

THE HITACHI Scientific Instrument NEWS

June, 1965 Vol. 8. No. 3.

 Hitachi, Ltd.

目 次

1. 糖質のガスクロマトグラフィー (I) 山 川 民 夫・植 田 伸 夫..... 1
2. 悪性腫瘍の示す ESR スペクトル
——電子スピン共鳴の生物学への応用——..... 坂 岸 良 克・岡 部 哲 夫..... 4
3. G-3 形日立自記分光光度計用分光蛍光付属装置について
..... 大 西 靖・皆 川 定 雄・嶺 岸 久 子..... 5

糖質のガスクロマトグラフィー (I)

山 川 民 夫*・植 田 伸 夫*

たとえば蔗糖を加熱すると、カラメルといわれる粘稠な黒褐色の香気ある液体となる。そしてさらに加熱すると炭化してしまう。このように糖質それ自体は、熱に対して非常に強い物質というわけではなく、また揮発性はほとんどないといってよい。

これらの性質は糖質を特色づける多数の—OH 基と多かれ少なかれ関連している。

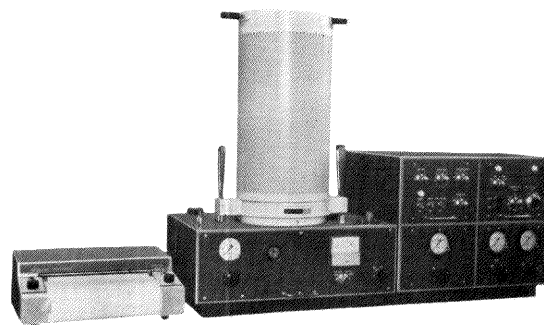
ところで近年のガスクロマトグラフ技術の進歩は、ガスクロマトグラフィーによって分析可能な物質の領域をきわめて広くした。もちろん、固定相液体、担体の開発改良が分析領域の拡大に寄与したことは否めないが、むしろガスクロマトグラフィーの試料としては不適当な不揮発性の物質に蒸気圧を与えるような方法、すなわち揮発性誘導体の合成とか、該物質に含まれる固定相液体、あるいは担体と親和性の強い官能基を置き換え、または被



