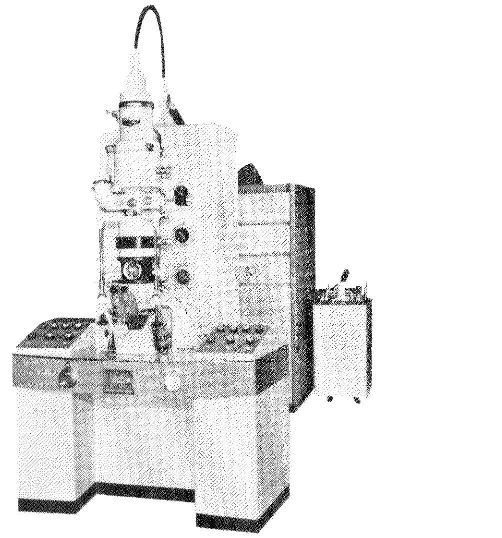
THE HITACHI
Scientific Instrument NEWS

October, 1966 Vol. 9 No. 5. HITACHI

■HU-11D形 日立電子顕微鏡

浅井孝行*

大型商用電子顕微鏡に要求されるのは，高分解能である事，操作が簡単である事，更に応用範囲が広い事などである。近年電子顕微鏡の性能は，ほぼ理論値に近ずいたが，保証分解能の向上と，更に一段とすぐれた操作性の要求などの点でまだ残された課題が多い。今回我々は，これらの点を考慮して，従来のＨＵ－11Ｂ形電子顕微鏡を改良したＨＵ－11Ｄ形電子顕微鏡(第一図)を完成したので，以下主なる改良点について述べる。これらの改良点の一つ一つは，過去既に特殊ケースとして，納入実績を持つものである。



HU－11D形　日立電子顕微鏡

1．照射系軸調整の電磁偏向方式化

照射系の軸調整は，従来機械的方法でおこなっていたが，偏向コイルによる電磁方式を採用し，操作盤のコントロールツマミにより容易に調整出来る様になった。第二図に偏向コイルを含むコンデンサーレンズ部を示す。偏向コイルはコンデンサーレンズ下部に取付けられ照射系の傾斜調整用と水平(明るさ)調整用とがあり各々Ｘ軸Ｙ軸の２組のコイルよりなっている。傾斜調整用コイルは，上下２段のコイルよりなり，上段コイルで偏向された電子ビームは，下段コイルにより自動的に試料面上の光軸に入射する様に設計されている。一方水平調整用コイルは下段に位置し，明るさの調整をおこなっている。詳しくは，２組の鞍形コイルを互に直交するＸ軸Ｙ軸上に配置したものを，更に各々上下２段のブロックに分割し分割されたＸ軸Ｙ軸コイルがそれぞれ独立に直列に励磁される様な結線になっている。第３図にＸ軸コイルのみを取出し，この１組のコイルを１本の線で代表し，その結線と励磁の方向を示す。Ｙ軸コイルもこれと直角の方向に同じ様に結線されている。これらＸ軸Ｙ軸コイルにより偏向された電子線は試料面上の光軸上に入射する。これらは操作盤のコントロールツマミにより操作することができる。

