

THE HITACHI

Scientific Instrument

NEWS

August, 1964 Vol. 7 No. 4

 Hitachi, Ltd.

目 次

1. 日立ガスクロマトグラフによる油脂の脂肪酸組成の分析……………秋 谷 年 見…………… 1
2. 細胞顆粒の磁気化学的研究 (2) ……………坂 岸 良 克・岡 部 哲 夫…………… 4
〈電子スピン共鳴吸収の生物学への応用〉
3. 日立二重収斂形質量分析計について……………中 島 康 雄・津 山 齋・久 本 泰 秀…………… 9
4. ATR-1 形 日立赤外全反射測定装置……………福 田 健 二・石 川 信……………12

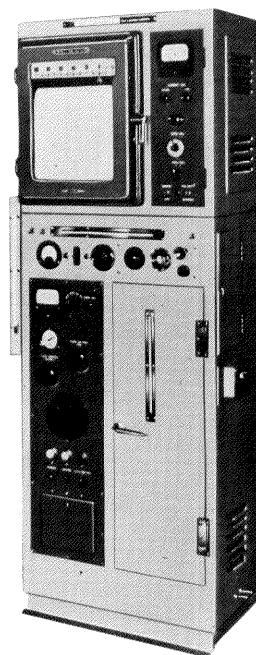
日立ガスクロマトグラフによる油脂の脂肪酸組成の分析

秋 谷 年 見*

1 ま え が き

食品の分野では、油脂は重要な要素である。グラム当りの発熱量が高い。必須脂肪酸の給源である。脂溶性ビタミン類の消化、吸収をよくする。食品の組織を改善する。風味をます。このように書きたてて、それぞれの項目に、ちょっとした解説をつけてゆくと、優に小さなパンフレットができてしまう。

けれども、今回は、その油脂の脂肪酸組成の分析に問題をしばって考えてみたい。ひとむかしまえには、油脂は、どんな種類の油脂でも、たとえば、大豆油であっても、羊のあぶらであっても、魚の油であっても、どれもおなじようにグラム当たり9カロリーの発熱量があり、したがって、栄養的な効果はおなじであると考えられていた。いまでも、たしかに、吸収されたものの発熱量については、むかしと変わっていない。しかし、吸収されやすい油とされにくいあぶら(脂)、必須脂肪酸を多量に含んでいる油脂とそうでない油脂、自動酸化をうけやすい油脂とそうでない油脂などがあって、油脂の栄養価値は、その構成脂肪酸の質と量に大きく影響されることがわかってきた。そこで、油脂の構成脂肪酸の種類と含量を決定するということが非常に大切になってきた。



KGL-2 形 日立ガスクロマトグラフ

* 農林省 食糧研究所

構成脂肪酸の分析ということは、従来は、たいへん手間のかかる熟練を要する仕事であった。それゆえ、わずか1～2例の分析例で、あたかもその仲間がそういう脂肪酸組成をもっているかのように記述している書物が多く、その上限がどのくらい、下限がどのあたり、標準偏差はどのくらいという点にまで触れている著書はない。これは、半面脂肪酸組成の分析がいかに大へんであったかを物語るものだといってもよい。

ガスクロマトグラフィーの出現は、この難問の解決に貢献をした。従来、1例の分析に数日を要していた脂肪酸組成の分析が、わずか2～30分で完了するようになったからである。われわれのところでは、2～3年まえから、日立の KGL-2 形を愛用して、脂肪酸組成の分析を行なっている。今回、日立の方から、分析上の注意や分析例を公開して欲しいという依頼があったので、簡単に要点を記してみた。

2 装 置

いまではもっと進歩した機種がでているが、われわれのところでは、昭和36年の秋に購入した日立の KGL-2 形を使用している。この機種には、熱電対型の検出器がついているが、機械自身の安定性は非常によく、試料を注入しない場合には、何時間でも真直なゼロラインを書いてくれる。

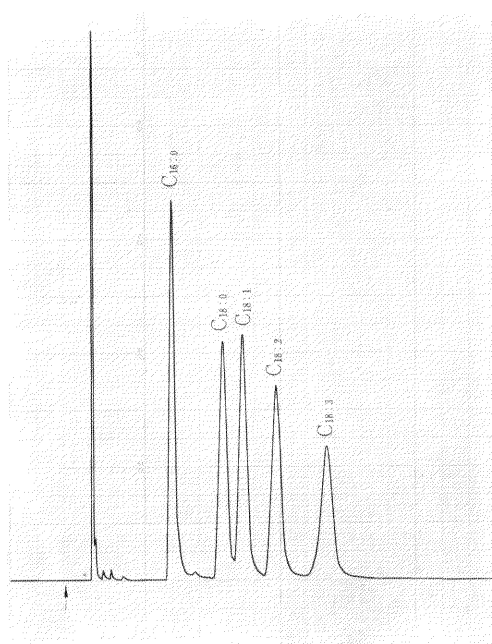
3 カ ラ ム

日立の KGL-2 形を用いて脂肪酸組成の分析がうまくゆくかどうかは、カラムの充填剤のえらび方、カラムのつめ方にかかっている。これさえうまくできていれば、脂肪酸分析は自動的にできるといってよい。

われわれが好んで用いる固定相液体はジェチレングリコールサクシネートで、担体にはセライトを用いることが多い。最近では、西尾工業所製などの市販品を用いている。このカラムだとステアリン酸メチルとオレイン酸メチルもよく分離するし、普通の植物油脂の脂肪酸分析にはもっとも適している。

アピエゾン L やシリコン HV を使用したこともある。しかし、前者はステアリン酸とオレイン酸の分離があまりよくないし、後者は炭素数の異なる脂肪酸メチルはよくわかれるが、炭素数がおなじで不飽和度が異なるものの分離がわるい。

カラムに充填剤をつめるときには、若干のこつがある。あまりかたからず、あまりやわらかからず、適正につめることが必要である。



第1図 標準試料（偶数脂肪酸）

4 試料の調整

油脂は、ガスクロマトグラフィーにかけるまえに、脂肪酸のメチルエステルにする必要がある。すなわち、試料油脂 1g に N-alc-KOH 25 ml を加え、水溶液中で60分加熱し、けん化する。できた石けん液に10倍量の水を加え、分液ロートに移し、エーテル抽出を3回くりかえして、不けん化物を除く。水溶液層に1:1 HCl を酸性になるまで加えると、石けんは遊離脂肪酸になる。この遊離脂肪酸をエーテルで捕集し、エーテル層を水洗後、芒硝を加えて脱水し、エーテルを減圧で除去すると、混合脂肪酸が得られる。

この混合脂肪酸をメチルエステルにかえる方法には、ジアゾメタン法や硫酸含有メタノールと加温する法など、いくつかの方法があるが、最近、生物化学の分野などでは、ジアゾメタン法を用いることが多くなってきている。ジアゾメタン法による場合、ジアゾメタンの量を理論量よりも10倍くらい多くすることが必要である。米国の油脂化学者協会の共同実験によると、参加した6研究機関のうち、4研究機関がメチルエステル化にジアゾメタンを用いる方法に不満の意を表明しているが、われわれの実験によると、理論量の10倍以上のジアゾメタンを使用すると、エステル化が定量的に行なわれることが明らかにされている。

硫酸含有メタノール、または塩酸ガス含有メタノールと加熱する方法の場合には、5倍くらい過剰のメタノールを用いるがよい。反応後は、エーテルを加え、水洗し、芒硝で脱水し、エーテルを除去して、ガスクロマトグラフィーにかける脂肪酸メチルエステルの試料が得られる。

5 運転条件

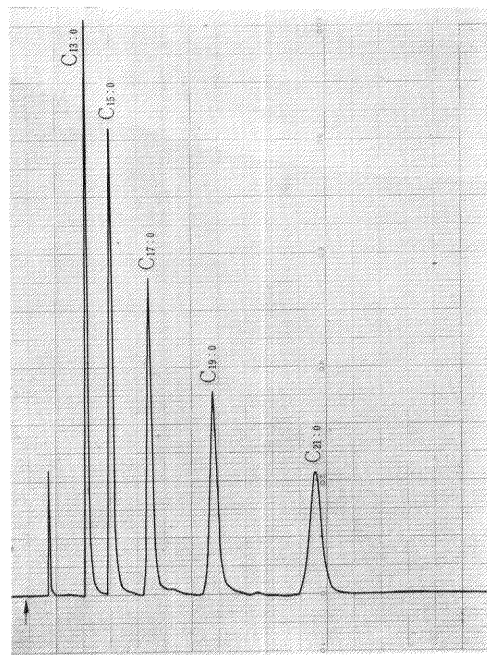
カラムの温度が 170°C では、ピークがシャープでない。少なくとも 190°C 以上であることが望ましく、われわれのところでは、普通 200°C を用いている。この場合、気化室の温度は、255～265°C にする。

ヘリウムの流量についても検討したが、毎分 30～50 ml では、結果に大差はない。したがって毎分 50 ml で運転することが多かった。

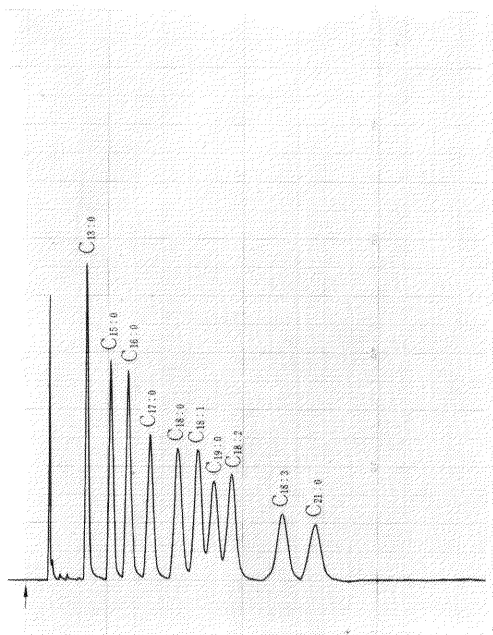
6 同 定

アメリカのホルメル研究所から、ガスクロマトグラフィー用の標準脂肪酸メチル混合物を取りよせ、その保持容量から決定した。

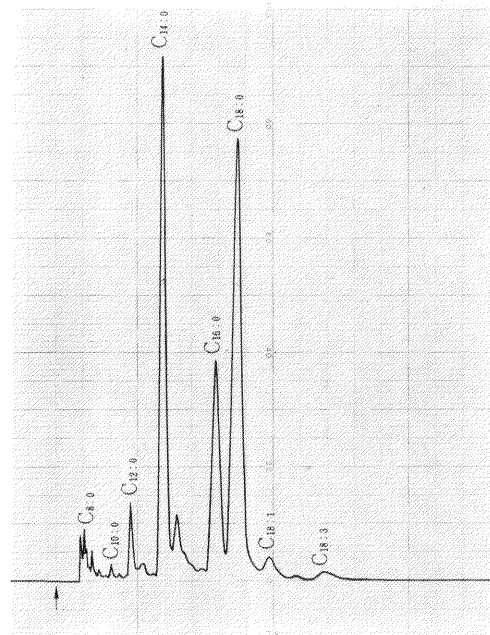
第1図に示すのが、C₁₆:0、C₁₈:0、C₁₈:1、C₂₀:0、C₂₂:0 の混合物の標準試料の分析例、第2図に示すのが、C₁₃:0、C₁₅:0、C₁₇:0、