山 川 民 夫



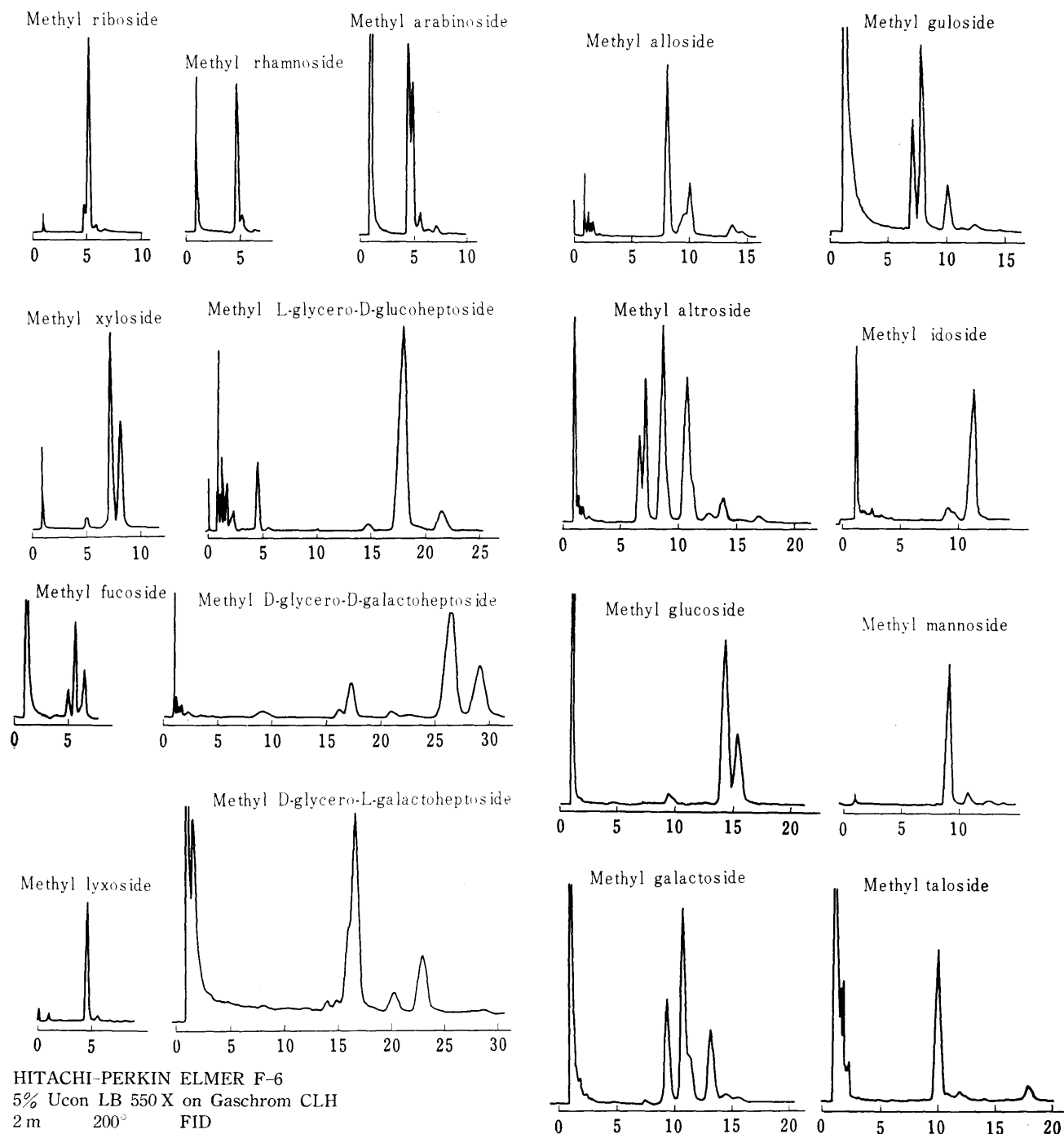
植 田 伸 夫



日立 F-6 形昇温ガスクロマトグラフ

*東京大学伝染病研究所化学研究室

図-1 単糖類 (TMS-メチルグリコシド) のガスクロマトグラム



覆してしまうとかの方法が、ガスクロマトグラフィーの被験試料の側から応用領域を広くした。

糖質も或る程度耐熱性のある、揮発性誘導体が簡便に作られることから、ガスクロマトグラフィーによって分析し得る好個の材料となった。

① トリメチルシリル糖のガスクロマトグラフィー (1)(2)

重量比で数%の塩酸ガスを含むメタノール中で還元糖を加熱すると、還元基末端はメチル化される。このメチルグリコシドの

—OH 基には、無水ピリジン中でヘキサメチルジシラザン、トリメチルクロロシランと反応させることによってトリメチルシリル基 (TMS 基) を導入することができる。このメチル (トリメチルシリル) グリコシドは耐熱性があり、かなり揮発性を有する物質である。たとえば methyl (tetra-O-trimethylsilyl) α -D-glucopyranoside の沸点は $109^{\circ}\sim 110^{\circ}/0.1\text{mmHg}$ と測定されているし、また同じく methyl (tetra-O-trimethylsilyl) β -D-glucopyranoside のそれは $118\sim 120^{\circ}/0.2\text{mmHg}$ と測定されている。そしてこれらの物質はガスクロマトグラフィーの試料としてきわめて好適である。

図 2 ガスクロマトグラフィーによる糖分析例

図 2-1 ジフテリア菌体の糖

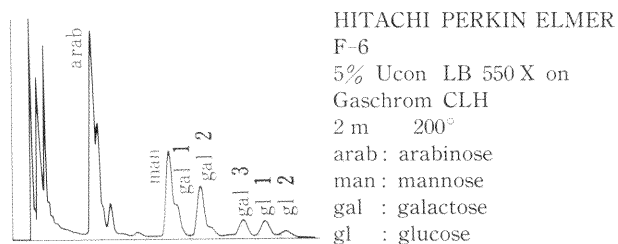


図 2-2 マウス腎の糖

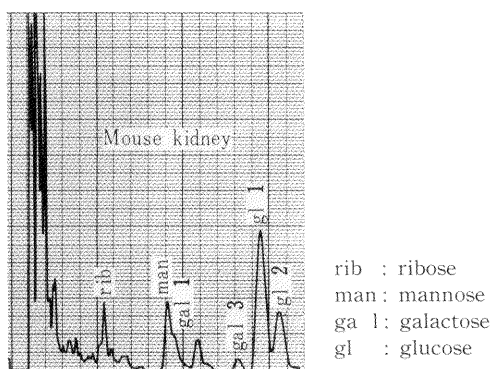


図 1 にいくつかの中性糖のメチルトリメチルシリル誘導体のクロマトグラムを示す。使用機器は日立 F-6 形昇温ガスクロマトグラフで、200℃ の恒温使用をおこなっている。カラムは 3φ×2 m, UCON LB 550 X (Applied Science Co. Ltd.) を 5% の割合で Gaschrom CLH または Microsorb W に coating し、充填したものを用いる。検知器は FID。

