

THE HITACHI Scientific Instrument NEWS

August, 1965 Vol. 8. No. 4.

 Hitachi, Ltd.

目 次

1. 遠赤外分光の物性物理学への二、三の応用……………白鳥紀一…………… 1
2. リンゴの香気成分の分離と同定 ——日立昇温ガスクロマトグラフの利用——
……………片山 脩…………… 4
3. 糖質のガスクロマトグラフィー (II) ……………山川民夫・植田伸夫…………… 6
4. 自動液体クロマトグラフィーによる核酸構成成分の迅速分離定量
……………高林 昇・伊藤照弥…………… 8

遠赤外分光の物性物理学への二、三の応用

白鳥紀一*

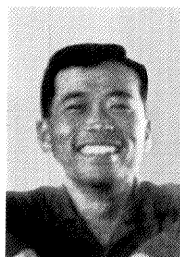
1. はじめに

たいへん大きな題目をかかげたが、物性物理学全般についての解説をかくのは、もちろん筆者にできることではない。それは他の文献^{1), 2)}を参照していただくことにして、ここでは日立 FIS-21形遠赤外分光光度計を用いて実際に測定を行なった例を、2, 3あげる。したがって話題は筆者が興味をもつ絶縁性磁性体に限られる。

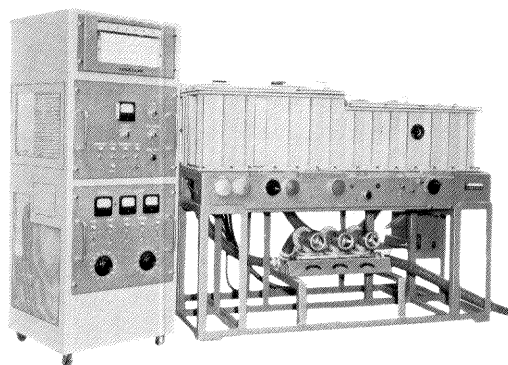
FIS-21形のカバーする範囲は $10 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ であるが、このエネルギー領域でおこる物理現象は、大雑把に言って直接間接に原子の運動に関係するものと、電子の磁気的な相互作用に関係するものである。電子の静電的相互作用（クーロン力）に関係した現象は、少数の例外を除き、もっと高いエネルギー領域（もっと短い波長範囲）でおこる。

FIS-21形は、数百マイクロン以上の長い波長領域をカバーするために、単光束方式を採用している。そのために試料をいれたと

*東京大学物性研究所



白鳥紀一



第1図 FIS-21形遠赤外分光々度計外観

きといれないときの分光光度を別々に測って比較しなければなら
ない。試料のないときも分光光度は複雑な変化をするので、特に
問題とする吸収線の幅が広いときは注意しなければならない。こ
の比較のプロセスはかなりの労力を必要とするが、反面試料をい
れたときのスリット幅や増幅度を独立に設定でき、また半対数方
眼紙を用いて吸収係数のグラフを直接かくことができる。

第1図に FIS-21 形遠赤外分光光度計の外観を示す。

2. 結晶の格子振動による吸収

絶縁体結晶の格子振動による吸収は、結晶を構成する原子が重
い場合や結晶構造が複雑な場合は、かなり長い波長領域に出現す
る。第2図にスピネル形の MnCr_2O_4 、 NiCr_2O_4 の結果を示す。こ
のグラフのうち 20μ 以下の短波長領域は日立赤外分光計 EPI-2
形 (KBr プリズム)、それ以上の長波長領域は FIS-21 形を使用
した。一般にこのような複雑な構造の物質については、振動数を
解析して各ピークと格子振動モードとを対応させ、原子間力につ
いての定量的な知見をうるようなことは行なわれていないことが
多い。

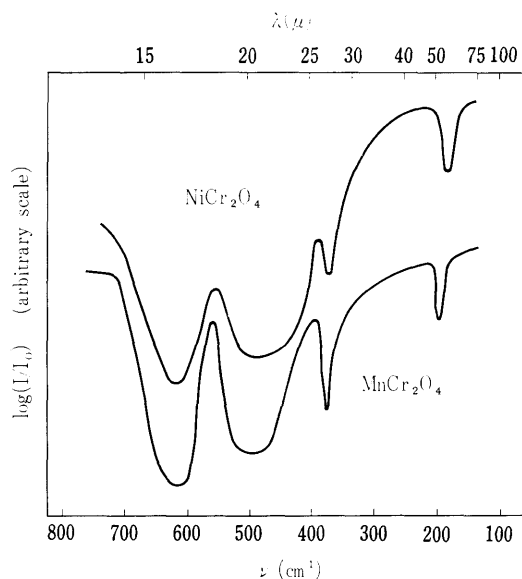
スピネル形酸化物は普通立方晶系であるが、なかには正方晶系
に歪んでいるものがある。実は第2図に示した NiCr_2O_4 も室温
では正方晶であるが、その歪みが小さい (室温で $c/a=1.02$) た
めに、吸収線の幅が広いだけで立方晶の MnCr_2O_4 と見かけ上かわ
らない。しかしこの歪みが大きいときには吸収の様子は変わって
くる。第3図に CuCr_2O_4 ($c/a=0.91$) と ZnMn_2O_4 ($c/a=1.14$) の結
果を示す。このグラフは立方晶のときに1本だった吸収が強度比
1:2の2本にわかれてることを示しているが、それと同時に立
方晶ではみられない弱い吸収が新しく現れることを示している。

物理学的な議論のためには広い温度範囲 (絶対零度から数百度
まで) にわたって測定をおこなう必要がある。われわれは現在
 $100\sim 400^\circ\text{K}$ での測定に成功している。第4図に NiCr_2O_4 、 MnCr_2O_4
の 200 cm^{-1} 付近の吸収の位置の温度変化を示す。 NiCr_2O_4 では
立方晶 $\rightarrow$ 正方晶の相変態 (変態温度 310°K) に対応して特長な
変化がみられる。