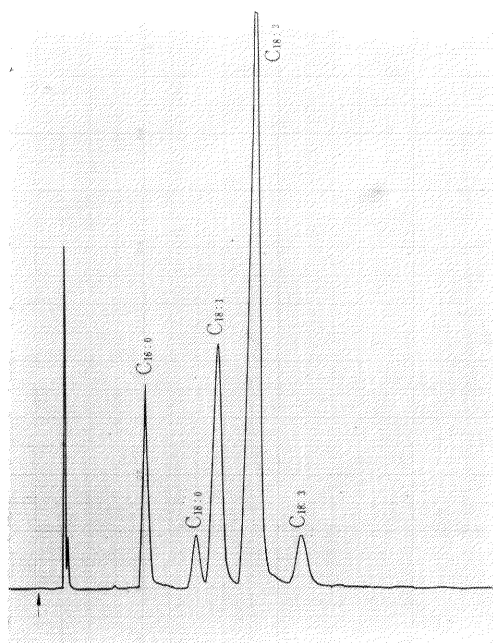
第2図 標準試料（奇数脂肪酸）



第3図 標準試料（偶数・奇数混合脂肪酸）



第4図 ラードの分析例



第5図 大豆油の分析例

$C_{19:0}$ 、 $C_{21:0}$ の混合物の標準試料の分析例、第3図に示すのが、両者を混合した場合の分析例である。

ラードおよび大豆油の分析例を第4図、第5図に掲げた。

7 む す び

標準試料について、数回実験をくりかえし、その再現性をみた。ピーク面積からその含量を定量したところ、最高値と最低値の差が4%以上になることはなく、この程度の誤差で再現性は良好であった。

何よりもありがたいことは、分離がよく、機械的な特性が安定していて、脂肪酸分析が簡便に行なわれることである。おかげで脂肪酸分析がぐっと盛んになり、新しい知見がつつぎに得られることと思う。

測定条件

第1図 試料 標準試料（偶数脂肪酸）1.0 μ l $C_{16:0}$ $C_{18:0}$ $C_{18:1}$ $C_{20:0}$ カラム DEGS 4mm ϕ 4m カラム温度 200°C 注入口温度 265°C キャリヤガス He 同流量率 50 ml/min 導入圧 1.0 kg/cm ² ブリッジ電流 200 mA チャートスピード 10 mm/min スパン 6 mV	キャリヤガス He 同流量率 50 ml/min 導入圧 1.0 kg/cm ² ブリッジ電流 200 mA チャートスピード 10 mm/min スパン 6 mV	試料 ラード mfa ester 1.0 μ l カラム DEGS 4mm ϕ 4m カラム温度 200°C 注入口温度 265°C キャリヤガス He 同流量率 50 ml/min 導入圧 1.0 kg/cm ² ブリッジ電流 200 mA チャートスピード 10 mm/min スパン 6 mV
第2図 試料 標準試料（奇数脂肪酸）1.0 μ l $C_{13:0}$ $C_{15:0}$ $C_{17:0}$ $C_{19:0}$ カラム DEGS 4mm ϕ 4m カラム温度 200°C 注入口温度 265°C	第3図 試料 標準試料（偶数・奇数混合脂肪酸）1.0 μ l カラム DEGS 4mm ϕ 4m カラム温度 200°C 注入口温度 265°C キャリヤガス He 同流量率 50 ml/min 導入圧 1.0 kg/cm ² ブリッジ電流 200 mA チャートスピード 10 mm/min スパン 6 mV	第5図 試料 大豆油 mfa ester 1.0 μ l カラム DEGS 4mm ϕ 4m カラム温度 200°C キャリヤガス He 同流量率 50 ml/min 導入圧 1.0 kg/cm ² ブリッジ電流 200 mA チャートスピード 10 mm/min スパン 6 mV
	第4図	

細胞顆粒の磁気化学的研究 (2)

〈電子スピン共鳴吸収の生物学への応用〉

坂岸良克*・岡部哲夫**



ESR 測定装置と測定条件

前回は述べたように電子スピン共鳴吸収を生物学へ応用するには、試料の処理に特殊な技術を要するが、処理した試料の測定は高感度の ESR 測定装置でさえあれば簡単である。本実験に使用した ESR 測定装置は日立 MES-4001 形電子スピン共鳴分析計である。

測定の条件は
信号周波数 9,400 Mc

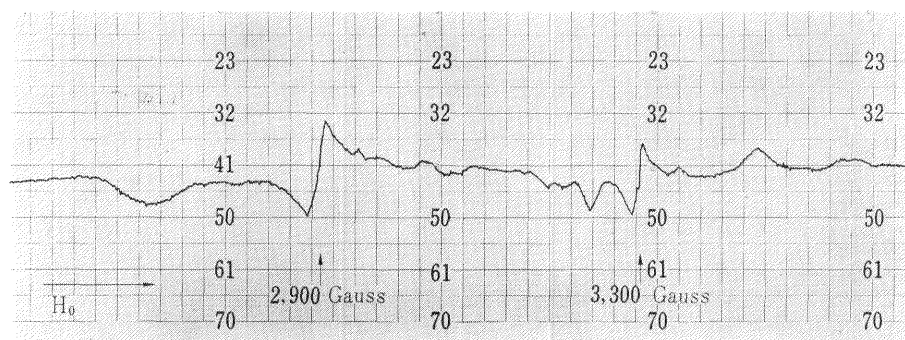
磁界変動 100 kc 6 Gauss
磁界掃引 1,200 Gauss/30 min
検波時定数 1 sec.
測定温度 -196°C (液体窒素温度)

なお、装置の総合検出感度は 1×10^{11} spins/JH 以上であって、試料はそう入形液体窒素用デューワーに入れている。

実験成績

1) 肝ホモジネート 新鮮な肝ホモジネート 0.1 ml を測定用石英管(直径 2 mm)に注入して、液体窒素の温度下で磁場を 2,400 から 3,600 Gauss まで掃引し、吸収スペクトルを記録した。その結果は第 6 図の如くでこの吸収曲線は肝ホモジネート特有のものであることが確かめられた。この曲線の中、吸収スペクトルはほぼ

2 群に分けられるようである。すなわち g 2.9 と 2.25 を中心とするスペクトルと g 2.1 と g 2.0 を中心とするスペクトルの 2 群である。これらはそれぞれ細胞顆粒分画法で分けたミクロゾームおよびミトコンドリアの吸収スペクトルに相当することが、以下の実験で明らかになった。



第 6 図 ウサギの肝臓ホモジネートの ESR スペクトル (-196°C)

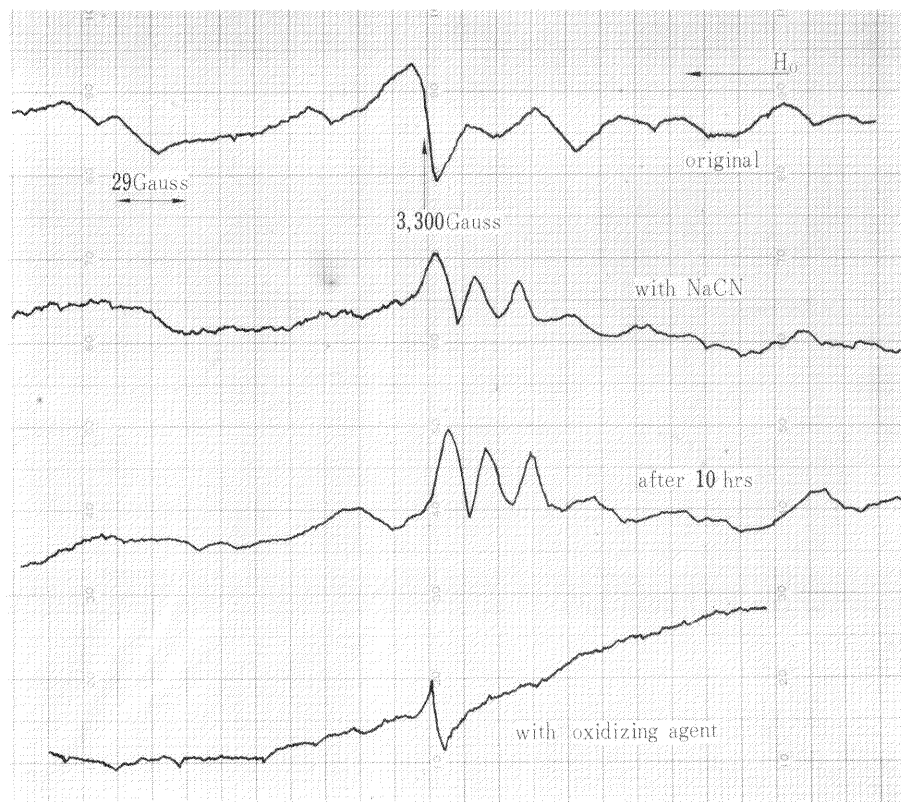
* 東京医科歯科大学医学部生化学
教室 医学博士

**日立製作所那珂工場

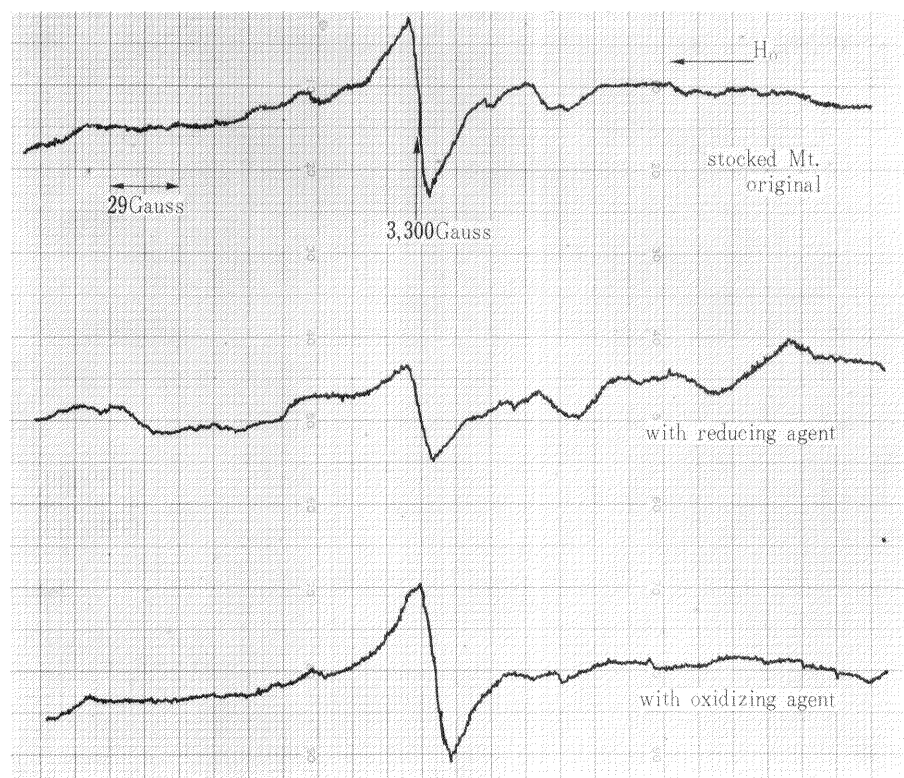
2) ミトコンドリア 表2に示した如く、肝ホモジネートを700 g 15分遠心した上澄から、12,000 g 20分遠沈で得られた沈渣をミトコンドリア画分とし、これを0.32M 蔗糖液に懸濁、2回遠沈を繰返して洗った画分を試料管に入れ、嫌気性下で ESR スペクトルを測定した。低温装置はホモジネートの場合と全く同様のものとした。