このクロマトグラムを見てもわかるように、それぞれの中性糖はそれぞれ独特のパターンを示し、その保持時間とともに同定のきわめて有力な手がかりになる。

このように、一種類の糖から多数のピークが得られるが、これは前記のごとく封管 100°, 3 時間という条件のメタノリシスで作られた、α, β アノマー、それぞれのフラノース、ピラノース、更に C1, 1C のコンフォメーションの違いが、あるいは独立のピークとして、また或るものは互に重なり合って分離せずに現われる。しかしこの全体のパターンはメタノリシスの条件が同じである限り、完全に再現性がある。

現在単糖類の同定には、主としてペーパークロマトグラフィーが用いられているが、ガスクロマトグラフィーをこれと比較するといくつかのすぐれた点をあげることができる。すなわちペーパー上のスポットの RF に比べると、ガスクロマトグラフィーの保持時間ははるかに精度よく測定でき、その独特のパターンをあわせて考えると、同定能はよりすぐれている。また双方の試料の調製の時間は同じ程度として、分析時間測定はガスクロマトグラフィーの方がはるかに短い。そして最大の特徴はピーク面積の測定による定量が可能という点である。

もちろん捕集して (TCD 使用) 諸種の定性反応に利用することも可能であり、これらの諸点から近い将来中性糖の同定と定量とに、ガスクロマトグラフィーがペーパークロマトグラフィーにとって代るといっても過言ではあるまい。

このような糖のトリメチルシリル誘導体としては、今まで述べてきたメチルグリコシドのトリメチルシリル誘導体以外にもいろいろ考えられる。たとえばメチルグリコシドではない全トリメチルシリル誘導体も、もちろんガスクロマトグラフィーの材料としては使用できるが、我々はこの方法はとっていない。

最後にこの方法を実際に応用した例を掲げておく。図 2-1 はジフテリア菌の菌体を構成する中性糖のクロマトグラムであり、図 2-2 はマウスの腎臓に含まれる中性糖のそれである。

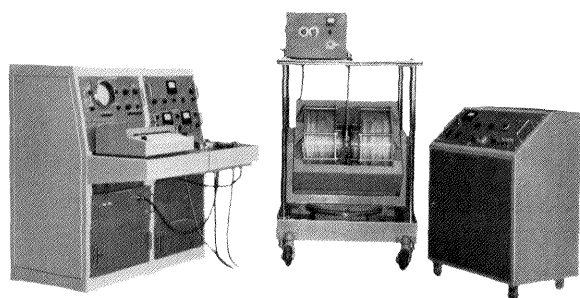
文 献

- (1) Yamakawa, T., and Ueta, N.,
Japan. J. Exp. Med., **34**, 37, (1964)
- (2) Yamakawa, T., Ueta, N., and Ishizuka, I., Japan. J. Exp. Med., **34**, 231, (1964)

悪性腫瘍の示す ESR スペクトル†

——電子スピン共鳴の生物学への応用——

坂岸良克*・岡部哲夫**



日立電子スピン共鳴分析計

腫瘍は細胞代謝において正常組織と著しく異なっており、特に悪性腫瘍は或る種の酵素活性の点で特徴がある。この事実は“ガン”の生化学的全容を明らかにする糸口の一つであるように思われる。我々は、日立電子スピン共鳴分析計を用いて、ネズミとウサギの 2, 3 の腫瘍細胞の ESR 測定に成功した。今回はそのうちのネズミの腹水癌が示す ESR スペクトルについて紹介したい。このスペクトルは、もちろん、世界で始めて得られたものであるが、それが正常細胞のミトコンドリアに NaCN 処理したものの示す ESR スペクトルときわめてよく似ていることは、細胞内の酵素活性の点から興味がある。