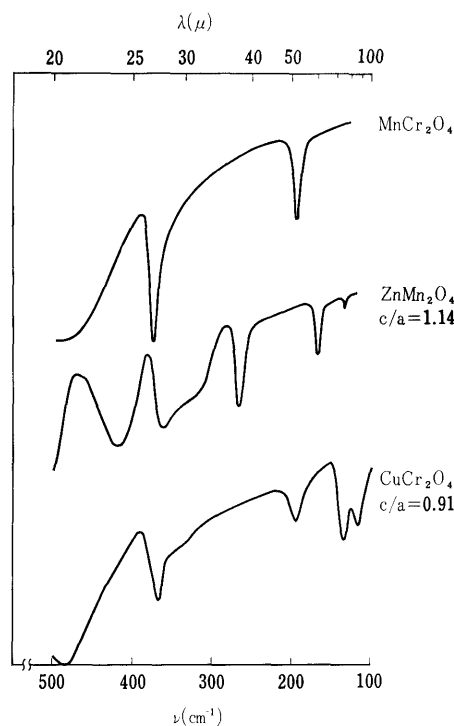
結晶の格子振動に関係した話題のうち、チタン酸バリウム系強
誘電体の誘電異常に関係した問題や、超電導体のエネルギーギャ
ップの問題では、更に波長の長い領域で測定を行なう必要がある。
詳細は文献²⁾を参照していただきたい。

3. 強、反強磁性体の磁気吸収

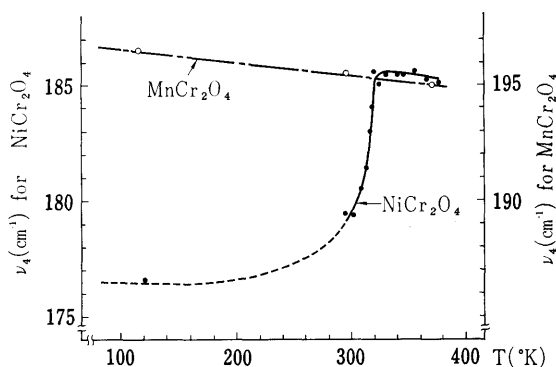
遠赤外領域の反強磁性共鳴は、最初大阪大学の吉永研究室の装
置を用いて、近藤久元氏³⁾によって測定された。その測定は NiO に
ついて 100°K 以上ネール点以下の温度範囲で行なわれた。その後
多くの反強磁性体、フェリ磁性体の磁気吸収が主としてアメリカ
で観測されている。われわれも最近各種のフェライト (MFe_2O_4)
クロマイト (MCr_2O_4) について測定を行ない、いくつかの弱い
吸収をみだしている。しかしその吸収が磁気的なものかどうか
はまだはっきりしていない。



第2図 MnCr_2O_4 と NiCr_2O_4 の遠赤外吸収



第3図 ZnMn_2O_4 と CuCr_2O_4 の遠赤外吸収

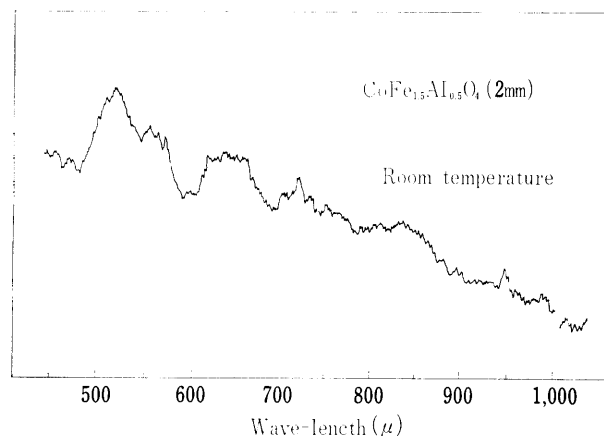


第4図 NiCr_2O_4 の 200 cm^{-1} 近辺の吸収波数の温度変化

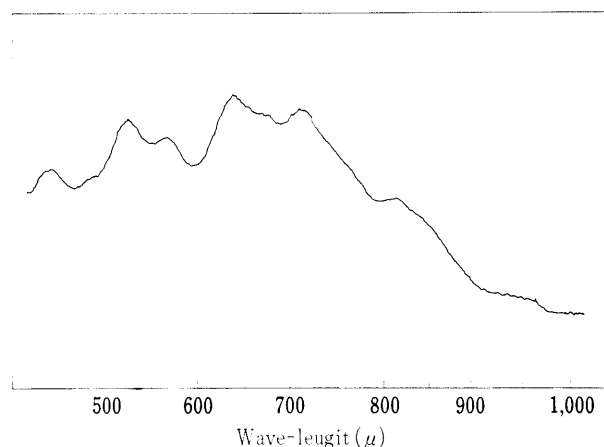
第5図以下に実例を示す。第5図には試料 ($\text{CoFe}_{1.5}\text{Al}_{0.5}\text{O}_4$) を挿入したときとしないときのチャートとそれを比較したグラフをのせてある。これらのうち MnCr_2O_4 (第6図) の吸収は、この物質のキュリ温度が約 50°K であることから考えて、磁気的なものではないと思われるが、原因は現在のところわかっていない。 $\text{CoFe}_{1.5}\text{Al}_{0.5}\text{O}_4$ (第5図) の吸収も、温度による吸収線の位置の移動がはっきりしないので、同定はできていない。 CoFe_2O_4 (第7

図) の吸収は、この物質の強い磁気異方性による吸収ではないかと思われる。

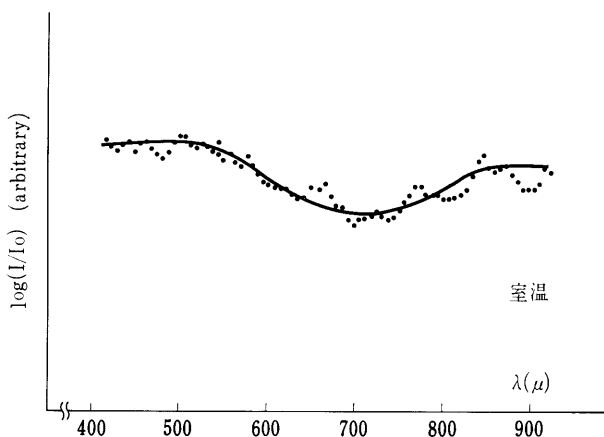
いずれにしても、遠赤外領域の磁気吸収は、この波長領域での実験がいままであまり行なわれていなかっただけに、磁性体についての有用な新しい情報をもたらすのであるが、格子振動などに比べて吸収強度が格段に弱いために、実験ははるかにやりにくい。