第7図の最上段はこの様にして得られた肝ミトコンドリア画分の吸収スペクトルである。このスペクトルは常に分画したミトコンドリアで認められ、3,300 ガウスを中心としてみると、これはミトコンドリア特有のスペクトルであることが確認された。3,300 ガウス付近のシグナルは、 g 値が2.0で、遊離基の値にきわめて近いものであったが、その外の ESR シグナルの g 値は低磁場側より順に2.4, 2.1, 2.0 (3,300 ガウス), 1.96, 1.9 および 1.8 であった。これらのスペクトルは先に示したホモジネートのものと比較すると、2群のスペクトルの中の高磁場側のものと全く一致し、ホモジネートのスペクトルの一つはミトコンドリアそのものによることが分った。

ミトコンドリアの ESR スペクトルは鉄イオンと密接な関係があることを Beinert らが報告しているが、本画分に NaCN を添加すると図の2段目のようなスペクトルの著明な変化を観ることができた。このスペクトルは長時間の後にもそのまま安定であった。この3連のシグナルは赤血塩で酸化することによって、再び3,300 ガウスに1つだけの吸収スペクトルになり、しかもこれは最初の時にくらべ著しく縮小して、シャープなシグナルになった。



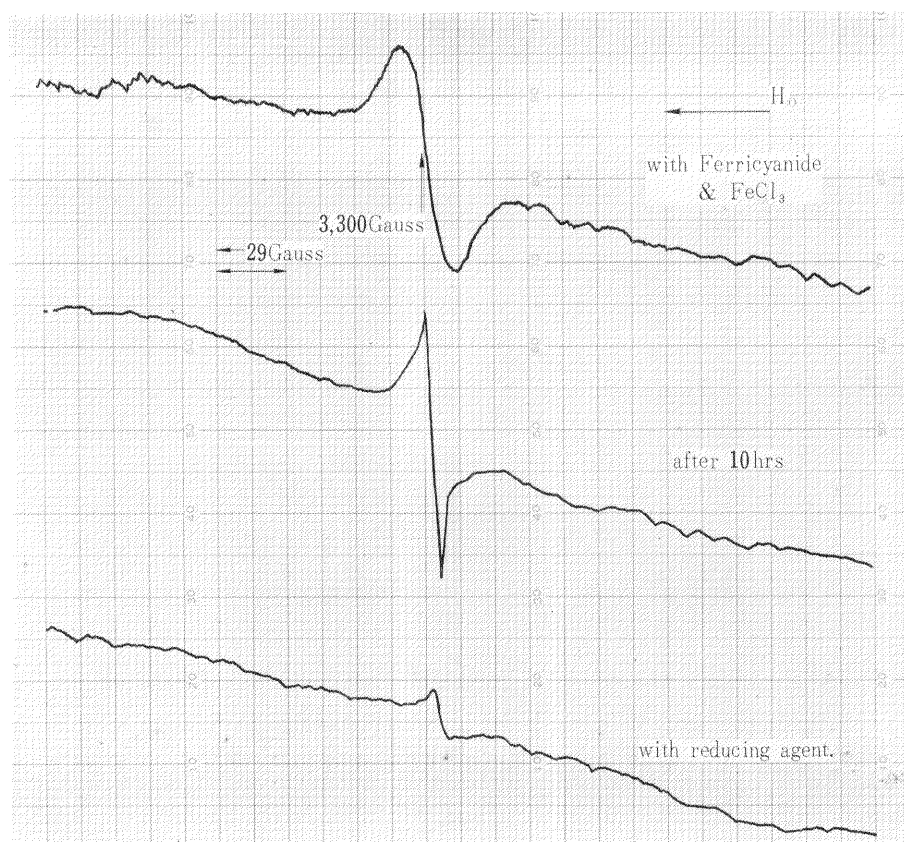
第7図 ミトコンドリアの ESR スペクトル (1)



第8図 ミトコンドリアの ESR スペクトル (2)

ディープフリーザーに保存して置いたミトコンドリア画分をハイドロサルファイトで還元すると、低磁場側のシグナルは増大し、逆に 3,300 ガウスのシグナルは縮小した。この現象は赤血塩による酸化で、還元前に完全に戻すことができ、酸化形と還元形のシグナルは変化が可逆的であった。この際、酸化剤添加は 3,300 ガウスのシグナルを増大する如く働き、酸化形のミトコンドリア画分に FeCl_3 を加えると、このシグナルはさらに増大し、10時間放置後にはシャープな形をとり、還元すると急激に縮小した。

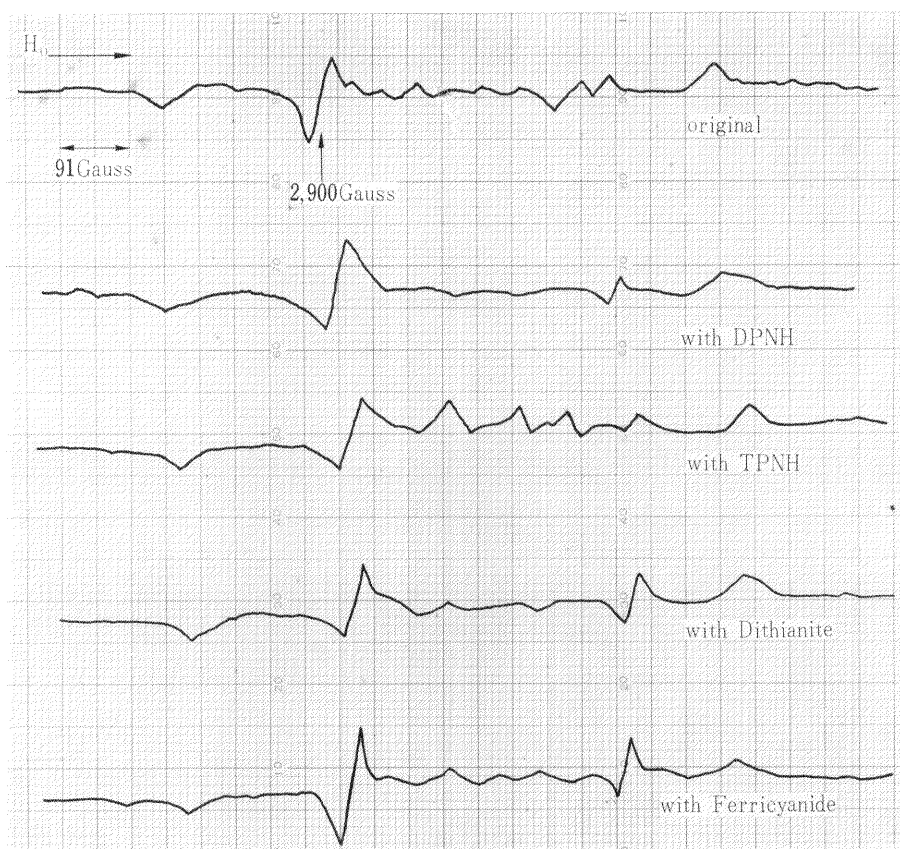
これらの現象は非常に大きな示唆を含んでいるように思われる。すなわち FeCl_3 によって 3,300 ガウスのシグナルが増大したことは、ここに Fe が配位にせよ、遊離にせよ、主成分として含まれている可能性、これが還元剤で縮小し、酸化剤で回復する可逆性、 NaCN で出現した新しい吸収スペクトルが酸化剤で消失すること、酸化形に FeCl_3 を加えて時間をおくと 3,300 ガウスのシグナルが著しくシャープになってセミキノンを思わすことなど、目下引き続き含有金属の分析と平行して解析中である。



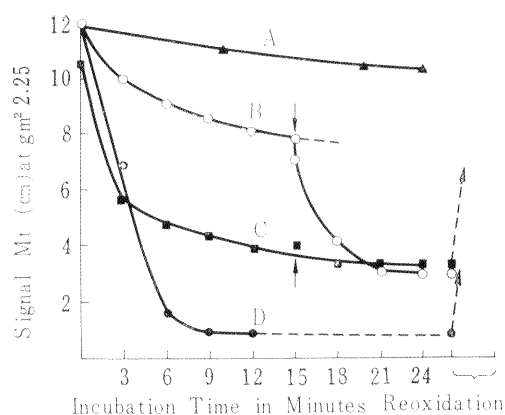
第9図 ミトコンドリアの ESR スペクトル (3)

3) ミクロソーム 肝ホモジネートの 700 g 15 分遠沈上澄を 12,000 g 20 分の条件で再び遠沈、この上澄を表 2 に記したように 0.04 M KCl 5 容で稀釈、54,000 g 1 時間でえたペレットを坂岸らの方法⁴⁹⁾で、密度勾配遠沈 145,000g, 8 時間で分けた滑面ミクロソーム (リボソームの付着していない画分) を蛋白量 10 mg/ml 程度で試料管につめ、ミトコンドリアの場合と全く同じ条件で ESR スペクトルを測定した。

ミクロソームについてはすでに Hashimoto, Mason らが、 $g=4.32, 2.41, 2.25, 1.99$ および 1.91 に特長あるシグナルを認め、殊に 2.41 と 2.25 の両スペクトルの推移を還元形の経過からみて報告しているが、われわれの場合は $g=2.9, 2.25, 2.0, 1.9, 1.85, 1.8$ および 1.6 をとり上げてミクロソームの ESR シグナルとした。この中 $2.9, 2.25$ の両スペクトルはきわめて特長的で、片側のコブ状の 2 峰を“ラクダの山”と称しているが、これを中心として酸化形、還元形を観察した。これらの吸収スペクトルは肝ホモジネートの ESR スペクトルに見られた低磁場側の一連のスペクトルに全く合致し、ホモジネートのスペクトルがミトコンドリアとミクロソームのスペクトルからなることが確認された。

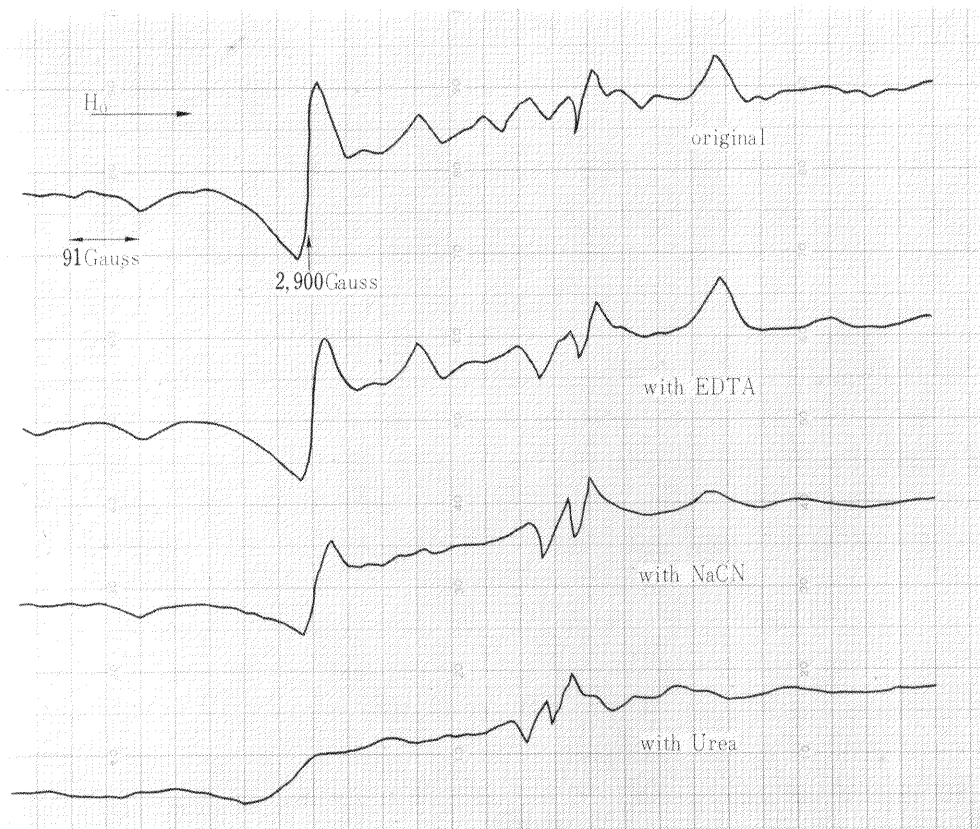


第10図 ミクロソームの ESR スペクトル (1)



