

THE HITACHI Scientific Instrument NEWS

December, 1965 Vol. 8. No. 6.

 Hitachi, Ltd.

目 次

1. テルペンおよび精油化学への質量分析計の適用 林 修 一, 佐 藤 弘 1
2. α -ケト酸の酸化的脱炭酸機序に關与する2価金属イオンについて
〈原子吸光分析法による酵素蛋白結合性金属イオンの定量〉 早 川 太 郎 3
3. 日立電子顕微鏡用 HK-2B 形全方位傾斜加熱装置 斎 藤 尚 武 6

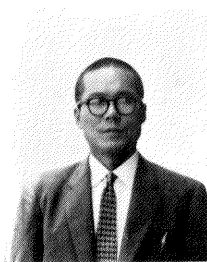
テルペンおよび精油化学への質量分析計の適用

林 修 一* 佐 藤 弘**

最近有機化合物の分析あるいは構造研究に、質量分析計が利用されるようになって、精油およびテルペン化学の分野においても、これを利用した報文が次第に見られるようになった。しかしテルペン化合物の構造と質量スペクトルとの関係を取り扱ったものとしては、McLafferty¹⁾の著書中の1章、

von Sydow らのモノテルペン炭化水素²⁾とアルコール類³⁾に關する報告、および Thomas らのモノテルペン炭化水素⁴⁾に關する報告がある程度で、その数も少なく、この点に關する研究は未だ十分とはいえない。したがって質量スペクトルの解析にあたっては、いろいろな困難に遭遇する現状である。

それにもかかわらず、微量の試料で精確な分子量が知られ、かつその化合物についての構造上の知見が得られる点で、質量分析計は他の測定機器ではとうてい置き換えられない長所をもっている。Hunter ら⁵⁾は、質量分析計のもつこのような長所に、ガ



RMU-6D形日立質量分析計

* 広島大学理学部化学 助教授 ** 日立那珂工場応用開発課

スクロマトグラフのすぐれた分離性を結合させ、毛管分離管から流出する各成分を直接質量分析計に導く方式で、ブドウ果実精油のセスキテルペンの分析に成功している。著者らも食用セリの精油、ショウノウ油中のセスキテルペン、あるいはヒノキ精油の研究などに、昨年以来質量分析計 RMU-6D を利用して、非常な便宜を得ている。

セリ精油の研究は、1964年に食用セリ 547 kg を入手して開始した。野菜ミンチで粉碎後溶媒抽出した。モノテルペン部として 24.3 g, 含酸素およびセスキテルペン部として 16.7 g を得て、8 成分を確認することができた。またショウノウ油の研究では、沸点 215°までに留出するモノテルペン部を留去した所謂赤色油と藍色油の混合物を試料に用いたのであるが、40 l の多量の方留から出発した。ショウノウ油には、セスキ炭化水素は毛管ガスクロマトグラフィーから大体 20 成分、セスキ含酸素化合物は薄層クロマトグラフィーから大体 11 成分が認められた。しかしこれらの成分は沸点その他の物理化学的性質が互に近似しているので、各成分の分離には分留、溶出クロマトグラフィーあるいは薄層クロマトグラフィーを繰返さねばならなかった。したがって、微量で分子量と構造上の知見が併せて得られる質量分析計が、非常に強力な武器となるわけである。今日までに、ショウノウ油中にセスキテルペン炭化水素を 12 種、セスキ含酸素化合物およびその類似体を 5 種確認することができた。

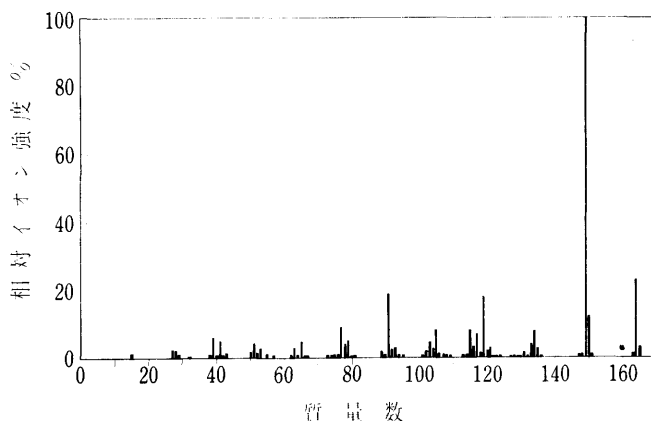
セリ精油およびショウノウ油中に確認したこれらの成分のうち、2 種のフェノールエーテルすなわちセリ油のチモールメチルエーテルとショウノウ油のミリスチシンの質量スペクトルを第 1 および第 2 図に示す。他の成分については他の機会にゆずる。