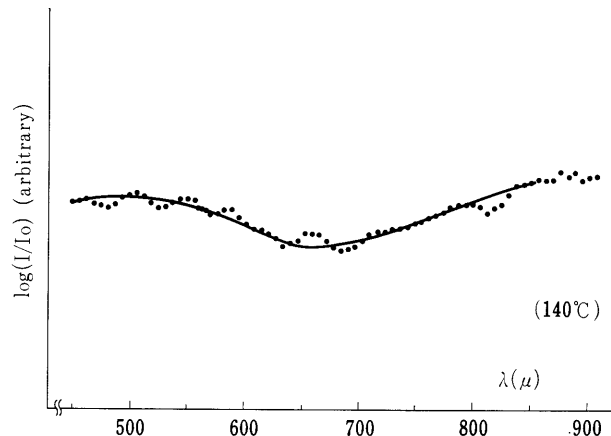
第5図 (a) $\text{CoFe}_{1.5}\text{Al}_{0.5}\text{O}_4$ を入れた時の分光感度



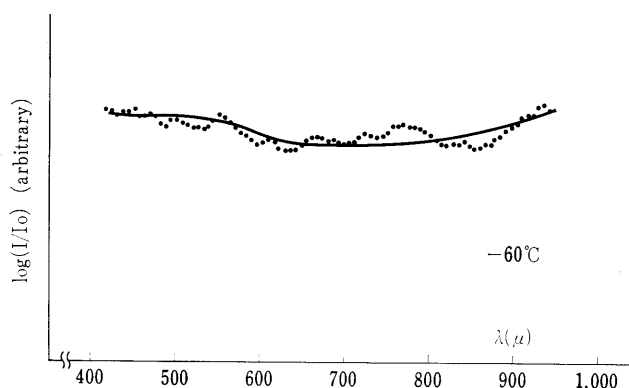
第5図 (b) FIS-21 形分光計の分光感度



第5図 (c) $\text{CoFe}_{1.5}\text{Al}_{0.5}\text{O}_4$ の遠赤外吸収



第6図 MnCr_2O_4 の遠赤外吸収



第7図 CoFe_2O_4 の遠赤外吸収

4. 文 献

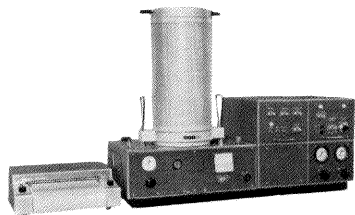
- 1) 吉 永 弘他:「赤外線吸収スペクトル, 理論と応用」
第11集 P.1~66 (1960) 南江堂

- 2) 物性 5, No. 9 (1964)
- 3) H. Kondoh: J. Phys. Soc. Japan, 15, 1970 (1960)

リンゴの香気成分の分離と同定

—日立昇温ガスクロマトグラフ装置の利用—

片山 脩*



F-6形 日立昇温ガスクロマトグラフ



片山 脩

はじめに

果実の新鮮な香りは、色や歯切れなどとともに食品としての生命である。昔からこの香りの成分の本体が何であるかについて、多くの研究者が興味をもち研究を重ねてきた。香りの成分が明らかにされれば貯蔵や加工などによる香りの変化を防ぎ、また天然そのままの香料の製造も可能となるからである。

しかし天然の香りの成分は非常に微量なものが多く、しかも複雑な構成をしているので、過去においてはその分析が難しく、色の問題などにくらべてはるかに遅れてしまった。ところが1950年頃から James, Martin などの研究者の努力によって、ガスクロマトグラフィーによる微量揮発成分の分離法が急速に進歩し、香り成分の研究の前途にも光明が与えられた。1960年代になってますますガスクロマトグラフ装置の性能は高められ、固定相物質の開発と一しょに、極微量 (10^{-16} モル) の成分の検出まで可能となった。

現在各種の食品の揮発成分の分離、同定がガスクロマトグラフィーを使ってさかんに行なわれている。われわれの研究室においても果実や野菜の揮発成分の研究を進めつつあるが、昨年までは日立の KGL-2 形のガスクロマトグラフ装置を使っていた。この機械は熱伝導形の検出器をもち、安定性がよく、使いやすいが、香り成分のように微量で、組成成分の量に非常なアンバランスがあり、試料中にかなり多量の水分を含むような場合は微量成分の検出が困難である。そこで感度の高い、分離能のすぐれた装置として選ばれたのが次のべる日立の F 6 形装置である。

装 置

昨年11月から F 6 形日立昇温ガスクロマトグラフ装置を使っているが、いままでの経験から気付いたことをあげると、

1) 感度が非常によく、後にのべるような蒸溜凝縮物でも $1\mu\text{l}$ あるいはそれ以下の試料でほとんどの成分が検出される。

2) 水素焰検出器をもつので、水の多い試料の分離でも水の影響を受けない。われわれの行なっているような水を除き難い試料を用いる場合は大変都合がよい。

3) 昇温法で分析するとき、分析終了時の高い恒温槽温度を、出発温度へ下げるのに要する時間が短かい、(10~15分) ので実験能率が高い。

4) 付属する QPD₃₃ 形の日立卓上記録計の感度も高く、 $1\mu\text{V}$ の変化に応答する。このことはガスクロマトグラフィーの性能を一そう高めているようである。

5) 欲をいえば、高感度で使用する場合、機械の安定にかなり長時間を要するので、これがもう少し短縮できたら、と思う。

カラムの選定

ガスクロマトグラフィーでは、カラムの選定と作製を適切に行なうことが実験成功への鍵であることはいうまでもない。

果実の揮発成分の多くは、比較的低沸点のアルデヒド、カルボニール、アルコール、エステル、炭化水素であるが、これらすべてを同一のカラムで、同時に分離することは無理なようで、少なくとも2、3種類の充填剤を用いる必要がある。われわれはおもに①カーボワックス (ポリエチレングリコール) 1500、②ジエチレングリコールサクシネート、③テトラエチレングリコールメチルエーテルの3種を使っている。なかでもカーボワックス 1500は、全体のピークの概略をみるのに適しており、これでまず全体を観察し、その後②および③を使って部分的な検討を行なうことにしている。ここではカーボワックス 1500 を用いたときの結果である。カラム充填剤の詳細は第1表に示した。

分析条件

詳細は第1表のとおりであるが、昇温の場合は 50°C から 150°C まで $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (昇温速度) でもっともよい結果を得た。出発温度はいろいろ変えたが、 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ がよく、昇温速度も $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ がピークの分離とシャープさから最適と思われる。定温で分離するときは $80\sim 100^{\circ}\text{C}$ が適当であった。