(A) 対照。(B) 0.5 μ mole の NADH 添加後、矢印で更に NADPH を加えた場合。(C) NADPH 0.5 μ mole の添加。(D) Co 封入下で NADH 0.5 μ mole を加えた場合。酸化は室温で O_2 を通じて2分後、矢印の如くシグナルの吸収強度が回復する。

第11図 ミクロソームの ESR スペクトルのうち $g=2.25$ のシグナルの吸収強度変化



第12図
ミクロソームの ESR スペクトル (2)

ミクロソームは蛋白質の2層間に磷脂質の層をもつ膜が主体で、これに核酸である RNA と蛋白からなる粒子 (リボソーム) が付着しているが、ここで用いた滑面ミクロソームは膜構造だけの小胞で、日立電子顕微鏡 HS-7 で撮影した結果は第13図の如くであった。この画分にはエミッションスペクトラムをみると、Ca, Si, Na, Mg, Cr, Al, Zn, Cu, Fe, Ti, Pb, V, Ni, Mn, Mo および Ag が検出されたが、この中かなりのものが超遠心操作の際の混入夾雑物であると思われる。日立製作所那珂工場における原子吸光分析では、

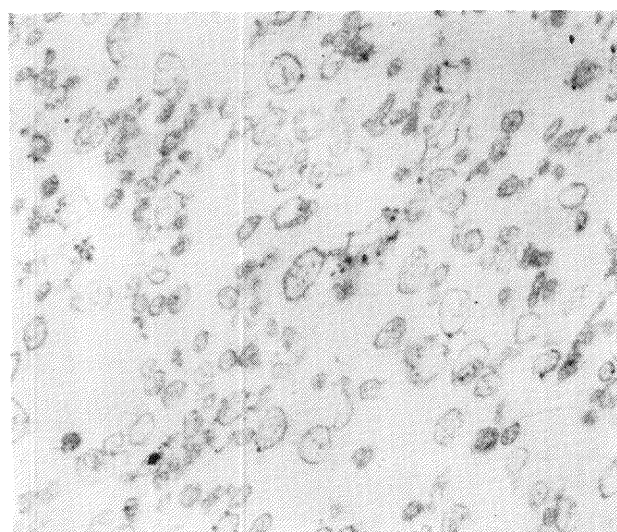
Fe	6.8	ppm (1 mg protein/ml)
Cu	0.64	
Mg	0.72	
Pb	2.0	
Ca	4.2	

であったので、Fe と Cu が ESR 研究での対象となる。

Cu の吸収スペクトルは $g=2.0$ より低磁場側にあるが、 $CuSO_4$ 添加によるスペクトルはどのシグナルとも一致せず、Cu のスペクトルが主役である可能性は少ないように思われる。したがって

ミクロソームには幾つかの電子伝達系があり、DPNH (NADH' 助酵素 I) と TPNH (NADPH, 助酵素 II) のいずれをも酸化する性質があることは分っているが、DPNH で還元すると、“ラクダの山”を除く他のシグナルが縮小または消失し、TPNH による還元で $g=2.25$ の増大、高磁場側の複雑化と“ラクダの山”の縮小とかなり異った様相を呈することが分った。ハイドロサルファイトによる還元では DPNH の場合とよく類似した変化を示した。これらの変化は Mason らも指摘しているように、酸化剤によって元に戻り、酸化形と還元形間の変換は可逆的であった。

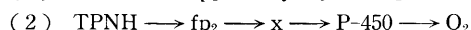
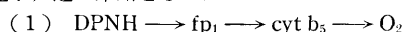
金属イオンとキレート結合をする EDTA を加えても、ミクロソームの ESR スペクトルは変らなかったが、NaCN を加えると 2,900 ガウスの山は縮小し、 $g=2.0$ および 1.6 のスペクトルも著しく減少した。尿素の添加では $g=2.25$ の山は全く崩れ、ミクロソームのシグナルとしての特長は失われてしまうように思われた。



第13図 兎肝臓のミクロソームの電子顕微鏡写真 倍率 30,000

少なくともミクロソームについてはその吸収スペクトルが Fe に由来することが、まず想定される。Beinert ら、Mason らは $g=4.3$ の吸収スペクトルも注目しているが、このものは無機鉄で現われるところから、ミクロソーム、ミトコンドリアなど細胞顆粒の特有のシグナルには含まない方がよく、これら両方が保存が長くなるとシグナルを消失すること、また尿素によってスペクトルが平坦になってしまうことは蛋白質と関係ある構造を予想させ、無機鉄のみによる吸収スペクトルは一応別に扱うべきものといえよう。

ミクロソームにもミトコンドリアと同様、幾つかの電子伝達系があり、これにはチトクローム b_5 と共にほぼ同量含まれているヘム化合物 P-450 が密接に関係している。現在までのところ確実な電子伝達の系路としては



の 2 つが分っており⁴⁶⁾、この中 (2) の系路の x はおそらくビタミン K または助酵素 Q のようなセミキノンになり易い構造の物質である。ここで fp_1 は DPNH-チトクローム b_5 還元酵素、 fp_2 は TPNH-チトクローム C 還元酵素を示し、いずれもフラビン酵素である。cyt はチトクロームの略である。これらのうち P-450 と

いうヘム化合物は還元すると CO とよく結合する物質で、哺乳類では肝臓中に cyt b_5 とほぼ等量存在するが、甲状腺ミクロソーム中には含まれていないらしい。一方 cyt b_5 のみを精製すると、その ESR シグナルをみた場合全くといってよい程吸収がないので、甲状腺ミクロソームの ESR 吸収スペクトルを調べてみると全くシグナルが観測されない。これは、目下、阪大山野研究室で確認している。CO 結合性チトクローム P-450 がもしミクロソームの ESR スペクトルの主役であるとしたら話は甚だ巧いのであるが、現在までのところではそこまでの手懸りは得られていない。しかし還元または酸化処理によって往々ミクロソームの ESR シグナル中に遊離基の吸収スペクトルが出現することは、 fp_2 のフラビンとキノンと思われる x の連結した (2) の系路も想定させ、この点は ESR のみで解決出来るようにも思われる。

以上、われわれの行なっている細胞顆粒の磁気化学的研究の 2, 3 の結果を紹介したが、電子顕微鏡による形態学的知見および生化学的手段が同時に平行して取り入れられた大きな対象であるこの仕事は、これからの結果の解析によって、さらに新事実を提供する可能性があり、いずれ ESR による光化学的研究なども含めて別に論じたい。

文 献

- 1) D. J. E. Ingram, Free radicals as studied by electron spin resonance, Butterworths Scientific Publication (London) 1958
- 2) B. Commoner, J. Townsend and G. Pake, Nature **174**, 689 (1954)
- 3) B. Commoner, J. Heise and J. Townsend, Proc. Natl. Acad. Sci. **42**, 710 (1956)
- 4) B. Commoner, Science **126**, 57 (1957)
- 5) B. Commoner, B. Lippincott and J. Passonean, Proc. Natl. Acad. Sci. **44**, 1099 (1958)
- 6) T. E. King, R. L. Howard, H. S. Mason, Biochem. Biophys. Res. Comm., **5**, 329 (1961)
- 7) K. V. Rajagopalan, V. Aleman and P. Handler, Biochem. Biophys. Res. Comm., **8**, 220 (1962)
- 8) T. Vänngård, R. C. Bray, B. G. Malmström, R. Pettersson, Free Radicals in Biological Systems (ed. M. S. Blois), p 209, Academic Press, New York (1961)
- 9) 久保秀雄, 豆 弘, 志賀 健, 磯本照夫, 魚住光郎, 門田 健, 酵素化学シンポジウム, **17**, 24 (1962)
- 10) H. Kubo, H. Watari and T. Shiga, Bull. Soc. Chin. biol., **41**, 981 (1959)
- 11) H. Beinert, Free Radicals in Biol. Systems (ed. M. S. Blois) p 17, Academic Press, New York (1961)
- 12) A. Ehrenberg and G. D. Ludwig, Science, **127**, 1177 (1958)
- 13) A. Ehrenberg, Ark. Kemi, **19**, 97, 119 (1962)
- 14) L. H. Piette, I. Yamazaki and H. S. Mason, Free Radical in Biological Systems p 195, Academic Press, New York (1961)
- 15) I. Yamazaki, and L. H. Piette, Biochem. Biophys. Acta, **50**, 62 (1961)
- 16) I. Yamazaki, H. S. Mason, and L. H. Piette, J. Biol. Chem., **235**, 2444 (1960), Biochem. Biophys. Res. Comm., **1**, 336 (1959)
- 17) H. S. Mason, E. Spencer, and I. Yamazaki, ibid, **4**, 236 (1961)
- 18) M. B. Allen, L. H. Piette, and J. C. Murchio, Biochem. Biophys. Acta, **60**, 539 (1962)
- 19) R. W. Treharne, H. C. Eyster, Biochem. Biophys. Res. Comm., **8**, 477 (1962)
- 20) H. P. C. Hogenkamp, H. A. Barker, and H. S. Mason, Arch. Biochem. Biophys., **100**, 353 (1963)
- 21) T. Nakamura, and H. S. Mason, Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 297 (1960)
- 22) H. Yamada, K. T. Yasunobu, T. Yamano, and H. S. Mason, Nature, **198**, 1092 (1963)
- 23) B. Malmström, Nature, **183**, 321 (1959)
- 24) T. Nakamura, Free Radicals in Biol. Systems, p 169, Academic Press, New York (1961)
- 25) H. Beinert, D. E. Griffiths, D. C. Wharton, and R. H. Sands, J. Biol. Chem., **237**, 2337 (1962)
- 26) A. Ehrenberg, T. Yonetani, Acta chem. Scand., **15**, 1071 (1961)
- 27) J. E. Bennett, D. J. E. Ingram, Nature, **177**, 275 (1956)
- 28) D. J. E. Ingram, J. F. Gibson, and M. F. Peruz, Nature, **178**, 908 (1956)
- 29) J. F. Gibson, D. J. E. Ingram, Nature, **180**, 29 (1957)
- 30) J. E. Bennett, J. F. Gibson, and D. J. E. Ingram, Proc. Roy. Soc. (London) A, **240**, 67 (1957)
- 31) H. Beinert and R. H. Sands, Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 41 (1960)
- 32) H. Beinert and R. H. Sands, ibid, **1**, 171 (1956)
- 33) R. H. Sands and H. Beinert, ibid, **3**, 47 (1960)
- 34) H. Beinert and W. Lee, ibid, **5**, 40 (1961)
- 35) S. S. Brody, G. Newell and J. Castner, J. Phys. Chem. **64**, 554 (1960)
- 36) V. Holmogorov and A. Terenin, Naturwiss, **48**, 158 (1961)
- 37) B. Smaller, Free Radicals in Biol. Systems, p 315, Academic Press, New York (1961)
- 38) M. Calvin, Rev. of Mod. Phys., **31**, 157 (1959)
- 39) P. B. Sogo, N. G. Pon and M. Calvin, Proc. Natl. Acad. Sci., **43**, 387 (1957)
- 40) M. Calvin and P. B. Sogo, Science **125**, 499 (1958)
- 41) P. B. Sogo, M. Jost and M. Calvin, Radiation Research, suppl. **1**, 511, Academic Press, New York (1959)
- 42) P. B. Sogo, L. A. Carter and M. Calvin, Free Radicals in Biol. Systems, p 271, Academic Press, New York (1961)
- 43) R. W. Treharne, T. E. Brown, H. C. Eyster and H. A. Tanner, Biochem. Biophys. Res. Comm., **3**, 119 (1960)
- 44) H. S. Mason, Y. Hashimoto, P. Y. Sakagishi, T. Yamano and B. T. Allen, Northwest meeting of American Chemical Society, June (1962)
- 45) Y. Hashimoto, T. Yamano and H. S. Mason, J. Biol. chem., **237**, PC 3843 (1962)
- 46) 広田和, 大村恒雄, 西林洋子, 佐藤了: 第15回酵素化学シンポジウム論文集 p 55 (1963)