チモールメチルエーテルでは、質量 149 のイオン ($M^+ - 15$) が最大ピークとなっている。このイオンは親イオンのメトキシ基からメチルが開裂しても、あるいはイソプロピル基からメチルが開裂しても生じるはずである。しかしメチルアニソール $CH_3O \cdot C_6H_4 \cdot CH_3$ の 3 異性体では、ともに親イオンが最大ピークとなっているのに対し、*O*-エチルアニソール $CH_3O \cdot C_6H_4 \cdot C_2H_5$ では、親イオンが最大ピークではなくて、エチル基の β -開裂によって生じる $M^+ - CH_3$ イオンが最大ピークとなっている⁶⁾。したがってチモールメチルエーテルの親イオンの最初の開裂は、イソプロピル基におけるメチルの開裂であると考えねばならない。質量 149 のイオンから、もう一度メチルが開裂して質量 134 のイオンが生じ、さらにこれから CHO が脱離して、質量 105 のイオンが生じると考えられる。質量 119 のイオンの生成の説明には、エチレンの脱離に先立ってホルムアルデヒドが脱離するとして、その経路を図示した。これは少し無理なように思われるが、他に適当な経路が考えにくい。

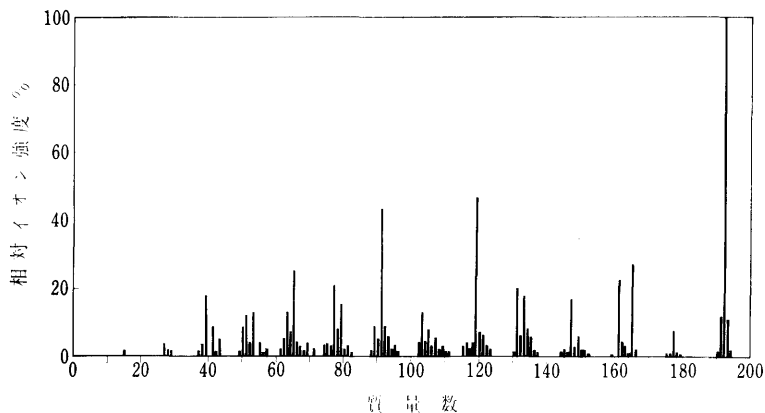
ミリスチシンでは、親イオンが最大ピークとなっている。側鎖のアリル基中の芳香環に対して β 位置にある炭素-炭素一重結合が、側鎖の二重結合に対しては α 位をとるため、やや抵抗を示して開裂しにくいと

考えると、この点が理解できる。この化合物のスペクトルはアリル基の段階的な開裂と、メトキシ基の開裂でほとんど説明できる。親イオンのアリル側鎖からビニル基が脱離して、質量 165 のイオンが生じ、親イオンの側鎖の二重結合が転位したあとメチルが開裂すると質量 177 のイオンが生じる。177 イオンからさらにホルムアルデヒドが脱離すると 147 のイオンとなる。また 161 のイオンは親イオンからメトキシ基が開裂しても生じるが、親イオンの側鎖の二重結合が転位して P' イオンとなり、つぎにメトキシ基が開裂しても生じるであろう。芳香環と側鎖の二重結合が共役している P' イオンから、メトキシ基の開裂を考える方が、共役しない親イオンからメトキシ基の開裂を考えるよりも適切であろう。その他のイオンのうち 119, 105, 91, 77, 65 のイオンは芳香族化合物の質量スペクトル一般に見られるものである。133 および 132 のイオンはおそらくメチレンジオキシ基の開裂に関係したものと考えるが、類似化合物のスペクトルがないので、その解明は今後の研究にまたねばならない。

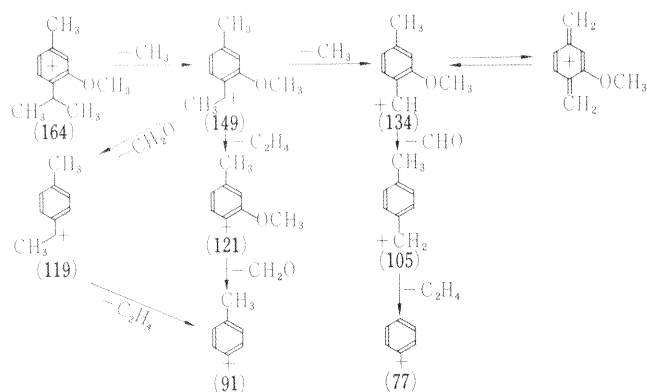
- 1) F. W. McLafferty, "Mass Spectrometry of Organic Ions", Academic Press, New York (1963).
- 2) A. Ryhage and E. von Sydow, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 2025 (1963).
- 3) E. von Sydow, *ibid.*, **17**, 2504 (1963).
- 4) A. F. Thomas and B. Willhalm, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 475 (1964).
- 5) G. L. K. Hunter and W. B. Brogden, *Anal. Chem.*, **36**, 1123 (1964).
- 6) H. Bulziewicz, C. Djerassi and D. H. Williams, "Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds", Holden-Day, Inc., San Francisco (1964), P. 176.