第1表 カラムおよび運転条件

第2図

試料 ドライアイストラップ凝縮物
(リンゴ揮発成分)

カラム

固 定 相 Carbowax 1500
担 体 Chromosorb P
粒 度 $80\sim 100\text{ mesh}$
固定相含浸率 20%
径 × 長さ $3\text{ mm} \times 2\text{ m}$

カラム温度 100°C

気化室温度 220°C

検出器入口温度 250°C

キャリアーガス N_2

同 流 量 30 ml/min

同 導 入 圧 1.0 kg/cm^2

検出器空気導入圧 1.0 kg/cm^2

同 水 素 導 入 圧 0.8 kg/cm^2

attenuation(入力) 1

同 (出力) 1

チャートスピード 10 mm/min

第3図

試料 ドライアイストラップ凝縮物
(リンゴ揮発成分)

カラム

固 定 相 Carbowax 1500
担 体 Chromosorb P
粒 度 $80\sim 100\text{ mesh}$
固定相含浸率 20%
径 × 長さ $3\text{ mm} \times 2\text{ m}$

カラム温度 $50\sim 150^{\circ}\text{C}$

温度上昇率 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$

気化室温度 220°C

検出器入口温度 250°C

キャリアーガス N_2

同 流 量 30 ml/min

同 導 入 圧 1.0 kg/cm^2

検出器空気導入圧 1.0 kg/cm^2

同 水 素 導 入 圧 0.8 kg/cm^2

attenuation(入力) 1

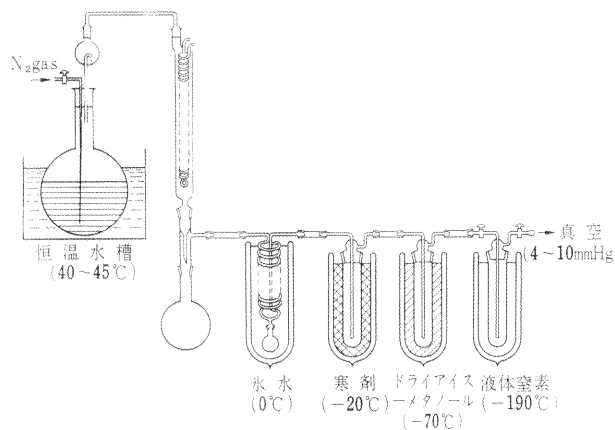
同 (出力) 3

チャートスピード 10 mm/min

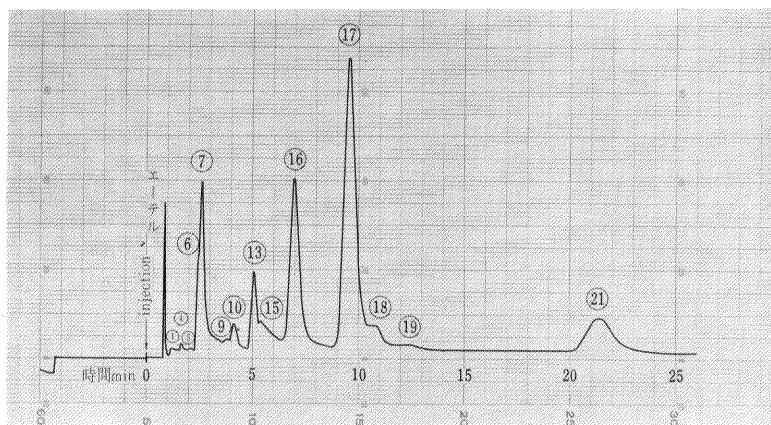
*農林省食糧研究所

試料の調整

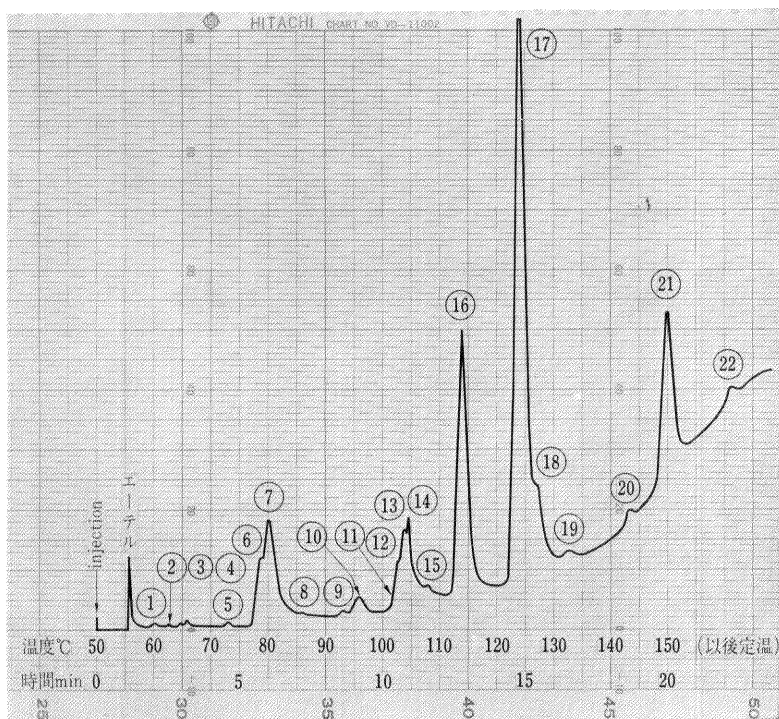
果実の揮発成分は微量であり、変化しやすいので抽出法が常に問題となる。過度の加熱、振とうなどの操作は避けなければならない。そこで、低温で濃縮された試料を得るために真空蒸溜法を採用した。



第1図 揮発成分回収装置



第2図 リンゴ(国光)の揮発成分のガスクロマトグラム(カラム温度 80°C, 一定), 試料注入量 0.5 μ l



第3図 リンゴ(国光)の揮発成分のガスクロマトグラム(カラム温度 50~150°C, 昇温), 試料注入量 1.0 μ l

用した。供試したリンゴは国光という品種で、わが国で生産されるリンゴのなかでもっとも量の多いものである。これを剥皮し、磨碎して果汁を絞る。果汁は第1図の装置の湯浴で40~45°Cに温められる。これに4つのコールドトラップを接続し、真空ポンプで装置内の気圧を下げ真空度を4~10 mmHgとする。また蒸発を速めるために窒素ガスを送る。こうして数時間蒸溜すると各トラップに揮発成分が凝縮する。各トラップの凝縮物を比較すると水分の量はかなり異なるが、その他の組成にはあまり差がみられない。ここではドライアイストラップ捕集の試料についての結果をのべる。なお試料はトラップ凝縮物をそのままガスクロマトグラフに注入した。