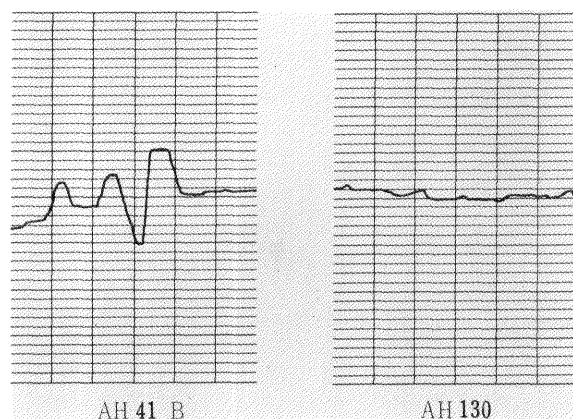
我々が腹水癌をとりあげたのは、腹水癌がその細胞代謝を正常組織と比較して解析しなければならぬ重要な腫瘍の一つであること、および、腹水癌が遊離細胞の形で得られることなどの理由による。我々は吞竜系の雄ネズミ¹⁾に腹水癌を移植し、6日後、増殖した腹水癌を集めて使用した。これらは 0.9% NaCl 溶液で 4, 5 回洗い、遠心分離機により 500 rpm, 5 min 処理を行なった。

ESR 測定の方法は前報^{2) 3)} とほぼ同じである。測定に用いたのは AH 130 と AH 41 B とであり、得られたスペクトルを第 1 図に掲げる。我々は AH 130 については特に個有な吸収は観測できなかったが、AH 41 B については、 $g=2.00$ 付近にきわめて顕著な三つの吸収信号を観測した。得られたスペクトルは試料を冷蔵庫に 2 週間保存したのちも同様に観測され、きわめて安定であることがわかった。これらの吸収は前報^{2) 3)} で述べた、正常な肝細胞のミトコンドリアに NaCN 処理を行なったものと酷似している。第 2 図はそのスペクトルであるが、ミトコンドリアの $g=2.00$ の吸収は NaCN 処理により三つの吸収に分裂したものである。

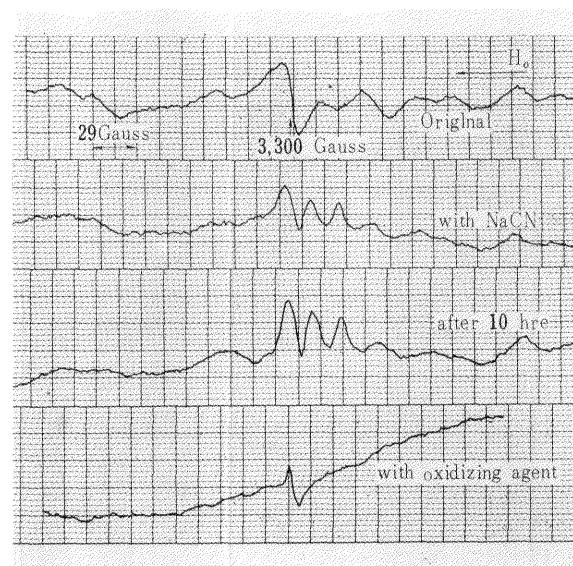
詳細についてはなお実験、検討中なので述べられないが、腹水癌の示す $g=2.00$ 付近のスペクトルはミトコンドリアに含まれる非ヘム鉄と関連があるらしい。今までに AH 41 B と AH 130 との間の酵素上の差は嫌気性解糖作用、G6PDH, ATC および OTC の活性にあることがわかっており、AH 41 B は嫌気性解糖作用、G 6 PDH および OTC の活性が AH 130 より遥かに多い。

これらの腫瘍の化学的および酵素の分析は目下進行しており、追って発表されるはずである。

- 1) 財団法人 佐々木研究所
- 2) Hitachi Scientific Instrument News 7(1)257 (1964. April)
- 3) ibid. 7(4)286 (1964. August)



第 1 図 腹水癌の ESR スペクトル



第 2 図 ウサギ肝細胞ミトコンドリア ESR スペクトル

†本報告は Pittsburgh Conference (Meetings of Am. Chem. Soc, 1965) その他で発表された。

*東京医科歯科大学医学生化学教室、医博

**日立製作所那珂工場

G-3 形日立自記分光光度計用分光蛍光付属装置について

大西 靖・皆川定雄・嶺岸久子

近年、蛍光スペクトルおよび励起スペクトル測定の実用性が高まり、種々なモデルの機種が市販されるようになった。これらのモデルのうち自記分光光度計 (EPS-3 形) に付属させて、蛍光・励起スペクトルを測定できる装置を開発したので、この装置の仕様および性能について報告する。