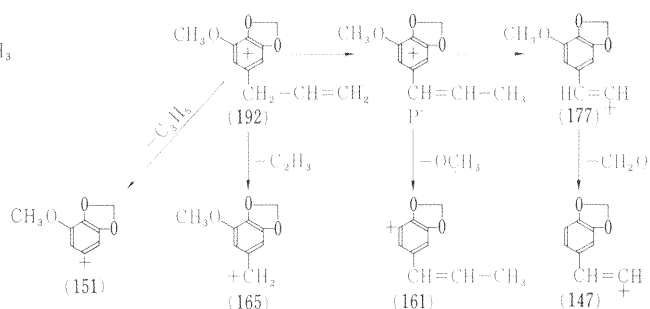
第 1 図 チモールメチルエーテルの質量スペクトル



第 2 図 ミリスチシンの質量スペクトル



第3図 p-シモールメチルエーテルの開裂



第4図 ミリスチシンの開裂

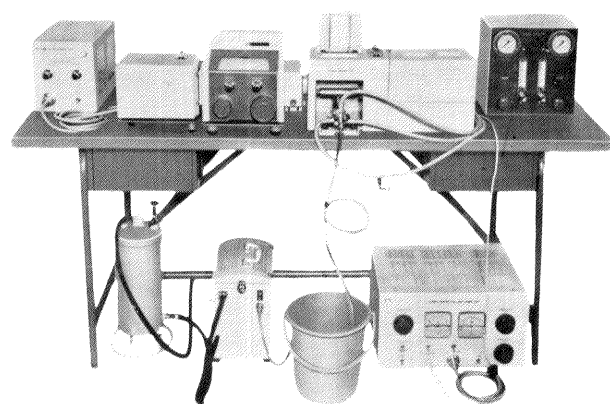
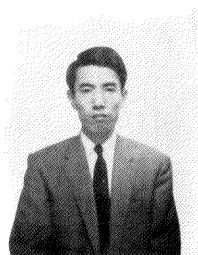
α -ケト酸の酸化的脱炭酸機序に関与する2価金属イオンについて*

〈原子吸光分析法による酵素蛋白結合性金属イオンの定量〉

早川太郎**

1. まえがき

コエンザイムA、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドと共役して α -ケト酸を酸化的に脱炭酸する酵素系において、従来、 Mg^{++} は複合酵素群の代表的な金属賦活剤であることが知られており、チアミンピロリン酸(TPP)とともに脱炭酸機序に関与していると考えられている。動物組織では、Schweetら¹⁾がハト胸筋のビルビン酸酸化酵素群でTPPが強い賦活作用を示すとともに Mg^{++} の添加が精製酵素をほぼ2倍に賦活すること、また Mn^{++} は Mg^{++} に代り得る賦活作用を呈するが、 Cu^{++} 、 Zn^{++} は強い阻害作用を呈することを報告している。そしてさらに種々の金属キレート剤に対して透析することによって Mg^{++} フリーの酵素標品を調製しようと試みたが、失敗に終わっている。しかし、 Mg^{++} 添加による賦活作用はこれらのキレート剤により阻止されたと述べている。またKorkesら²⁾はブタ心筋ビルビン酸酸化酵素の粗酵素標品ではdismutation活性で Mg^{++} 、 Mn^{++} およびTPPの添加効果は認められなかったと報告している。mycobacterium tuberculosisから精製したビルビン酸酸化酵素では、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールを水素受容体とした場合、その活性はTPPに完全に依存するとともに Mg^{++} によってわずかに賦活されることおよびEDTAによって強く阻害されることをGoldman³⁾は報告している。しかし、やはりEDTAに対し酵素を透析しても活性の完全な喪失は認め



139-0420形 原子吸光付属装置を装着した
139形 日立分光光電光度計

められなかったと述べている。またLindstrom⁴⁾はAzotobacter vinelandiiの抽出液から部分的に精製した α -ケトグルタル酸酸化酵素がフェリシアン化カリ還元活性でやはりほとんど完全にTPPの添加に依存性を示し、 Mg^{++} によって賦活されることを報告している。