分離, 同定

まず前記の試料を80°Cの定温で分離し、そのクロマトグラムをとると第2図のように21コのピークが得られる。次に同一の試料を昇温法で分離すると、第3図のクロマトグラムが得られる。この両者を比較すると昇温法では、低沸点部の成分のピーク間隔が広がり、高沸点部のピーク間隔が狭まってくる。そのため低沸点部で重なり合っていたピーク②, ③, ⑧, ⑪, ⑫, ⑭が分かれその位置がはっきりしてくる。一方高沸点部のピークは定温ではゆるやかな傾斜であったものが、昇温になると非常にシャープに現われる。また②①, ②②のピークのように、定温ではだらだらと流出しピークをなさないものも、昇温することによって明らかなピークとなって現われる。

これでわかるように、昇温法はピークの分離をよくし、成分組成の複雑な試料の分析に適した方法といえることができる。

以上のように分離された各ピークの成分を、標準試薬を使い acetone を内部標準物として同定を行なった結果が第2表である。全成分の確認はできていないがおもな成分17種の存在が明らかにされた。同定は相対保持時間、標準試薬添加などの方法を用いた。

相対保持時間(または相対保持容量)を求めるには、定温のほうがよいと思われたが、昇温法でも条件が整えば十分行なえることがわかった。なお第2図および第3図のクロマトグラムのベースラインのことであるが、第

第2表 リンゴの揮発成分の相対保持時間

ピーク No.	成 分	80℃ 定 温		50~150℃ 昇 温	
		標 準	試 料	標 準	試 料
1	acetaldehyde	0.33	0.33	0.34	0.35
2	methyl formate	0.51	—	0.54	0.54
3	propion aldehyde	0.77	—	0.82	0.82
4	acetone	1.00	1.00	1.00	1.00
5	ethyl acetate	1.55	1.57	1.58	1.57
6	iso-propanol	2.26	2.26	2.30	2.29
7	ethanol	2.48	2.42	2.43	2.42
8	unknown	—	—	—	2.70
9	ethyl n-butyrate	4.44	4.41	3.84	3.82
10	n-propanol	4.82	4.80	4.00	3.96
11	n-butyl acetate	5.58	—	4.45	4.47
12	unknown	—	—	—	4.72
13	iso-butanol	6.36	6.38	4.72	4.77
14	unknown	—	—	—	4.86
15	iso-amyl acetate	7.20	7.21	5.40	5.35
16	n-butanol	9.57	9.55	5.84	5.81
17	iso-amyl alcohol	14.07	14.01	7.15	7.11
18	ethyl caproate	15.06	15.08	7.39	7.34
19	n-amyl alcohol	18.67	18.61	8.43	8.30
20	unknown	—	—	—	8.94
21	n-hexanol	24.42	24.39	10.15	10.13
22	unknown	—	—	—	—

2図でピーク間のベースラインがゼロになっていないのは、感度を最高(1×1)としているため極微量成分の流出が記録されているためで、最後のピークがでてから15分後に、ベースラインはゼロの位置に完全に戻る。第3図の昇温でベースラインが次第に高くなるのも、感度を非常に高くしてある(1×3)ためで、1×100の感度で濃縮度の高い試料を用いればベースラインはほとんどゼロに一致する。もちろんこうしたベースラインの問題はカラムの種類やカラムと試料の適合具合によって、それぞれ違ってくると思われる。

おわりに

まだF6形を使い始めてから日も浅く、その本当の能力を生かした成果をお伝えするまでに至っていないが、とにかくわれわれの研究はこのF6形によって大いに助けられている。近くゴーレイカラムによる昇温ガスクロも行なえることになっているので、楽しみにしている。

糖質のガスクロマトグラフィー (II)

山川民夫*・植田伸夫*



山川民夫



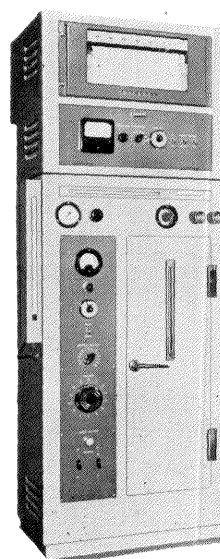
植田伸夫

前稿 (Vol. 8, No. 3) で中性糖のトリメチルシリル誘導体のガスクロマトグラフィーが、中性糖の同定、定量にきわめて有力であることを述べた。トリメチルシリル誘導体以外にメチル糖もガスクロマトグラフィーの試料として好適であり、この技法は、殊に複合糖質、少糖類、糖脂質の構造研究にきわめて有用な武器である。

2. メチル糖のガスクロマトグラフィー(1),(2)

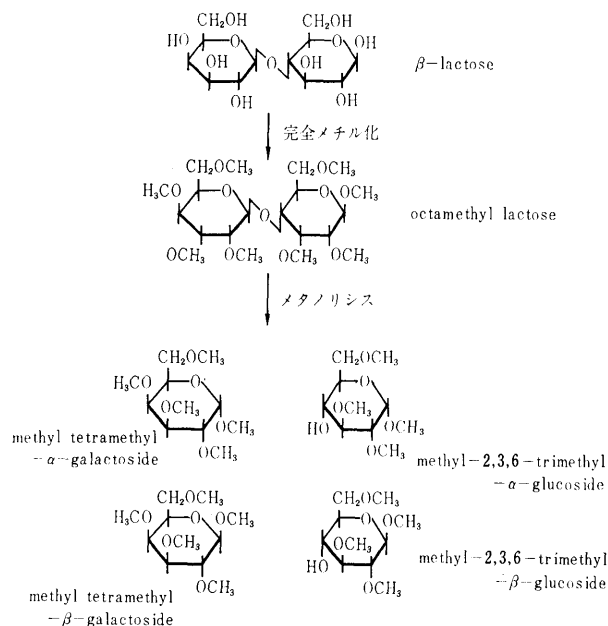
たとえばβ-乳糖はガラクトースの1位炭素とグルコースの4位炭素がグリコシド結合をした二糖類であることはよく知られているが、このものを完全メチル化して、糖の-OH基を-OCH₃に置き替え、これをメタノリシスすると第1図に見るように4種の異なった単糖が得られる。すなわち、完全メチル化ガラクトースのα, βのアノマーと、4位炭素だけメチル基の導入されないグルコースのα, βアノマーとである。