日立二重収斂形質量分析計について

中島 康雄*・津山 齊**・久本 泰秀***

1 原理、装置の概要

二重収斂質量分析計の原理は古く1934年からすでに明らかにされていた。二重収斂質量分析計は主として原子量の精密測定に使用されており、もっぱら研究者による自製の大形の装置が多かったが、最近の有機化学への応用から各メーカーが製品の販売を始め、米国 C.E.C. 社、独逸アトラス社はいずれも Mattauch 形の二重収斂装置を、また英国 A.E.I. 社は独自のタイプのものを製品化している。

この二重収斂の条件は電場磁場の組合せが、次式

$$a_m \left[\frac{l_m' - g_m}{f_m} + 1 \right] - a_e \left[1 + \frac{f_e}{l_e' - g_e} \right] = 0 \dots\dots (1)$$

a_m : 磁場の半径

a_e : 電場の半径

l_e' : イオン源から電場までの距離

l_m' : 速度収斂面から磁場までの距離

g_e : 電場の入口から焦点までの距離

g_m : 磁場の入口から焦点までの距離

f_e : 電場の主要面 (principal plane) から焦点までの距離

f_m : 磁場の主要面から焦点までの距離

を満足しさえすれば成立つものである。この式の解は無数に存在するが、前記 Mattauch type のほか Dempster type, Bainbridge type, Nier type の4形式が今日よく知られているものであって特殊なものは比較的少ない。

われわれは単収斂形質量分析計である RMU-6D 形質量分析計をそのまま使用し、これに付属装置として製品化した電場部を装備して二重収斂質量分析計となるようにした。

このために (1) 式の l_m' , g_m , a_m , f_m は決められてしまい、従って任意の l_e' , g_e , f_e を選ぶことができなくなった。

しかし単収斂形質量分析計に付属装置としての電場部を装備して二重収斂質量分析計を形成するのは未だその前例のないものであり、大きな特長である。

RMU-6D 形質量分析計についての l_m' , g_m , f_m , a_m の各常数は

$$a_m = l_m' = l_m'' = 20 \text{ cm}$$

l_m'' は磁場出口から収斂面までの距離

であり、いわゆる対称形である。磁場の偏向角 ϕ_m は 90° であるから

$$f_m = a_m / \sin \phi_m = a_m$$

$$g_m = a_m \cot \phi_m = 0$$

これを (1) 式に代入すれば

$$2a_m = a_e \left[1 + \frac{f_e}{l_e' - g_e} \right]$$

となる。また

$$f_e = a_e / \sqrt{2} \sin \phi_e \cdot \sqrt{2}$$

$$g_e = a_e / \sqrt{2} \cot \sqrt{2} \phi_e$$

$$(l_e' - g_e)(l_e'' - g_e) = f_e$$

l_e'' は電場出口から速度収斂面までの距離

ϕ_e は電場の偏向角

われわれは電場半径として 25 cm, 偏向角として 45° を採用した。従って $l_e' = 41.65 \text{ cm}$, $l_e'' = 20.60 \text{ cm}$ となった。

この装置の理論分解能は、電場の像の縮小率 M_e が

$$M_e = \frac{f_e}{l_e' - g_e} \approx 0.6$$

磁場による縮小率 M_m は 1 である。従って分解能 R は

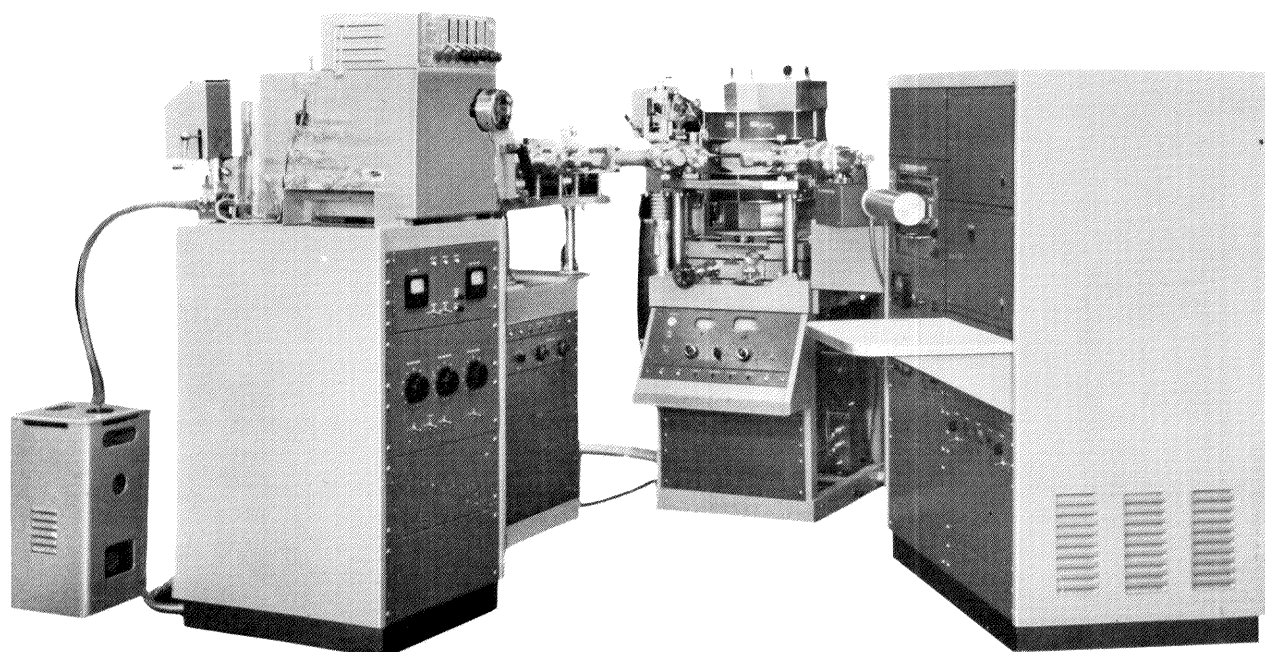
$$R = \frac{\frac{1}{2} a_e [1 + M_e]}{S_i \cdot \frac{f_e}{l_e' - g_e} + S_e}$$