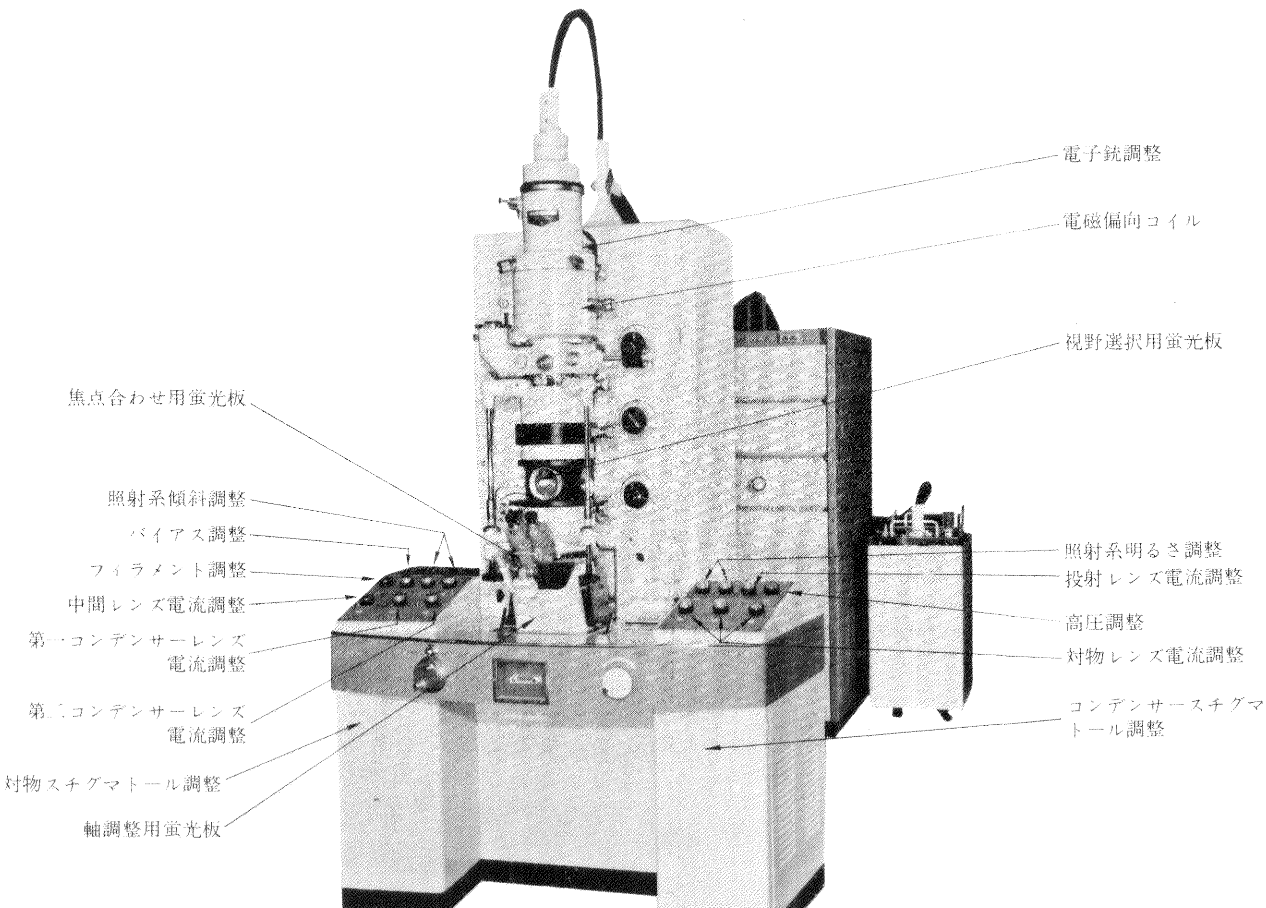
2．暗視野像観察用高角度ビーム傾斜が可能

１の偏向コイルを用いて，全方位に±3°まで電子ビームを傾け

＊日立製作所　那珂工場　電装部

目　次

■HU-11D形　日立電子顕微鏡……………………浅井孝行……1
■EPS-3T形　日立自記分光光度計による、ミクロゾーム中のチトクローム(混濁試料)の測定……………小森律夫……4
■原子吸光分析法による鉄鋼分析の試み……………神森大彦，田口　勇……9
■207形　日立原子吸光分光光度計について………内野興一，大石公之助，猪俣　博，久保義隆……10
——ラピッドスキャン形分光光度計　特集——
■ラピッド・スキャンということ……………………馬場宏明……12
■RSP-2形　日立ラピッド・スキャン形分光光度計による、アントロンの異性化反応の追跡………馬場宏明，竹村　健……14
■RSP-2形　日立ラピッド・スキャン形分光光度計による、P-ニトロフェニールヒドラジンのアルカリ分解反応の観察……………………木村道也，仁科甫啓……16
■RSP-2形　日立ラピッド・スキャン形分光光度計による、ペルオキシダーゼと、ハイドロサルファイトと、酸素との反応の解析………………山崎勇夫，田村　守，横田健之助……17
■ラピッド・スキャン形分光光度計とエレクトロニクス……………………………進藤善雄……18
■RSP-2形　日立ラピッド・スキャン形分光光度計による酸素活性の測定………………………………山本定明……19
■RSP-2形　日立ラピッド・スキャン形分光光度計の使用経験…………………………………………大場操児……20



第1図　HU－11D形　日立電子顕微鏡

ることができ，操作盤のコントロールツマミにより容易に暗視野像の観察ができる。又明視野像と暗視野像との瞬時切換が可能である。第4図に撮影例を示す。

3．コンデンサーレンズおよび対物レンズスチグマトールの電磁方式化

レンズポールピース内に装着した2組の補正コイルに位相差90°の電流を通じて，回転磁界を作り，全方位の非点収差を補正するもので原理図を第5図に，構造をそれぞれ第2図，第6図に示す。補正レンズによって生ずる非点収差は，各補正コイルの電流のベクトル和に比例し，しかも和が一定の関係になる様各補正コイルの電流変化は，それぞれsinおよびcosの関係になっている。このため非点の方向と補正量（大きさ）は各々独立に可変でき，操作盤のコントロールツマミで能率良く非点収差補正をおこなうことができる。

