ml/hr
(註) 本S.I., News, August, 1966 Vol. 9 No. 4 に詳しく述べられている。

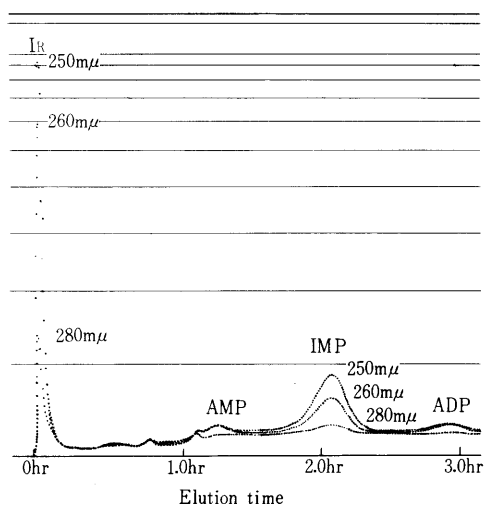


図3. アジ筋肉抽出液の分析例 (死後15日のもの)
測定条件は図2と同じ。

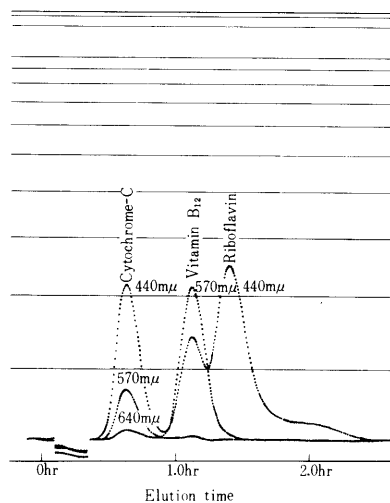


図4. Sephadexカラムによるゲルろ過クロマトグラフィー
Sephadex G-50, 0.9×20cm
0.01M Na₂CO₃ + 0.1M NaHCO₃, 室温, 15ml/hr

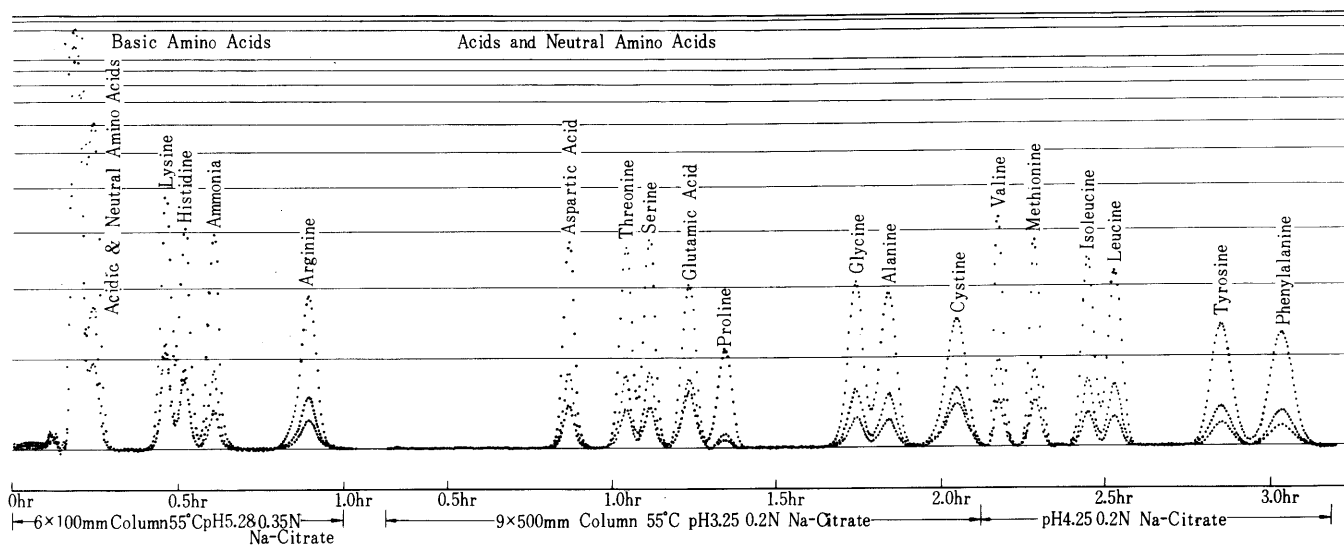


図5. アミノ酸分析例
イオン交換樹脂(日立#3105球形樹脂), 0.6×10cm(塩基性)
0.9×50cm(中酸性)
0.35N-NaCitrate pH5.28(塩基性)
0.2N-NaCitrate pH3.25~4.25(中酸性)
55℃, 60ml/hr