*東京大学伝染病研究所化学研究部



KGL-2A形
日立ガスクロマトグラフ

第1図 乳糖の完全メチル化とメタノリシス



この4種の反応産物をガスクロマトグラフィーによって分離すると第2-1図のごとく3本のピークが得られる。使用機器はHITACHI KGL-2A カラムは neopentylglycol succinate を50%の濃度で Microsorb W に coat したもので、 $4\phi \times 2\text{m}$ 。カラム温度 185°C 。検知器は FID。

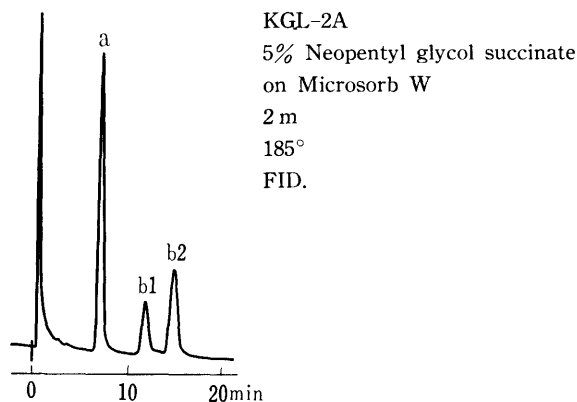
そして第2-1図からもわかるように充填カラムを用いたのでは、種々な液相、種々な運転条件を検討してみても完全メチル化ガラクトースの α 、 β アノマーを分離することはできなかったが、同じく第2-2図に見るごとく Ucon LB550X を coat した45mの Golay カラムで明確に分離することができた。そしておのこのピークが、それぞれ第1図に示した4種の物質のそれであることを、標準試料と比較し、保持時間と比較することによって確認している。なお、何種類かの液相による各種糖の各種のメチル誘導体の比保持時間が表になって記載されている。(3)

さて含糖物質の構造研究でのメチル糖のガスクロマトグラフィーの役割であるが、仮に構造未知の少糖類があったとすれば、諸種の方法によって、その物質のあらゆる-OH基を-OCH₃基に置き替える。その方法は、たとえば被験物質を、あらかじめ dimethylsulfoxide と sodium hydride を混合攪拌したものの中に入れて更に攪拌したのち methyl iodide を加えて数十分で反応を終了させ、これに水を加えてメチル糖をクロロホルムで抽出するという方法が、簡便で収量がよい。(4)

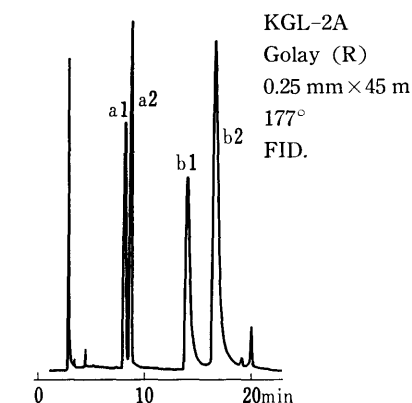
このようにして得られた未知の少糖類の完全メチル化体を3%の塩酸メタノール中でメタノリシスして、脱酸、溶媒溜去したものがガスクロマトグラフィーの試料となる。

第2図 乳糖を構成する糖のガスクロマトグラフィー

第2-1図



第2-2図



a: methyl 2, 3, 4, 6-tetramethyl galactoside, a1: β , a2: α .

b: methyl 2, 3, 6-trimethyl glucoside, b1: β , b2: α .

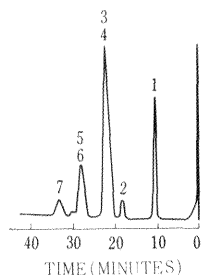
次いで前記の条件でクロマトグラフィーをおこない、得られたピークを同定する。このようにしてメチル基の導入されていない-OHの位置を確認できれば、その位置で他の糖または他の官能基と結合していたことになるから、全体の構造を推定確認できることになる。

この方法を用いて山川らは従来信ぜられていた脳のセレブロンD硫酸の構造式が誤りであることを発見、正しい構造式を決めることができた。(5)

このように単糖の完全メチル化体、部分的メチル化体のクロマトグラフィーが構造研究にきわめて有用である一方、二糖類、三糖類のメチル化体のガスクロマトグラフィーもまた可能である。それぞれのクロマトグラムを引用しておく。(第3-1図および第3-2図) この領域は昇温ガスクロマトグラフィーの活躍する領域となるであろう。

第3図 オリゴ糖のガスクロマトグラフィー

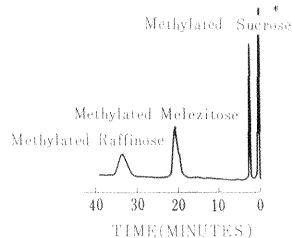
第3-1図



完全メチル化2糖類のガスクロマトグラフィー

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| (1) Sucrose | (7) Maltose |
| (2) Cellobiose | カラム 5% Neopentyl glycol succinate |
| (3) (4) Cellobiose and Melibiose | 226° 10 ft |
| (5) (6) Melibiose and Maltose | キャリアガス He 23 ml/min |

第3-2図



完全メチル化3糖類のガスクロマトグラフィー

- | |
|-----------------------------------|
| カラム 5% Neopentyl glycol succinate |
| 236° 10 ft |
| キャリアガス He 23 ml/min |
| *Sucrose が standard として入れてある。 |

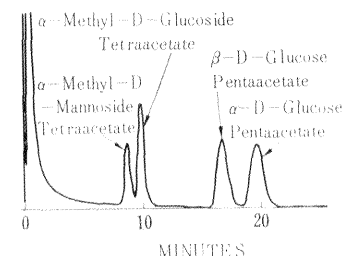
Gee, M., and Walker, H. G. : Aual Chem., 34 : 650, (1962) より引用

3. その他の糖誘導体のガスクロマトグラフィー

たとえば、糖のアセチル誘導体、アンヒドロ糖、アセタール、ケタール化合物などいずれも糖の活性 -OH 基が不活化されることによってガスクロマトグラフィーの試料たり得るものである。