ところで、すでにわれわれは^{5,6)}ブタ心筋よりビルビン酸および α -ケトグルタル酸酸化酵素群(以後PDC、KGDCと略す)を精製し、高度に純化されたPDCではTPPは解離性で完全にTPPフリーであるが、KGDCではTPP添加なしで約80%の活性を示すことを諸性質とともに報告した。今回はこれらブタ心筋両酵素群ならびに大腸菌PDCに対する各種2価金属イオンの影響、EDTAを中心とする金属キレート剤の作用、さらに原子吸光分析による蛋白結合性金属イオン含量について報告したい。

* 本研究は教室の平島正泰、浜田豊、小池正彦との共同研究で、本年5月12日徳島大学において開かれた第17回酵素化学シンポジウムにおいて発表した。

** 長崎大学医学部 原爆後障害医療研究施設 異常代謝部門

2. 実験方法

実験に用いたブタ心筋両酵素群はすでに報告した方法^{5,6)}によりブタ心筋から精製し、大腸菌 PDC は小池ら⁷⁾の方法に従って精製した。また諸活性測定法はすでに報告した方法^{5,6)}に従い、添加した2価金属イオンはすべてその塩化物を用いた。

酵素蛋白結合性金属イオンの定量は日立 139 形分光光度計および原子吸光付属装置を用い、各金属イオンの測定条件は Mg, 中空陰極ランプ電流 20 mA, スリット幅 0.15 mm, 波長 2852 Å; Ca, 25 mA, 0.15 mm, 4227 Å; Mn, 25 mA, 0.2 mm, 2798 Å; Fe, 40 mA, 0.15 mm, 2483 Å; Cu, 20 mA, 0.2 mm, 3247 Å; Zn, 25 mA, 0.2 mm, 2138 Å で行ない、酵素溶液には 0.05 M リン酸カリ緩衝液を用いたのでリン酸の干渉を除去するため標準添加法を用い吸光度 0 へ外挿して含量を求めた。

3. 実験結果

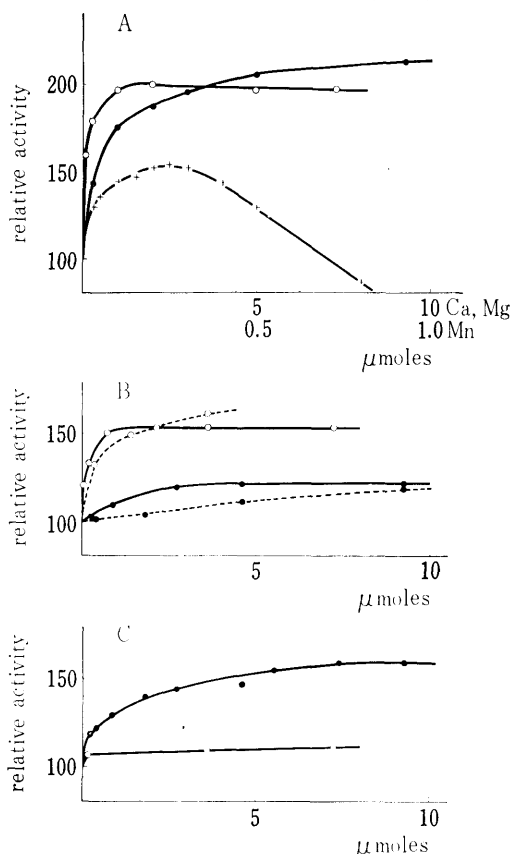
2 価金属イオンの影響——すでにいくつかの研究者によって報告されているようにブタ心筋 PDC の場合、 Mn^{++} はピルビン酸カルボキシラーゼ活性において低濃度では Mg^{++} に代り得る賦活作用を呈したが、ブタ心筋 KGDC の場合は Mn^{++} はむしろ軽度の阻害傾向を示した。 Cu^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} はブタ心筋両酵素群のカルボキシラーゼ活性を阻害した。 Fe^{++} , Pb^{++} は 0.3μ モル程度ではほとんど影響がみられなかった。これら 2 価金属イオンの各活性におよぼす影響は第 1 表に示した。ここで注目されるのは、 Ca^{++} による著明な賦活作用である。その各濃度における賦活効果を Mg^{++} , Mn^{++} のそれと共に第 1 図 A, B に示した。 Ca^{++} の α -ケト酸の酸化的脱炭酸への賦活作用については今までに報告がなく、 Ca^{++} が元素周期律表で Mg^{++} と同じ II A 族に属していることと考え合わせると興味ある事実と思われる。しかし、大腸菌 PDC では第 1 表および第 1 図 C に示したように Mg^{++} による賦活効果はかなり認められたが、 Ca^{++} による賦活効果はほとんど認められず、また Mn^{++} によっては 1μ モル添加で 100% という強い阻害が認められた。

金属キレート剤の影響——ついでわれわれはこれら賦活金属イオンの脱炭酸機序に關する性質を明らかにするために EDTA を中心とした数種の金属キレート剤の各活性におよぼす影響を調