ここで S_i はイオン源スリット幅, S_e はコレクタスリット幅,

$S_i = S_e = \frac{1}{100} \text{ mm}$ を使用した場合の分解能は

$$R \approx 12500$$

である。

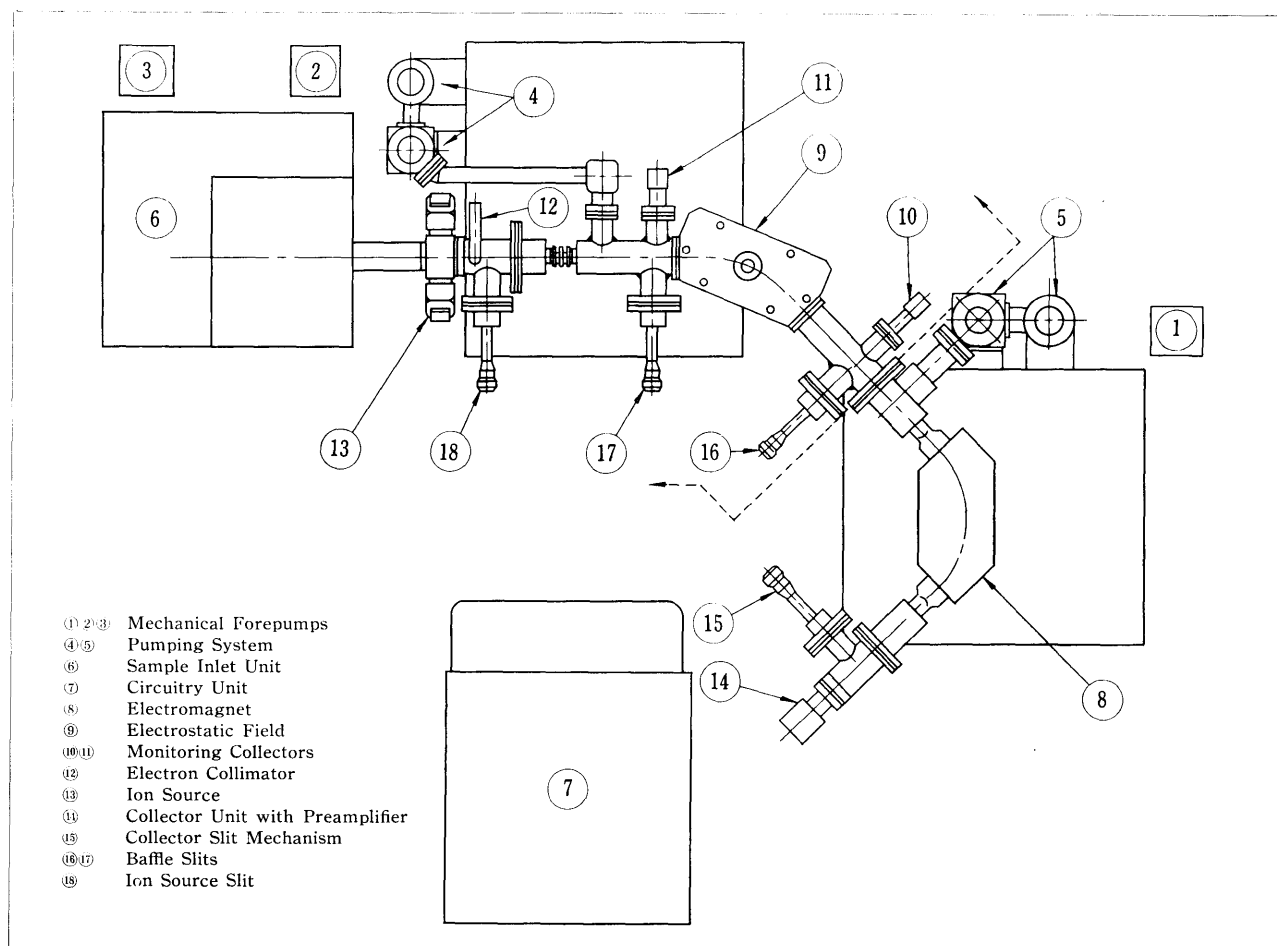


第1図 日立二重収斂形質量分析計外観図

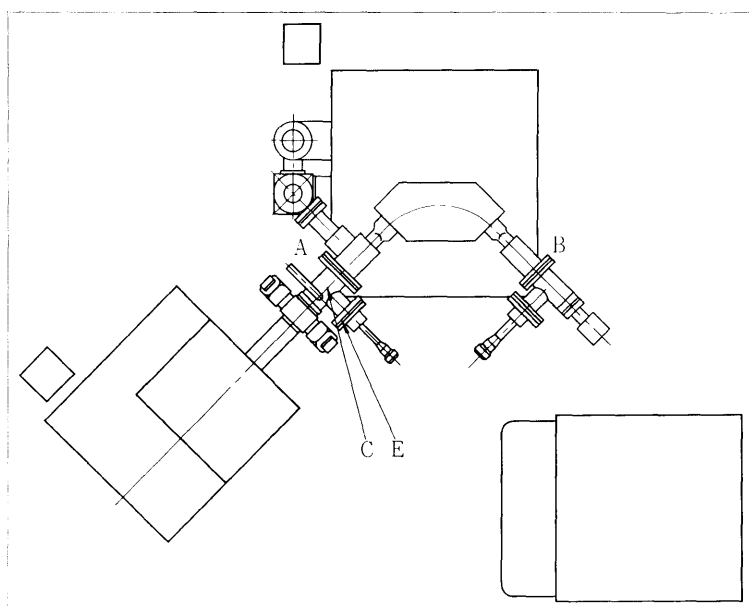
* 那珂工場電装設

** 中央研究所那珂分室

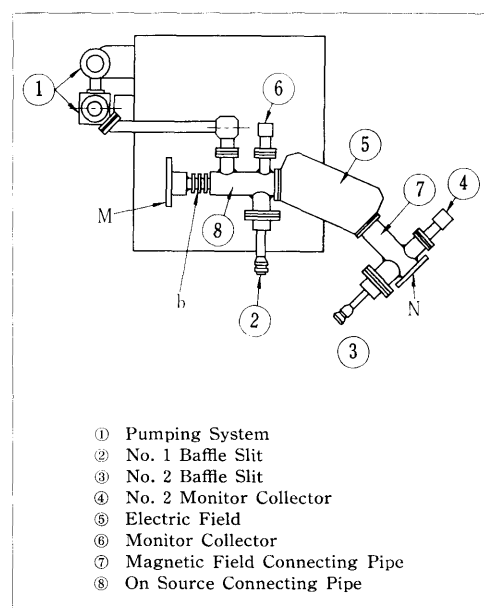
*** 那珂工場電装設



第2図 二重収斂付属装置を装備したRMU-6O形質量分析計



第3図 RUM-6D Single Focus Mass Spectrometer



第4図 Electric Field Attachment

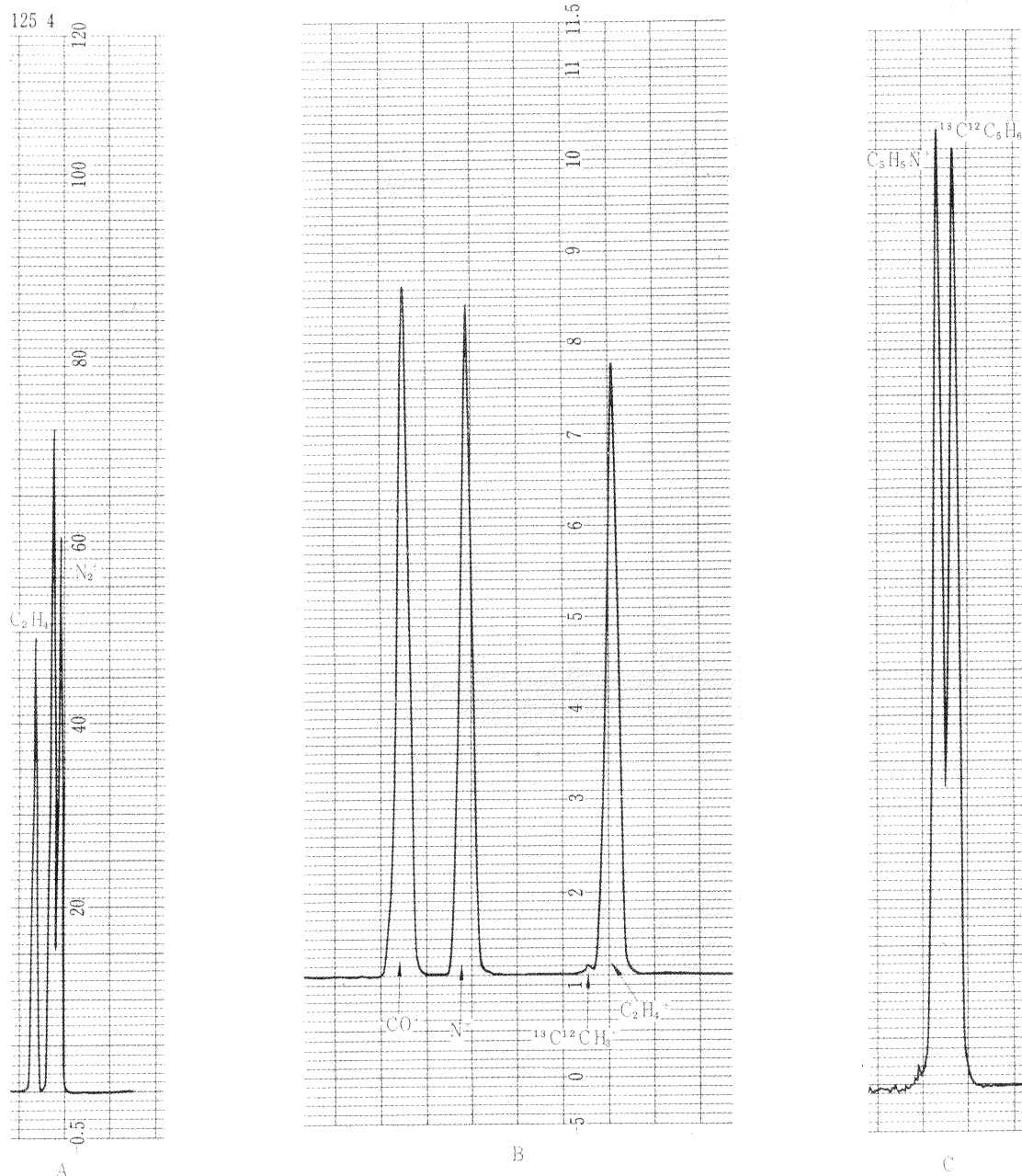
第1図はその外観図を示し、実際の装置は第2図のような配置をもつものである。

この装置は第3図の単収斂のRMU-6D形質量分析計のフランジAからイオン源部⑬の部分を取りはずし、このフランジAに第4図の二重収斂付属ソーチのフランジNとを接続し、取りはずされたイオン源部はこの付属ソーチのフランジMに取り付けられて第2図のように二重収斂質量分析計となるものである。

第2図で⑮、⑯、⑰、⑱ はいずれも5μの精度をもって0～1mmまでスリット幅を変えることのできる可変スリットである。

⑮はコレクタスリット、⑯は電場によって生ずる速度収斂面に取り付けられているものである。⑰はイオンビームの広がり調節するためのものであり、⑱はイオン源の射出スリットである。これらのスリットはすべて真空外部からそのスリット幅を変えることのできるものである。

第4図⑤はベローズであって、イオン源部は可動台の上に取り付けられており、イオン源と電場との距離は調整されるようになっている。



第5図

2 測定結果

本装置を用いて測定した2～3の例について述べる。

第5図①、②は N_2 , CO , C_2H_4 のいわゆる三重像 (Mass Triplet) を分離したものである。これらの三物質の質量は

$$CO = 27.994914$$

$$N_2 = 28.006148$$

$$C_2H_4 = 28.031300$$

で N_2 と C_2H_4 の相対的な質量差は約 1/1100, N_2 と CO は 1/2500 である。この図で①は単収数の RMU-6D 形質量分析計で測定したものであり、②は同一試料を RMU-6D 形質量分析計に二重収斂付属装置を取り付けて二重収斂質量分析計として測定したものである。

第5図③のスペクトルはピリジン (Pyridine C_5H_5N , 分子量 79) とベンゼン (Benzene C_6H_6 , 分子量 78) のアイソトープピークである $^{13}C_5 \cdot ^{13}C \cdot H_6$ の二重像 (Mass Doublet) を測定したものである。これら2個の物質の分子量は

$$C_5H_5N = 79.067225$$

$$^{13}C_5 \cdot ^{13}C \cdot H_6 = 79.075418$$

であり相対的な質量差は約 1/9700 である。

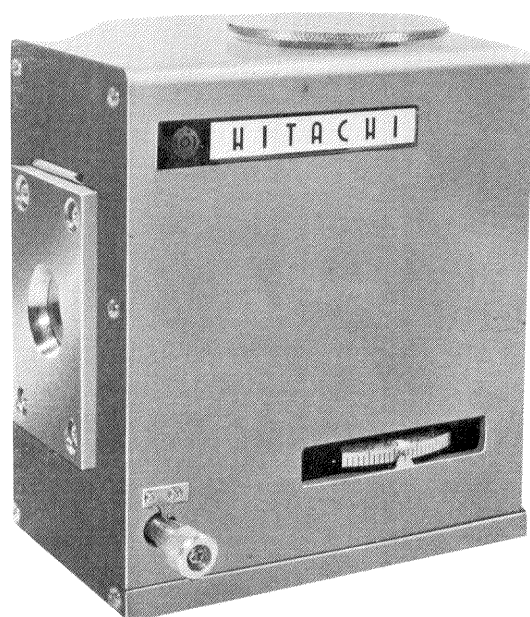
注：これらの分子量は原子量の Data に多少の違いがあるため若干の差はある。

これらの Data の測定条件は、イオン加速電圧 3,600 V, 電子電流 80 μA , 電子加速電圧 75 V であり、二重収斂の場合は二次電子増倍管によって測定した。(この二次電子増倍管は RMU-6D 形には標準品として装備されている。) 記録計としては 2 pen Recorder を使用した。

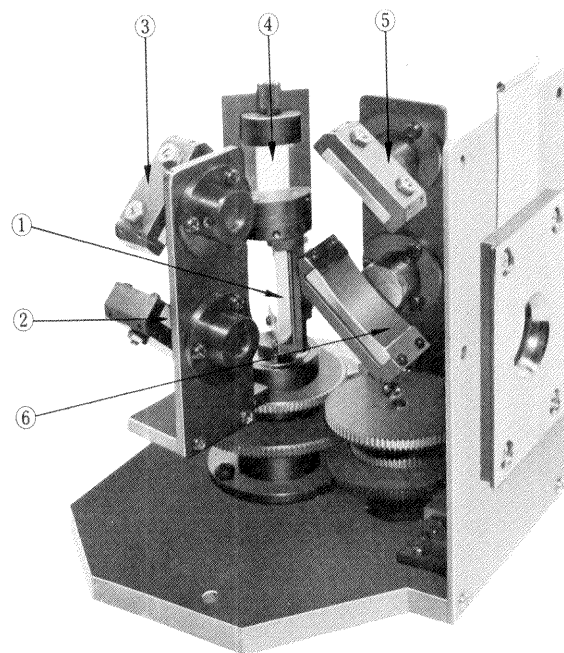
試料導入系はすべて硝子で作られた高温導入系 MG-141A を使用した。この導入系は 350°C まで加熱できるもので、試料は導入部からイオン源まで硝子以外のものに接触することなしに導入される。

ATR-1 形 日立赤外全反射測定装置

福田 健二*・石川 信*



第1-a図 ATR-1 形 赤外全反射測定装置



第1-b図 ATR-1 形 内部構造

- | | | |
|-------------------------|----------------------|------------------------|
| ① M ₁ 平面鏡 | ② M ₂ 平面鏡 | ③ M ₃ 平面鏡 |
| ④ P _z 結晶プリズム | ⑤ M ₄ 平面鏡 | ⑥ M ₅ トロイダ鏡 |