装 置

自記分光光度計に分光蛍光付属装置を設置した概略図を図 1 に示す。またこのときの写真も 図-2 に示す。光源には紫外域から可視域まで連続光を出すキセノン灯 (150W) を用いた。この光をミラー (M₁) によって G-3 形モノクロメータに導き、グレイティングによって分光し、任意の波長の光を蛍光試料に照射するようにした。蛍光の検出感度を向上させるために、モノクロメータは F 値を 4 にし明かるいものにした。そして色収差を少なくするためツェルニーター形にした。この他励起波長は 260~360 m μ の間がもっとも使用ひん度が高いためにグレイティングのブレイズ波長を 300 m μ にした。また、スリットも 0.2~5 mm (2~40 m μ) まで可変できる構造にし、微弱な蛍光および正しい励起スペクトルを測定できるようにした。試料から出る蛍光はレンズ (L₅) によって EPS-3 形モノクロメータのスリットに結像させた。蛍光スペクトルはこのモノクロメータによって分光し、光電子増倍管によって検知、記録した。

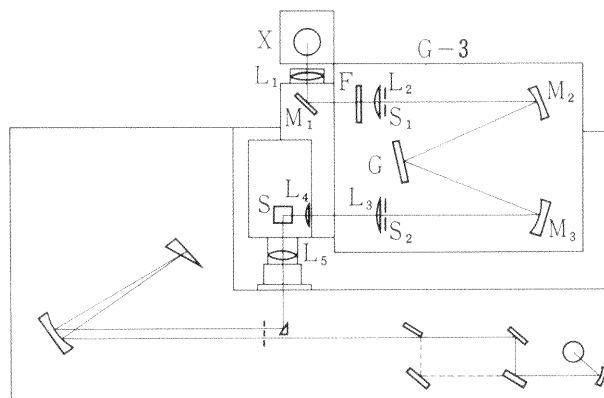
測定結果

本装置でもって測定した Anthracene, Naphthalene, Chrysene, Kynurenine acid, Tryptophane, Cinchonidine, Serotonin および Pterin の蛍光スペクトルを図-3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 に示す。これらの濃度は比較的高いので、蛍光強度が大きい。このためセルおよび溶媒の不純物の蛍光はあまり顕著には現われなかった。低濃度の Anthracene の蛍光スペクトルは 340 m μ 付近に出るセルおよび溶媒の不純物の蛍光に重さなって測定された。Folic acid の低濃度における蛍光スペクトルを図-11 に示す。この図から Folic acid の検出限界は S/N=2 として 0.01 ppm であることがわかった。このようにして著者らが求めた検出感度を表-1 に示す。

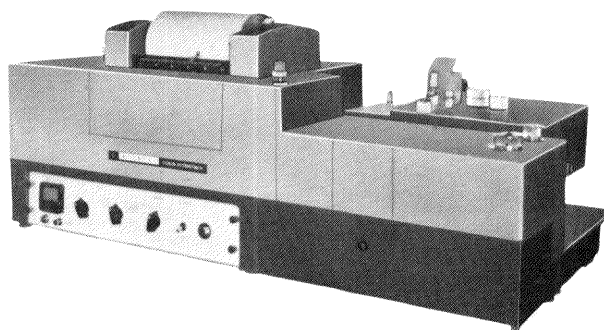
以上の測定結果から本装置は、セルおよび溶媒の不純物の蛍光に比べて試料の蛍光が特に微弱な場合には検出できないが、普通の溶媒にとかした試料の蛍光は十分検出されることがわかった。

検 定 限 界

Anthracene 0.006 ppm



第 1 図 分光蛍光光度計光学系仕様



第 2 図 G-3 形日立自記分光光度計

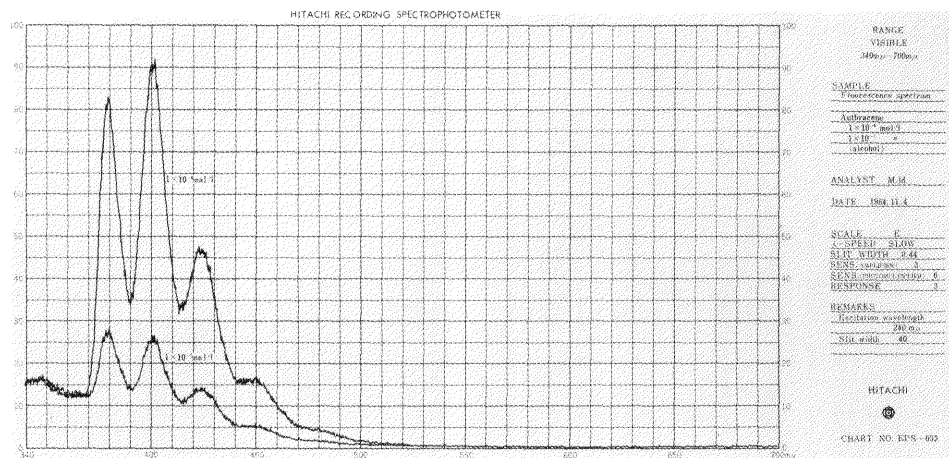
Folic acid	0.01 ppm
Indole	0.03 ppm
Azaquanine	0.1
Tryptophane	0.1