べた。高度に純化したブタ心筋 PDC および KGDC は金属添加剤の添加なしで $Ca^{++}0.3\mu$ モル添加時のそれぞれ 55~60% および 70~75% の活性を示すので、金属賦活剤を除去すべく 0.01 M EDTA を含む 0.05 M リン酸カリ緩衝液 pH 7.0 に 0°C で 48 時間透析したが透析前後ではほとんど活性に変化がみられなかった。ついで第 2 表に示したように EDTA を中心に数種の金属キレート剤の各活性におよぼす影響を調べた。

表から明らかなようにブタ心筋および大腸菌 PDC は共に低濃度の EDTA によって強く阻害されるのに反し、ブタ心筋 KGDC は EDTA によってほとんど阻害されず、むしろ、8-ヒドロキシキノリン、0-フェナントロリンによって阻害された。また、第 3 表で明らかなようにこれら EDTA による阻害は Mg^{++} または Ca^{++} の添加で可逆的に完全に回復された。

2 価金属イオンの原子吸光分析——以上述べてきた事実から α -ケト酸の酸化的脱炭酸機序に金属が関与していることが推測され、しかもそれらの金属イオンは相当強固に酵素蛋白に結合している可能性が考えられる。そこでわれわれはこれら精製酵素ならびにそれらの精製段階における各分画について前述したように 0.01 M EDTA に 48 時間透析し、さらに 0.05 M リン酸カリ緩衝液 pH 7.0 に 2 回透析したものを原子吸光分析に用いた。その結果 Mg, Ca 値は共にその絶対量の点では少ないが、精製段階が進むにつれて増加する傾向が認められ、前述した賦活作用と考え合わせるとこれら 2 つの金属イオンが両複合酵素群の脱炭酸反応に積極的に關与していることを示唆するような結果が得られた。さらにブタ心筋 KGDC において著明な阻害作用の認められた 8-



第 1 図 ブタ心筋 PDC (A), KGDC (B) および大腸菌 PDC (C) に対する Mg^{++} , Ca^{++} および Mn^{++} の賦活曲線
●: Mg^{++} , ○: Ca^{++} , △: Mn^{++} , —: カルボキシラーゼ活性,: CO_2 -生成活性

第 1 表 2 価金属イオンの各種酵素活性におよぼす影響

2 価金属イオン (0.3μ モル)	ブタ心筋 PDC			大腸菌 PDC		ブタ心筋 KGDC	
	カルボキシ ラーゼ活 性	CO_2 - 生成 性	dismuta- tion 活 性	カルボキシ ラーゼ活 性	カルボキシ ラーゼ活 性	CO_2 - 生成 性	CO_2 - 生成 性
—	100	100	100	100	100	100	100
Mg^{++}	144	142	101	119	104	101	—
Ca^{++}	179	139	98	108	138	128	—
Ca^{++} (0.15μ モル) + Mg^{++} (0.15μ モル)	177	—	—	—	—	—	—
Mn^{++}	152	—	98	79	88	—	—
Mn^{++} (1μ モル)	68	—	—	0	—	—	—
Co^{++}	87	—	99	92	52	—	—
Cu^{++}	39	—	16	71	45	—	—
Zn^{++}	43	—	95	81	62	—	—
Hg^{++}	54	—	56	—	32	—	—

ハイドロキシキノリン ($5 \times 10^{-3} \text{M}$) に EDTA に対すると同様に透析したものについて原子吸光分析を行なったが精製酵素についてはその含量に大きな相違は認められなかった。高度に純化した大腸菌 PDC についても同じようにその Mg, Ca 含量を測定したが、第 4 表に示したように Ca は検出されなかった。これは前述した Ca^{++} による賦活効果が大腸菌 PDC についてはほとんど認められなかったという事実とよく一致する結果である。ブタ心筋両複合酵素群の場合、以上述べたように 2 種以上の金属イオンによって賦活されるが第 1 表に示したように Mg^{++} , Ca^{++} 両金属イオンの共存による相乗作用は認められず、酵素蛋白の金属賦活剤に対する特異性が低く、PDC の場合は Mg^{++} , Ca^{++} および低濃度の Mn^{++} が、KGDC の場合は Mg^{++} , Ca^{++} が何れも賦活剤になり得るのではないかと考えられる。

4. ま と め

以上述べてきた実験結果よりブタ心筋における α -ケト酸の酸化的脱炭酸反応には従来その代表的な金属賦活剤として考えられてきた Mg^{++} と同等もしくはそれ以上に強い賦活作用を Ca^{++} が有すること、そして原子吸光分析の結果、Mg, Ca とともに量的には少ないが両複合酵素中に含まれており、EDTA 等金属キレート剤に対する透析では除去されないような結合が酵素蛋白との間