第4図にアセチル誘導体のクロマトグラムを引用する。

第4図 アセチル化糖のガスクロマトグラフィー



- | |
|---------------------------|
| カラム 1% QF-1 on Gaschrom P |
| 170° 6 ft |
| キャリアガス 40 ml/min |

Van den Heuvel, W. J. A. and Hornig, E. C. : Biochem Biophys, Res. Comm., 4 : 399, (1961) より引用

以上のように糖質をガスクロマトグラフィーで分析する際には、いろいろな形の誘導体が可能なわけであるが、トリメチルシリル糖の特長は、その調製が非常に簡便、容易である反面、かなり弱い化合物であり、たとえば水分の存在下に加熱すると簡単に分解してしまうので、トリメチルシリル誘導体に更に化学的操作を加えることは事実上不可能である。ために、化学反応の結果生じた諸種単糖の定性、定量に至便であり、一方メチル糖はかなりがんじょうな化合物が、一旦メチル糖に誘導したあと更に化学操作を加えることが可能であり、含糖物質の化学構造研究にきわめて有力な知見を呈出するが、メチル化の際に多少の経験が必要ということもある。アセチル誘導体以下も、それぞれの化学的特長によって、適宜使い分けられるべきであろう。

文 献

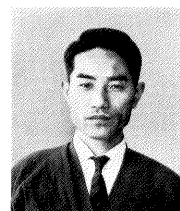
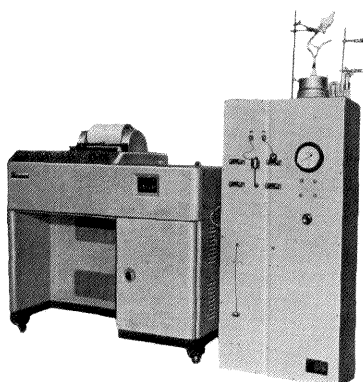
- (1) 山川民夫, 植田伸夫, 日本臨床 22巻 474頁 1964年
- (2) YAMAKAWA, T., and UETA, N., Japan. J. Exp. Med., 34. 37 (1964)
- (3) ASPINALL, G. O., J. Chem. Soc., 1676 (1963)
- (4) HAKOMORI, S. : J. Biochem., 55 205 (1964)
- (5) YAMAKAWA, T., KISO, N., HANDA, S., MAKITA, A., and YOKOYAMA, S., J. Biochem., 52 226 (1962)

自動液体クロマトグラフィーによる核酸構成成分の迅速分離定量

高 林 昇*・伊藤照弥*

核酸構成成分を液体クロマトグラフィーで分離定量する試みは初め Cohn ら¹⁾により開発され、Potter ら²⁾、大沢ら³⁾により改良されたが、自動測定装置化したのは Wade⁴⁾、Andersonら⁵⁾に負うところが多い。Anderson らは Dowex-I-x8 酢酸形のカラムに微量定量送液ポンプと紫外外部検出器を連結した装置を用いて、塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの混合試料の分離を行ない、イオン交換樹脂に対する無極性的な親和力を弱めるため温度を上げて分析の迅速化をはかっている。

*富山大学薬学部薬品分析化学講座



高 林 昇
(富山大学薬学部)

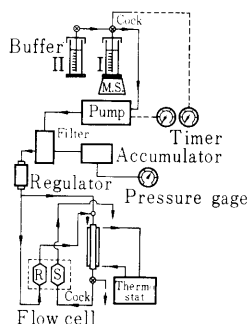
EPS-2U 形日立自記分光光度計に装着した
NA-S 形日立ヌクレオチッド分析計

筆者らは1963年以降 EPS-2U 形日立自記分光光度計付属 NA-S スクレオチド分析計を用いて、RNA の塩基とモノスクレオチド類について、迅速分離定量を試み、良好な結果を得たので簡単に記す。

実験の部

1. 塩基の分離定量

1. 試料および試薬、樹脂 試料塩基は市販品を精製。 NH_4OH は 1 級試薬、 NH_4Cl は特級試薬。樹脂は Dowex-I-x8 Cl^- 形、200~400 mesh。

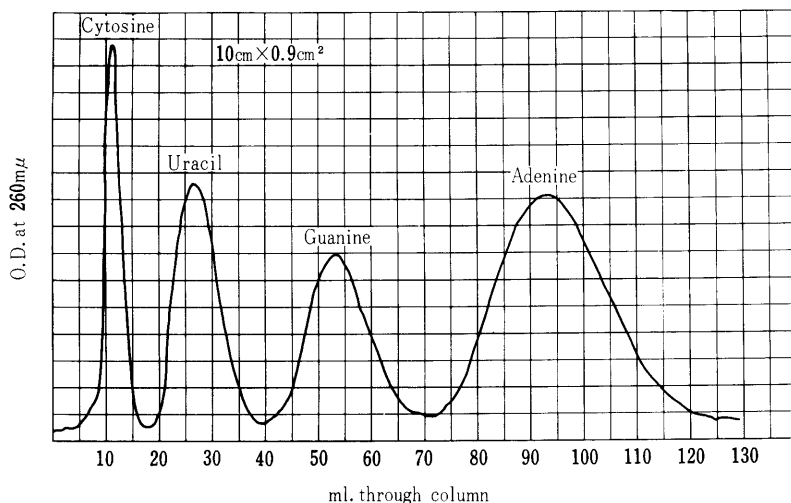


第 1 図 日立核酸分析計流路略図
Pump: double action pump 15~120 ml/hr.
Flow cell: R: reference
S: sample

2. 装置と定量法 日立スクレオチド分析計 NA-S 形を EPS-2U 形日立自記分光光度計に連結し、 $260\text{ m}\mu$ で吸光度を測定。カラムは $10\text{ cm} \times 0.9\text{ cm}^2$ を使用。フローセルは渦流のないよう工夫されている。(第 1 図参照)