この検出限界は各機種による機差は考慮していない。

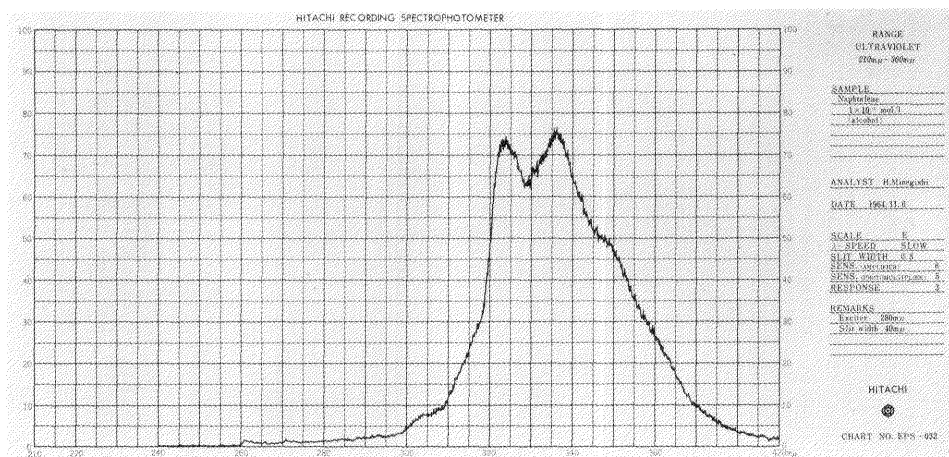
仕 様

光 源	150 W キセノンランプ
分 光 器	波 長 範 囲 250~650 m μ 分散、回析格子 600 G/mm 3,000 Blage 波 長 精 度 ± 2 m μ 分 散 能 7.5 m μ /mm ス リ ッ ト 0.2~5 mm 可変両開き、 高さ 20 mm 分 光 方 式 ツェルニーター形 コリメータ焦点距離 210 F. 4
試 料 室	レボルバー方式、蛍光セル 4 個装着可能
消費電力	100 V, 400 W (ただし EPS-3 を除く)