第 2 表 金属キレート剤の各種酵素活性におよぼす影響

金属キレート剤	$\mu\text{モル}$	ブタ心筋 PDC		大腸菌 PDC	ブタ心筋 KGDC
		カルボキシラーゼ活性	dismutation活性	カルボキシラーゼ活性	カルボキシラーゼ活性
—	0	100	100	100	100
	0.1	0	74	36	—
	0.5	—	46	—	—
	1	—	27	0	96
	5	—	9	—	88
	10	—	—	—	83
8-ハイドロキシキノリン	1	69	—	75	0
0-フェナントロリン	1	100	—	96	93
	5	91	85	85	55

に考えられる。しかし、これらブタ心筋両複合酵素群の活性におよぼす金属キレート剤の影響はブタ心筋および大腸菌 PDC が EDTA によって強く阻害されるのに反し、ブタ心筋 KGDC はむしろ 8-ハイドロキシキノリンによって強く阻害されるという相違が認められた。一方、大腸菌 PDC の場合は Ca^{++} によってほとんど賦活されず、原子吸光分析もこれを支持するような結果を与えている。

終りに臨み、原子吸光分析につきご指導ならびにご協力いただきました日立製作所那珂工場 保田和雄、内野興一の両氏に心より感謝します。

5. 文 献

- 1) Schweet, R. S., and Cheslock, K., J. Biol. Chem., **199**, 749 (1952)
- 2) Korkes, S., del Campillo, A., and Ochoa, S., J. Biol. Chem., **195**, 541 (1952)
- 3) Goldman, D. S., Biochim. Biophys. Acta, **27**, 506 (1958)
- 4) Lindstrom, E. S., J. Bacteriol., **65**, 565 (1953)
- 5) 早川, 牟田, 平島, 井手, 岡部, 小池, 酵素化学シンポジウム第 16 回予講集, 319 頁 (1964)
- 6) Hayakawa, T., Muta, H., Hirashima, M., Ide, S., Okabe, K., and Koike, M., Biochem. Biophys. Res. Comm., **17**, 51 (1964)
- 7) Koike, M., Reed, L., and Carroll, W. R., J. Biol. Chem., **235**, 1924 (1960)

第 3 表 EDTA によって阻害されたビルビン酸カルボキシラーゼ活性* の Mg^{++} および Ca^{++} 添加による回復

金属イオン	金属イオンの $\mu\text{モル数}$				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Mg^{++}	0	65	86	95	100
Ca^{++}	0	38	88	98	100

* 反応液は各金属イオンを添加する前に 0°C , 10 分間の前処理を行った。

** $\frac{\text{EDTA (1}\mu\text{モル) 共存下の活性}}{\text{EDTA 非共存下の活性}} \times 100$ を表わす。

第 4 表 原子吸光分析による各種酵素群中の金属含量^a

分 画	Mg			Ca		Mn	Fe		Cu		Zn
ブタ心筋											
アンバーカラー抽出液	0.68	0.53	3.1	1.7	—	b	—	5.1	0.13	b	0.73
PDC											
プロタミン沈殿	0.15	0.11	0.82	0.73	0.46	b	—	0.21	0.06	b	0.24
ペレット	0.18	0.14	0.93	0.68	0.65	b	—	0.71	—	b	0.23
硫酸画分(0.29~0.36)	0.29	0.49	1.8	0.56	1.54	b	0.9	1.3	b	b	b
KGDC											
プロタミン沈殿	0.57	0.73	—	0.97	1.3	b	2.7	1.5	0.13	b	0.18
	(0.29)				(1.2)						
カラム吸着前	0.61	0.36	0.40	0.68	0.88	b	1.7	1.5	0.12	b	0.24
硫酸画分(0.24~0.29)	2.0	1.25	2.0	1.6	1.5	b	b	0.52	b	b	b
	(1.40)										
大腸菌											
PDC		0.44		b		—	—		—		—

^a モル ($\times 10^{-9}$)/mg・酵素蛋白 b 検出出来ず () は 8-ハイドロキシキノリンに透析したもの

電子顕微鏡用付属“傾斜装置”は結晶性試料、特に金属薄膜等の観察には不可欠のもので、付属装置というよりは、むしろ金属観察用標準試料微動装置の一部と考えるべきものである。

このため他の付属装置、例えば試料加熱、試料冷却、歪装置等はこの傾斜装置の上に付加されることが望ましい。このように2種以上の機能を持つ複合付属装置は機構が複雑になること、スペース上の制約があることから従来ほとんど製品化されていなかった。

しかし上記の如く傾斜装置が金属観察用として基本的な装置であることから、これと他の機能を組み合わせた複合付属装置が上記研究分野の利用者から要求されており、中でも特に加熱装置との複合は必要度が多い。