1 緒 言

従来の反射セルは空間に試料をおき空気-試料面で反射を行わせるもので、効率が悪く正確な解析が面倒で透過スペクトルに比べてバンド幅が広く吸収の強弱の変化が少ないのであまり有効ではなかった。しかし1961年 Fahrenfort^{1),2)}により初めて発表された ATR (Attenuated Total Reflectance) 全反射装置は高屈折率の結晶と試料とを密着させこの境界面にて全反射を行なわしめて、試料の屈折率の変化による反射エネルギーの増減を記録してスペクトルを得る方法である。このスペクトルは透過スペクトルに酷似しており反射スペクトル法の利点を広い範囲で生かせるという点で有効で最近注目された赤外分光光度計の付属装置である。^{3),4)}

本装置を使用する目的は

- 1) 光学常数即ち試料の屈折率、吸収係数などの測定。
- 2) 透過では測定できなかった吸収係数の高い試料やフィルム状にできなくて試料操作の困難な試料の測定。

a) 固 体

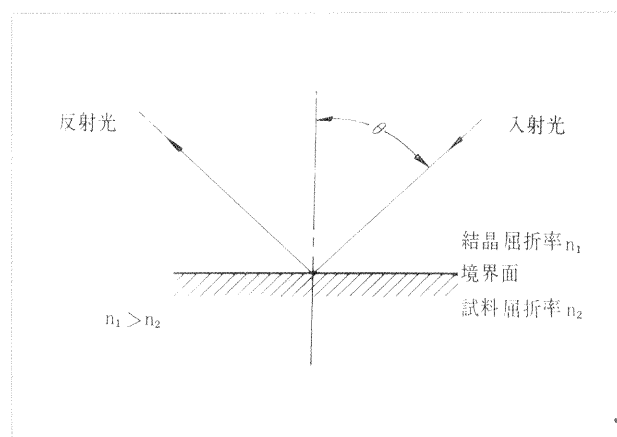
ゴム、プラスチック、粘度の高い試料、塗料等。

従来このような試料は溶媒にとかすか低温硬化させマイクロームで薄片にして測定していたが手間がかかり測定に長時間要していた。しかし本装置では試料を破壊することなく結晶に密着させるだけでスペクトルが得られまた厚みには無関係であるため薄片にする必要もない。粘度の高いグリース状の試料、例えばゼラチン、マーガリンなどの食品関係、リノタイプや塗料などの建築材への応用も広い。

b) 液 体

吸収係数の高い試料で0.025 mm 厚のセルでは吸収が強すぎて測定できなかったものおよび水の吸収に邪魔されて測定できなかった水溶液の測定にも有用でまた血液などの医学方面への応用も広い。

2 原 理



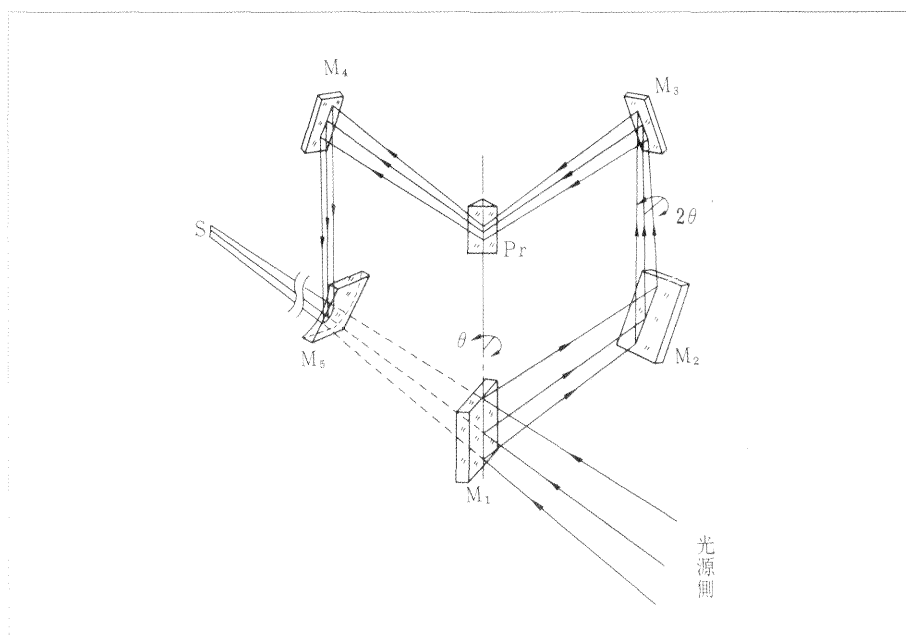
第2図 境界面での全反射

試料よりも高い屈折率を有する結晶を密着させ第2図に示すように結晶側から試料との境界面に臨界角よりも少し大きな角度 θ で入射させると全反射が起こる。試料の屈折率 n_2 が波長によって変化すると境界面にて反射される反射エネルギーはこれに応じて増減する。この場合結晶の屈折率 n_1 は全波長域にわたりほぼ一定で高屈折率である必要があり KRS-6 (2.0), KRS-5 (2.2), Ge (4.0), AgCl (1.8) などが普通選ばれる。本装置では試料の屈折率の変化を反射エネルギーの増減で測定するが透過スペクトルとの関係は屈折率 n_2 と吸収係数 α との間に $\alpha = f(n_2)$ という函数関係があり屈折率が大きく変化するところでは吸収が起ることから酷似したスペクトルが得られることを示している。即ち $n_2=1$ の場合は試料面が空気の時で反射エネルギーはこの時最大で100%になりまた $n_2=n_1$ のときは全エネルギーが透過し反射エネルギーは0%になる。従って n_2 が $1 \sim n_1$ の間を変化すると反射エネルギーは100%~0%の間を変化する。

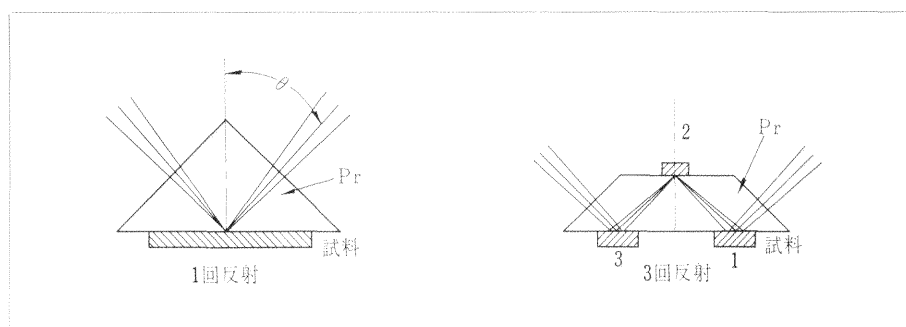
* 日立製作所那珂工場

3 装 置

第1図に外観写真を第3図に光学系を示す。 $M_1 \sim M_4$ は平面鏡、 M_5 はトロイド鏡、Prは結晶のプリズムである。光束の焦点Sは平面鏡 $M_1 \sim M_3$ によりPrの境界面上に結像し、反射されて平面鏡 M_4 とトロイド鏡 M_5 によりもとのアパーチャにもどされSに結像する。試料に応じて入射角を変える必要があり M_1 とPrの軸が θ 回転すると M_2 と M_3 が同じ軸に対して 2θ 回転して入射角を変えられる機構になっている。この光学系では焦点位置SがプリズムPrの境界面にくるので試料面積が最少ですみ、結晶面と試料面の良好な密着が容易に得られる。液体試料に対してはPr部に特殊付属品を取り付けることにより簡単に測定できる。プリズムPrは第4図に示すように1回反射と多重反射の2種類ある。1回反射では透過スペクトルに比べて吸収の深さが浅いということが唯一の欠点であったが3箇所を試料を密着させて3回反射にしてスペクトルを記録すると透過スペクトルと同程度の深さのスペクトルが得られる。本装置はPr境界面に焦点Sを結像させた光学系を採用したため1回反射と多重反射を兼用できるという特長を有している。