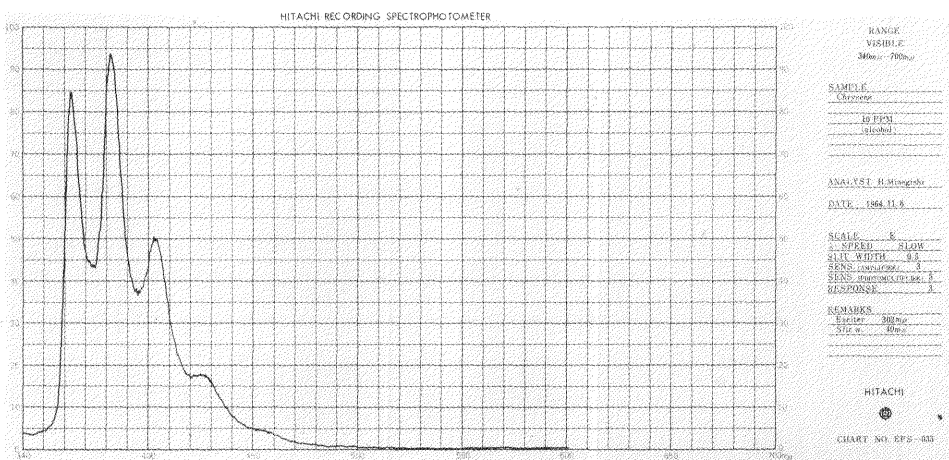
第 3 図



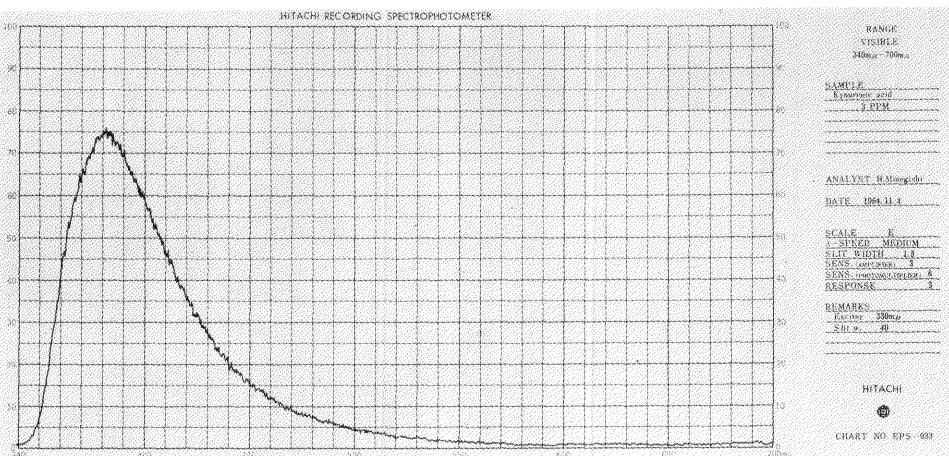
第 4 図

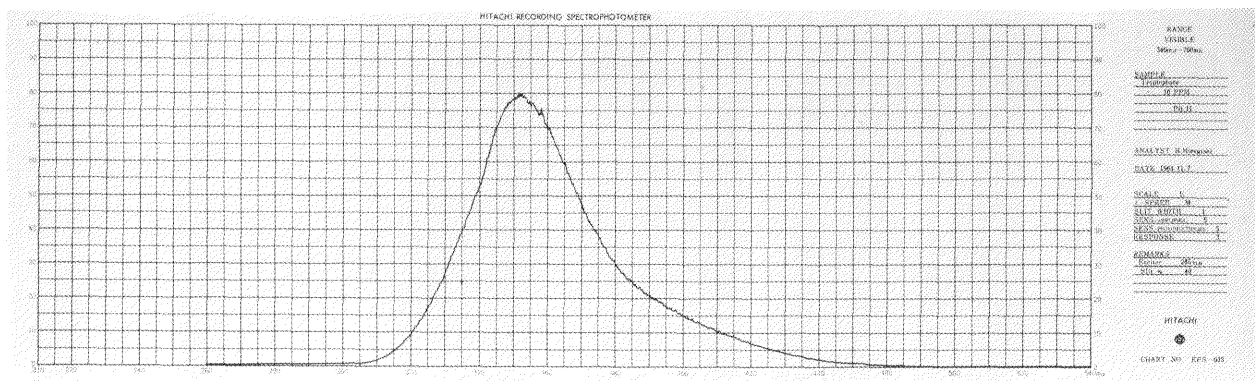


第 5 図

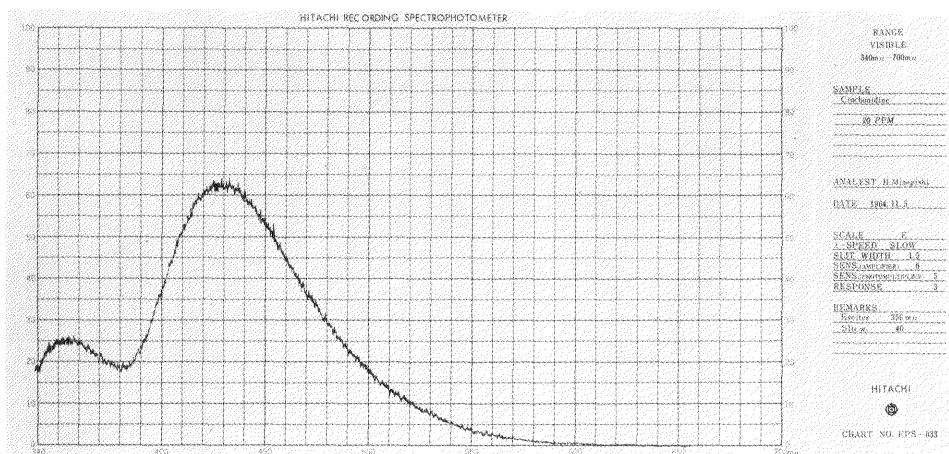


第 6 図

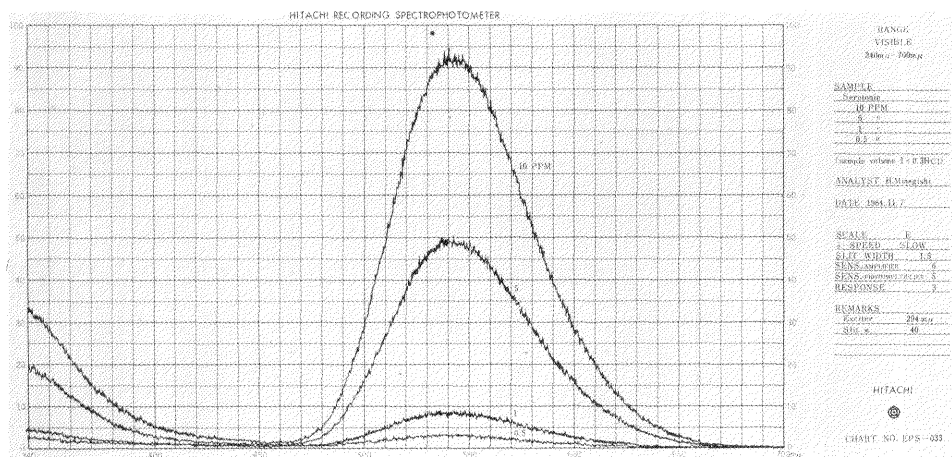




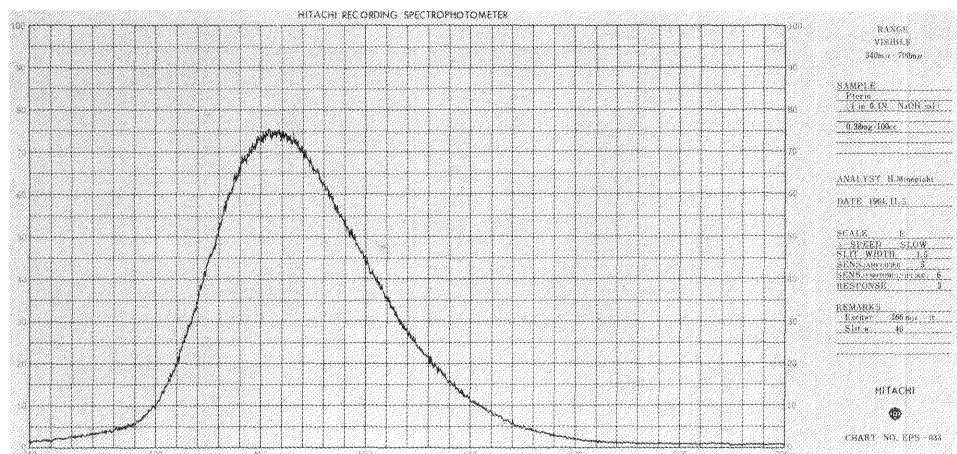