この目的のために開発したのが“HK-2BM形全方位傾斜加熱装置”である。本装置はすでに製品化されている“HK-2AM形全方位傾斜装置”の傾斜機構に、超小形加熱炉を付加したもので、次にその構造、性能、応用例を紹介する。

本装置の加熱は抵抗線加熱方式である。このような熱変化装置の製品化において重要なことは、各部の熱膨脹による動きを小さく抑えること、特に試料微動部品の熱膨脹は観察中の試料の動きとなって終像上に拡大されてあらわれるため、重大な問題であ

る。また加熱電流によって生ずる微小磁場が照射電子線の偏向をおこす。よってこれらの問題をおさえるために加熱炉は超小形とし、消費電力を小さくすることが必要となってくる。加熱電力を小さくすることは炉の熱効率、熱絶縁を良くすることであるが、これは寸法上の制約、特に傾斜と加熱を同時に行なうためには、性能上の制約がきびしい。

本装置の加熱炉は熱絶縁に薄肉部をもうけ、炉をできるかぎり小形化し熱効率をあげた。第2図に傾斜皿と傾斜加熱用メッシュホルダーの外観を示す。

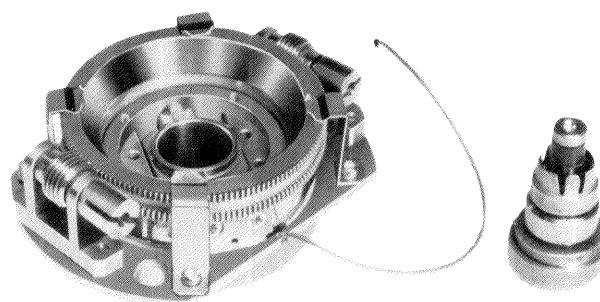
第3図は加熱炉の消費電力と試料位置の温度関係を示す。

最高使用温度 800℃ において、消費電力 8～9 W で、他の加熱装置に比較すると $\frac{1}{2}$ ～ $\frac{1}{3}$ になっている。

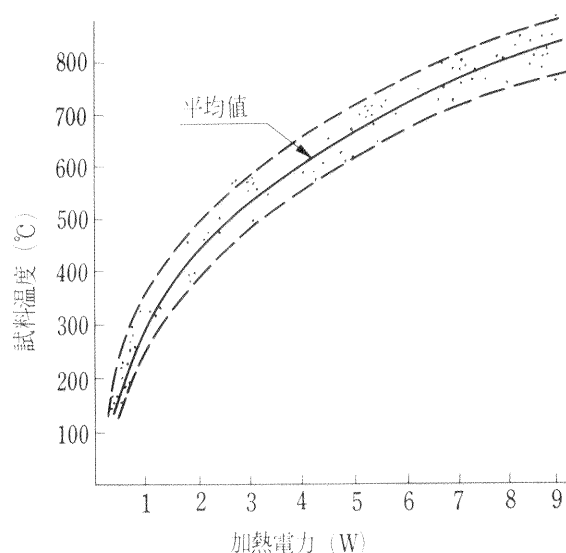
応 用 例

第4図は銅—錫 (24.5%) 合金を加熱傾斜したときの 変化を示すものである。試料は熱間圧延後 700℃ で水焼入し、化学研磨にて薄膜とした。

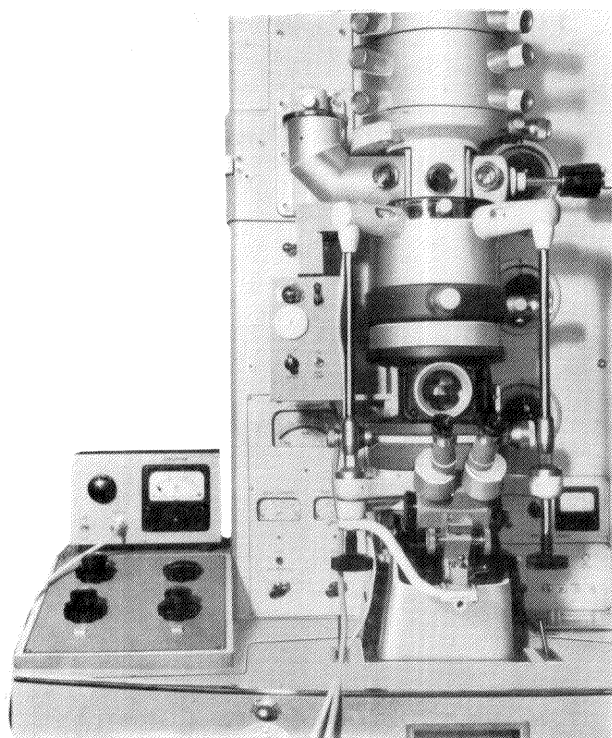
写真は、室温から 650℃ まで加熱し、この時の α 、 β 相の析出と、720℃ における α 単相状態の傾斜角変化による電顕像、回折像で、傾斜と加熱による変化が顕著にあらわれている。