第3図 光 学 系



第4図 全反射プリズム Pr

4 測 定 例

同一試料で透過スペクトルと全反射スペクトルの比較データを示す。

i) ポリスチレンフィルム

透過スペクトル

第5-a図

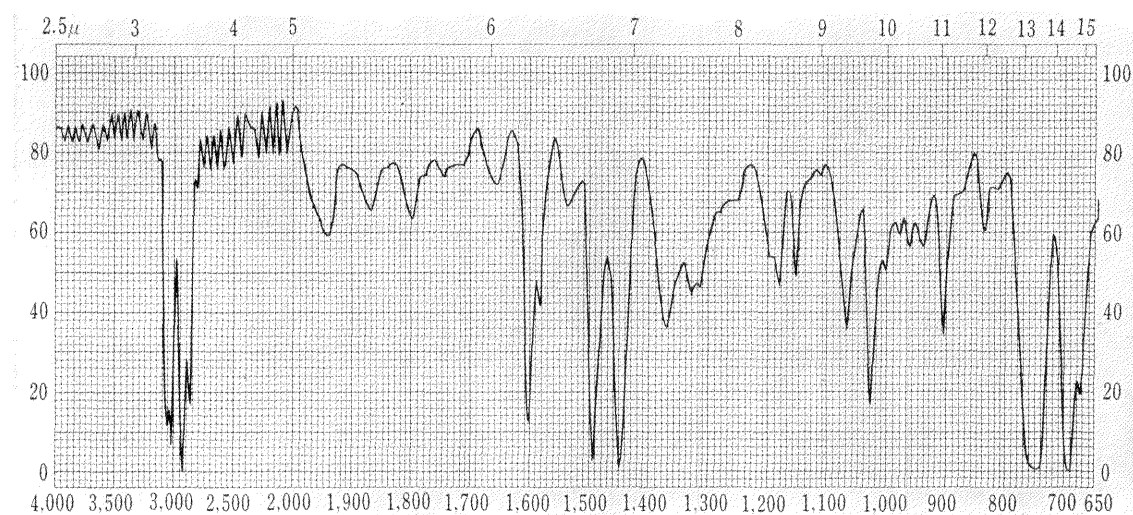
全反射スペクトル 1回反射

第5-b図

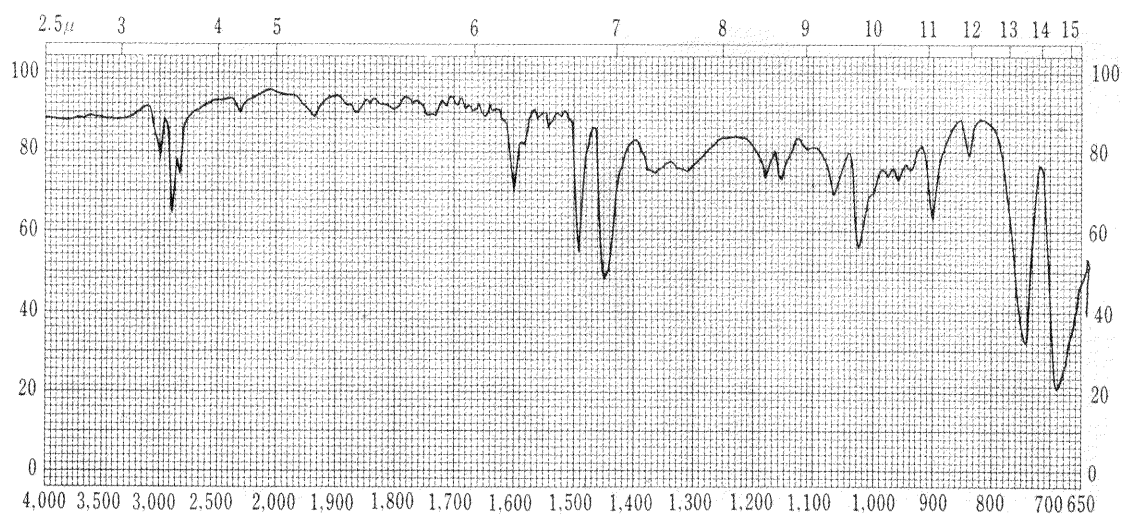
3回反射

第5-c図

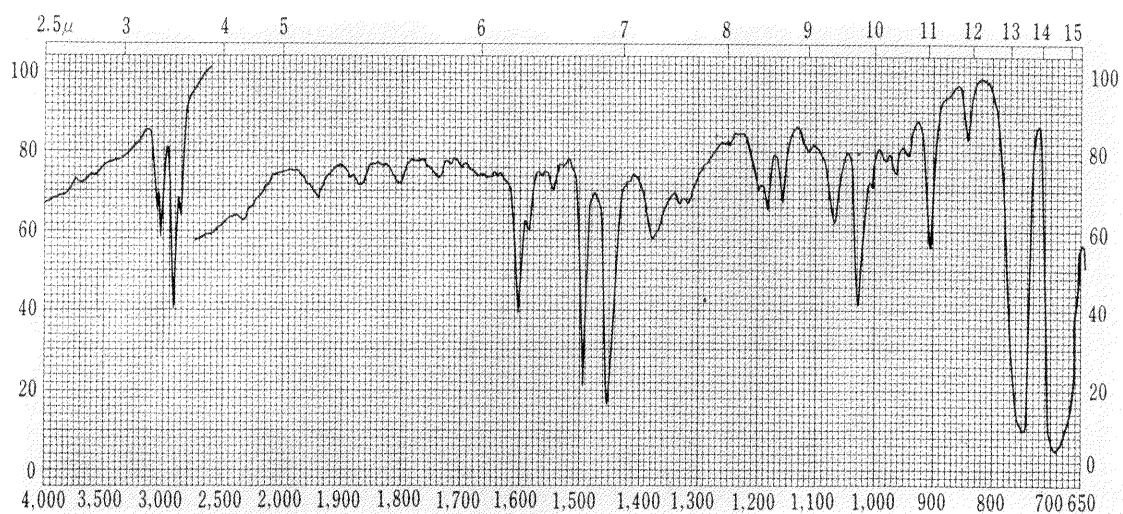
1回反射は透過法に比べて吸収の深さは浅いが3回反射にするとはほぼ同程度の深さのスペクトルが得られる。短波長側でのエネルギー低下はプリズム面での散乱光によるものである。



第5-a図 ポリスチレンフィルム透過スペクトル



第5-b図 ポリスチレンフィルム全反射スペクトル1回反射



第5-c図 ポリスチレンフィルム全反射スペクトル3回反射

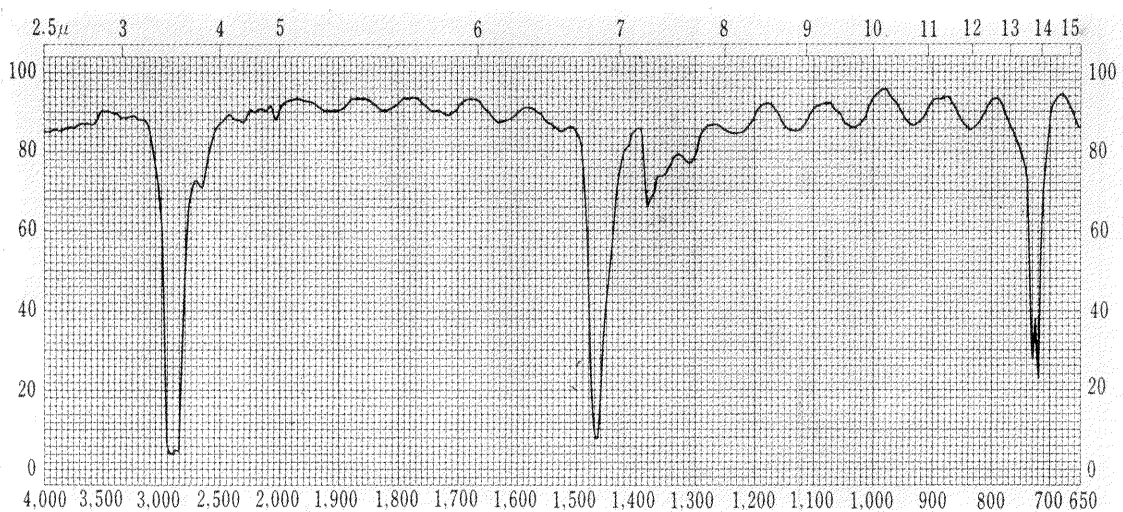
ii) ポリエチレンフィルム

透過スペクトル

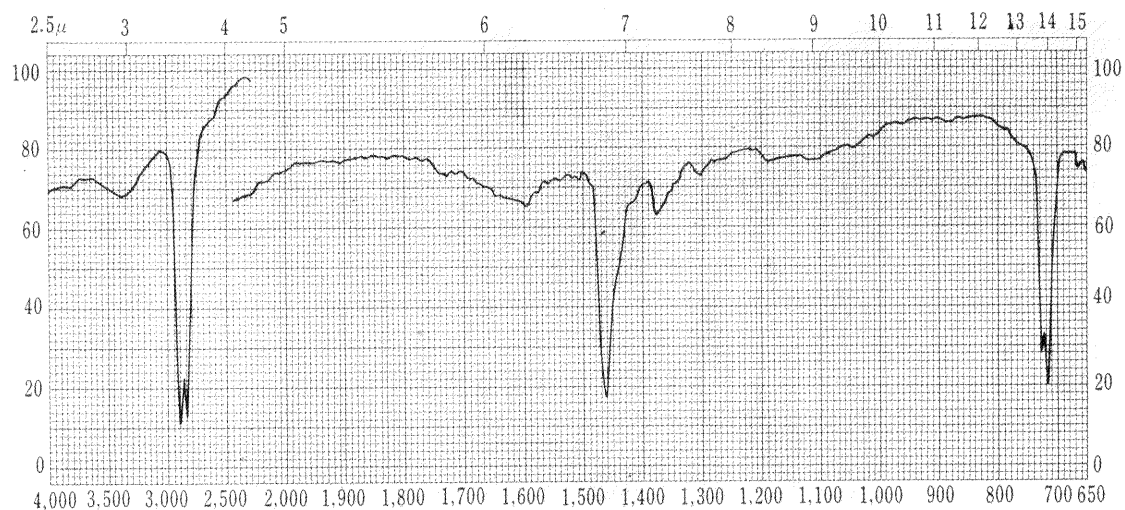
第6-a図

全反射スペクトル 3回反射

第6-b図



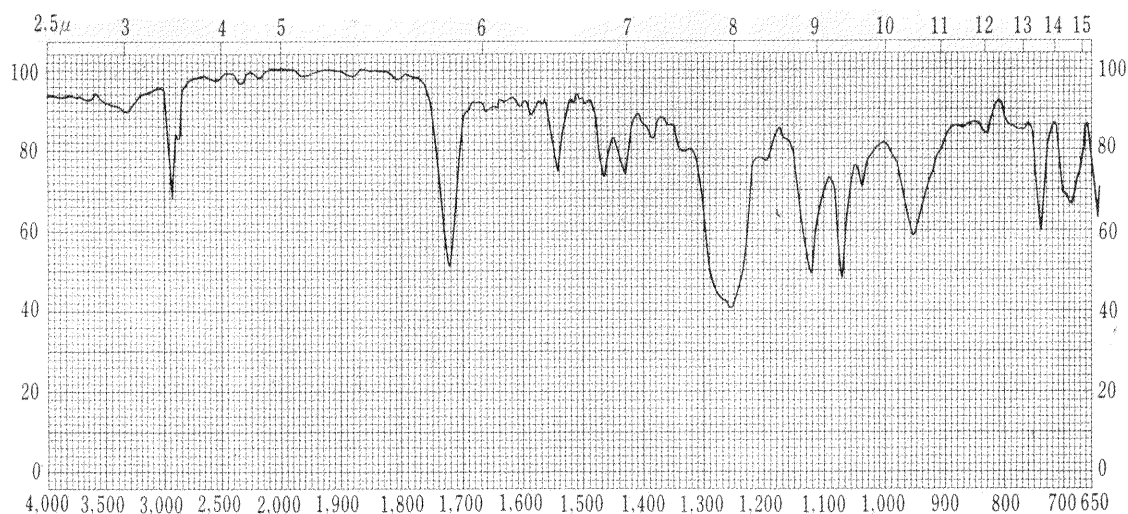
第6-a図 ポリエチレンフィルム透過スペクトル



第6-b図 ポリエチレンフィルム全反射スペクトル3回反射

iii) 塩化ビニール (プラスチック)
全反射スペクトル 1回反射 第7図

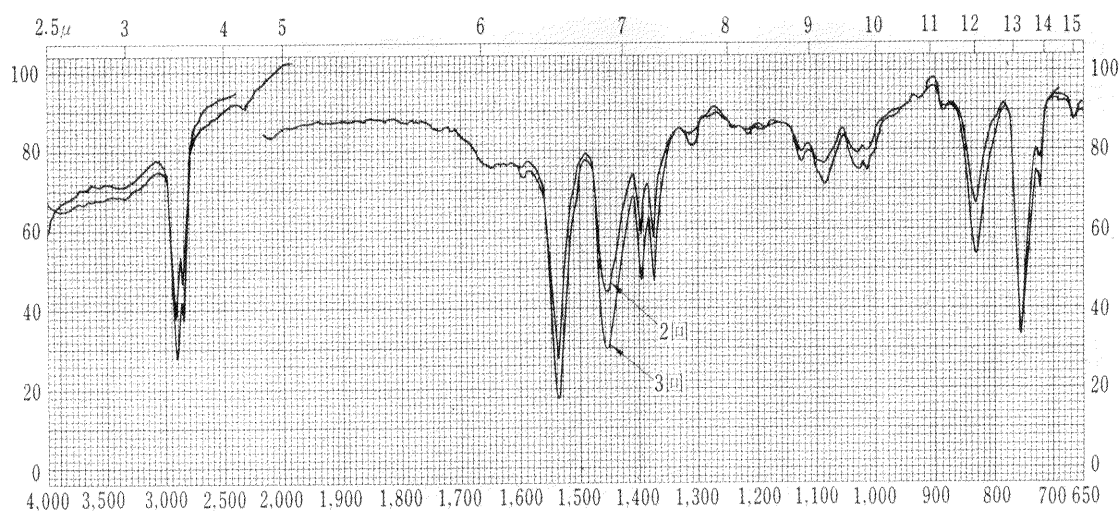
従来このような試料は比破壊では測定不可能であったが本装置を使用すると試料小片を Pr 面に密着させるだけで良い。



第7図 塩化ビニール全反射スペクトル1回反射

iv) 生 ゴ ム 第8図

第4図の3回反射プリズムの3個の試料のうち1個はずすと2回反射も容易に得られ2回と3回の差を示す。



第8図 生ゴム全反射スペクトル2回, 3回反射

文 献

- 1) J. Fahrenfort, Spectrochim. Acta **17**, 698 (1961)
- 2) J. Fahrenfort, Spectrochim. Acta **18**, 1103 (1962)

- 3) 田中誠之他, 工業化学雑誌 **66**, 1571 (1963)
- 4) CIC News Leter, No. 15~No. 20 (1962~1963)

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 7 No. 4

昭和39年8月20日印刷

昭和39年8月30日発行

非売品

年6回 毎偶数月発行

編集人 麓 吉次

発行人 白川 義雄

発行所 株式会社日立製作所

印刷所 株式会社日立印刷所