第 7 図



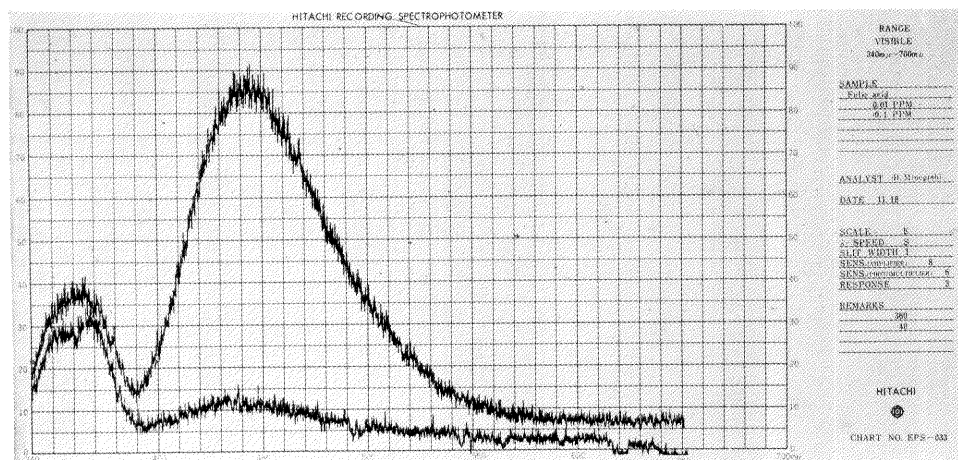
第 8 図



第 9 図



第 10 図



第 11 図

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 8 No. 3

昭和 40 年 5 月 20 日印刷

昭和 40 年 6 月 1 日発行

非 売 品

年 6 回偶数月発行

編集人 藤 森 慶 一

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