第2図 傾斜皿，加熱用メッシュホルダー



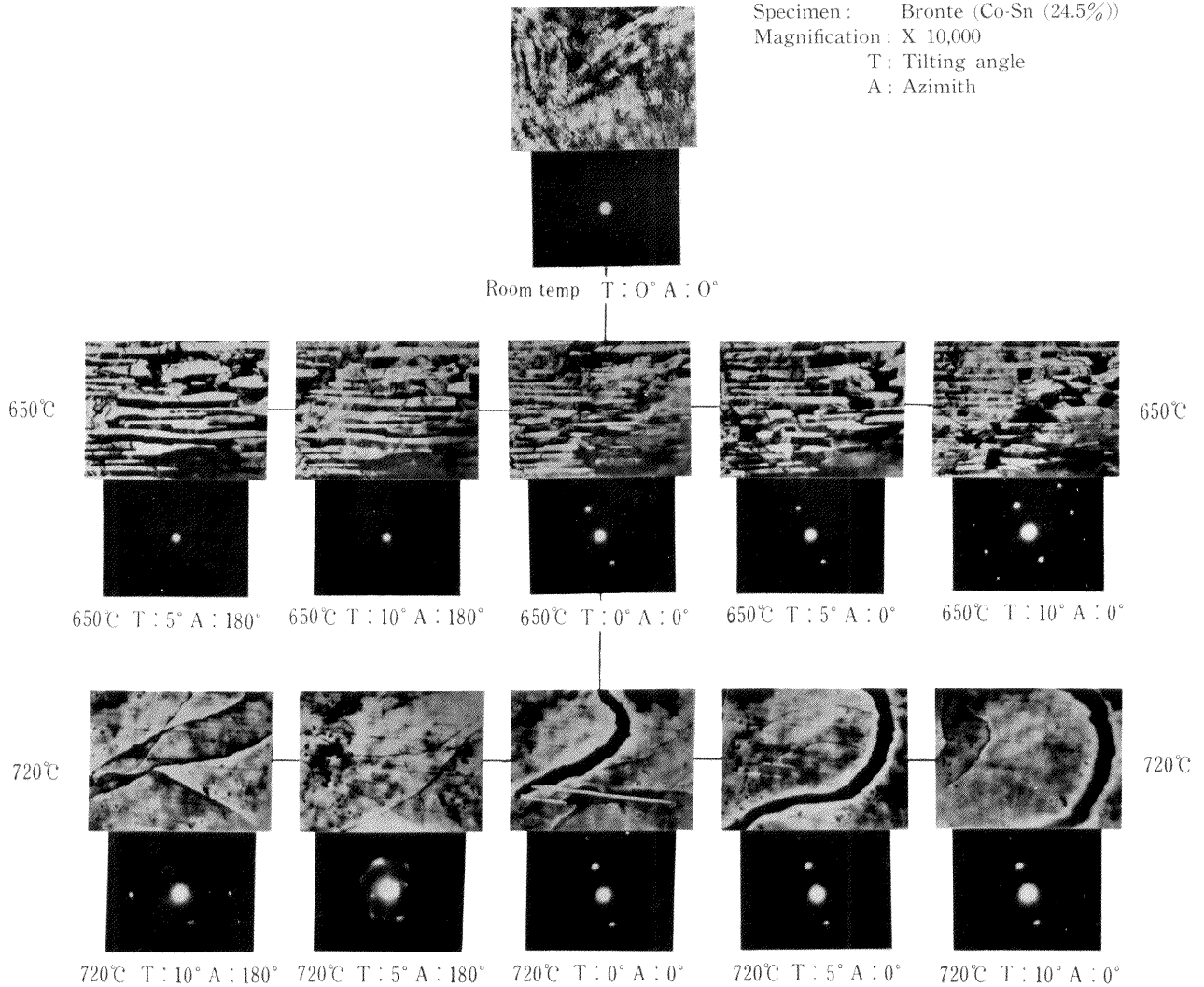
第3図 温度と電力の関係



第1図 外 観 写 真

* 日立製作所那珂工場

Specimen : Bronte (Co-Sn (24.5%))
 Magnification : X 10,000
 T : Tilting angle
 A : Azimuth



第4図 応用例一大阪大学産業科学研究所 西山研究室提供

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 8 No. 6

昭和40年11月20日印刷

昭和40年12月1日発行

非売品

年6回毎偶数月発行

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