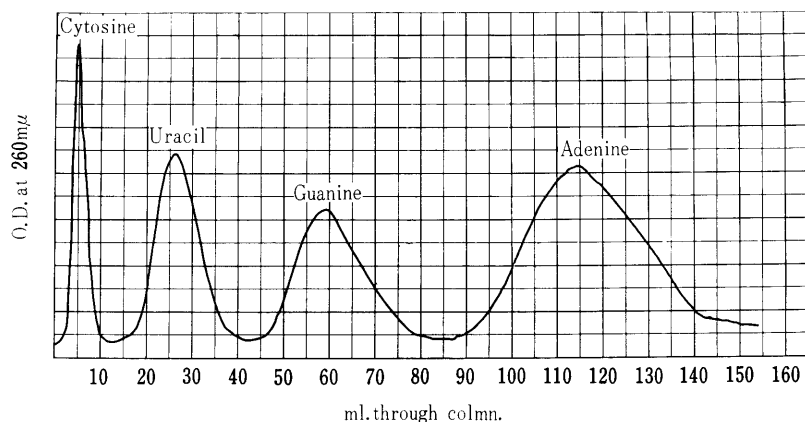
3. 相対溶離係数と pH 並びに拮抗イオン濃度との関係 溶離液として $\text{NH}_4\text{OH}-\text{NH}_4\text{Cl}$ の緩衝液を用い、pH 9.0~11.0 の範囲で相対溶離係数の変化を検討し、従来の拮抗イオン濃度の約 10 倍に高めた場合に相対溶離係数が著しく小さくなったが、pH の変化による相対溶離係数の変化もかなり大きく、pH が高くなると大きくなりしたがって溶出量も多くなった。なお、相対溶離係数は各塩基のピークの出現した溶出量からシトシンのピークまでの溶出量を差引いたものをグアニンのピークまでの溶出量で割った値とした。

4. クロマトグラム pH 9.0~10.5 の範囲で各種拮抗イオン濃度におけるクロマトグラムを検討し、pH 9.0, 拮抗イオン NH_4Cl の濃度 0.3 M において分離はきわめて良好で、分析所要時間は 5 時間であった。第 2 図その 1 およびその 2 にクロマトグラムを示す。



第 2 図 その 1

Separation of various bases by Dowex-I-x8 Chloride system pH 9.50 Buffer (Eluent)
 $0.2\text{ M NH}_4\text{OH}-0.3\text{ M NH}_4\text{Cl}$ (300:120) continuous gradient system.



第 2 図 その 2

Separation of various bases by Dowex-I-x8 Chloride system. pH 10.0 Buffer (Eluent)
 $0.2\text{ M NH}_4\text{OH}-0.3\text{ M NH}_4\text{Cl}$. continuous gradient system. $10\text{ cm} \times 0.9\text{ cm}^2$.

各塩基の溶出量の全溶出液量に対する比は第1表に示すように、溶出液量が0.025 M NH₄Cl 使用の場合 750 ml であり 0.3 M NH₄Cl 使用の場合に 160 ml となったにもかかわらず、余り大きい変動がみられない。

第1表 全溶出液量に対する各塩基の溶出量の比

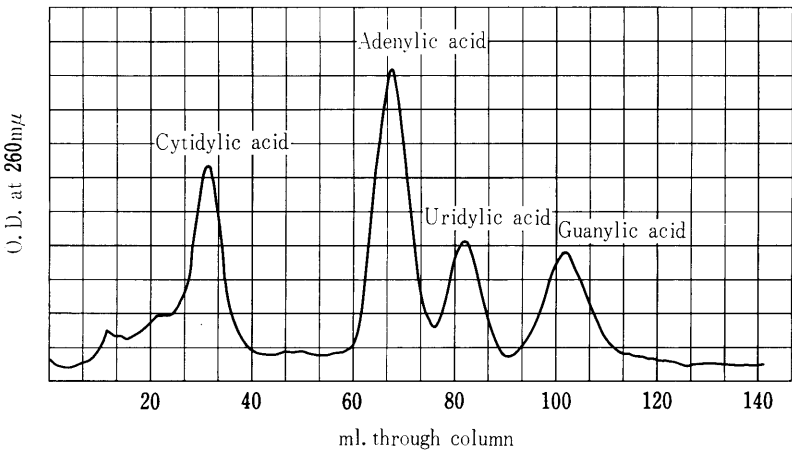
溶 離 液	0.2MNH ₄ OH-0.025MNH ₄ Cl (全溶出量 750 ml)	0.2MNH ₄ OH-0.3MNH ₄ Cl (全溶出量 160 ml)
塩 基		
Cytosine	0.057	0.078
Uracil	0.114	0.178
Guanine	0.233	0.241
Adenine	0.200	0.462

II ヌクレオチドの分離

1. 試料および試薬、樹脂 市販酵母 RNA 5mg を 0.5N KOH で25℃において20時間加水分解後、10% HClO₄ で中和しガラスフィルターで濾過。濾液を Potter ら²⁾の方法により Dowex-I-x8 蟻酸形カラムで分画。各分画を室温、減圧濃縮、エーテル洗浄して精製。99~100% HCOOH 特級試薬、HCOONH₄ 1級試薬、Dowex-I-x8 CHOO⁻ 形、200~400 mesh。

2. 装置と定量法 実験 I, 塩基の分離定量と同様。

3. pH と拮抗イオン濃度 pH 3 以下ではシチジル酸が加水分解され、pH 3.0 ではウリジル酸とグアニル酸がなかなか溶出し難い。したがって pH 4~6 の範囲で HCOOH 濃度を従来の 1~4 M を 6 M までとし、これに HCOONH₄ を添加した。



第3図

Separation of nucleotide of commercial yeast RNA by Dowex-I-x8 Formate system.
10 cm×0.9 cm². continuous gradient elution.

H ₂ O	50 ml
2MHCOOH(1MHCOONH ₄)	50 ml
4MHCOOH(4MHCOONH ₄)	30 ml
6MHCOOH(6MHCOONH ₄)	50 ml

4. クロマトグラム 第3図に示す。分析所要時間6時間。

References

- 1) W. E. Cohn: "The Nucleic Acids," Vol. 1, 211~241 (1955), Acad. Press, N. Y.
- 2) T. B. Herber, H. Schmitz, A. F. Brumm, U. R. Potter: J. Biol. Chem., **209**, 23 (1954)
- 3) S. Osawa, K. Takata, Y. Hotta: Biochem. Biophys. Acta (in press)
- 4) H. E. Wade: Biochem. J., **77**, 534 (1960)
- 5) N. G. Anderson, S. F. C. Ladd: Biochem. Biophys. Acta, **55**, 275 (1962).
N. G. Anderson: Anal. Biochem., **6**, 153 (1963).

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 8 No. 4

昭和40年 7 月 20 日印刷

非 売 品

編集人 藤 森 慶 一

発行所 株式会社 日立 製作 所

昭和40年 8 月 1 日発行

年6回毎偶数月発行

発行人 白 川 義 雄

印刷所 株式会社 日立 印刷 所