4．Pre-contered filamentの採用

フィラメント交換時，ウェーネルト電極に対するフィラメントのセンターリング調整が不要となったので，フィラメントの交換が極めて容易となった。

5．バイアス電圧の連続化

従来のステップ方式を連続可変方式に改良したため，近年盛んに使用され始めたポイントフィラメントが理想条件の下で効果的に使用でき，ヘアピン形フィラメントに較べて，試料照射面積の小さい，しかも明るい電子線源が得られるようになった。

6．視野選択用蛍光板、焦点合わせ用蛍光板、軸調整用蛍光板を新たに設置

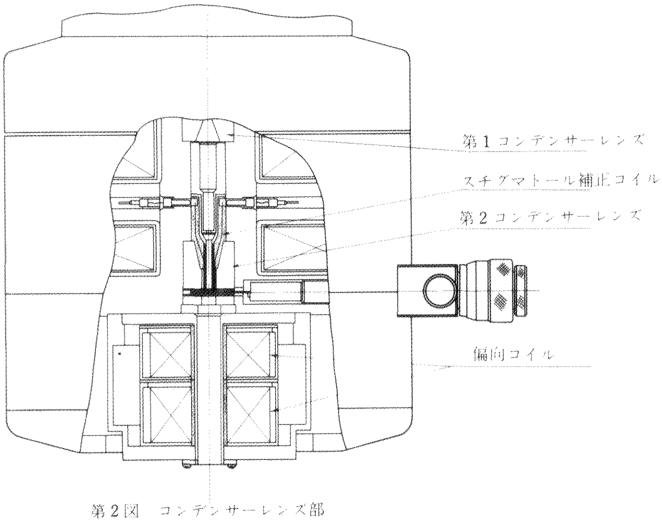
従来の観察用蛍光板の他に，上記蛍光板を各々専用に設ける事により目的に応じた最適条件で各操作が簡単にできるようになった。

7．高圧基準抵抗の水冷及び基準電池として水銀電池の採用

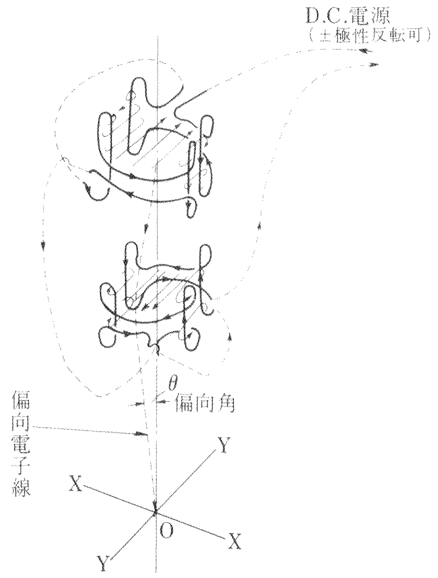
高圧基準抵抗の温度変化および油の対流を最小限に止める事により高圧のドリフト，ノイズを抑制し更に温度ドリフトの小さい水銀電池の併用と相まって，高圧，レンズ電源の安定度向上を図った。

8．上記改良により、分解能3.8A°

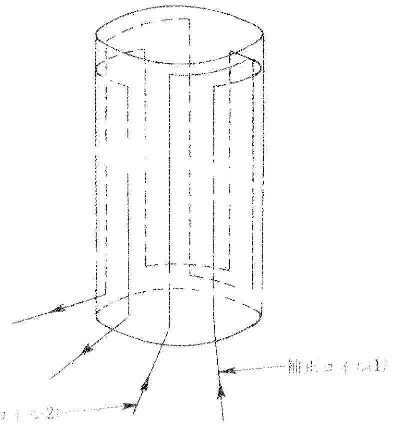
(MoO_3結晶格子像)を保証出来る様になった。
(第7図)



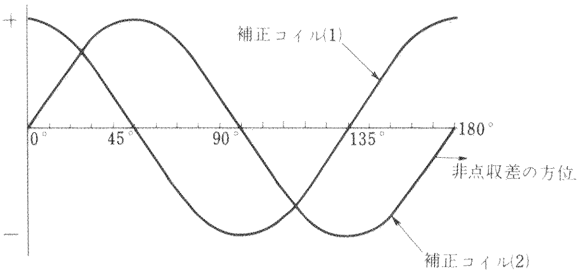
第2図　コンデンサーレンズ部



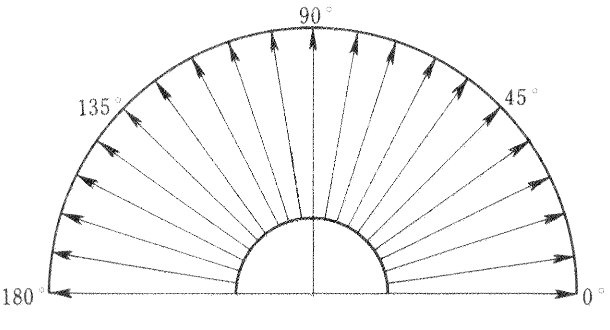
第3図　偏向コイル結線図



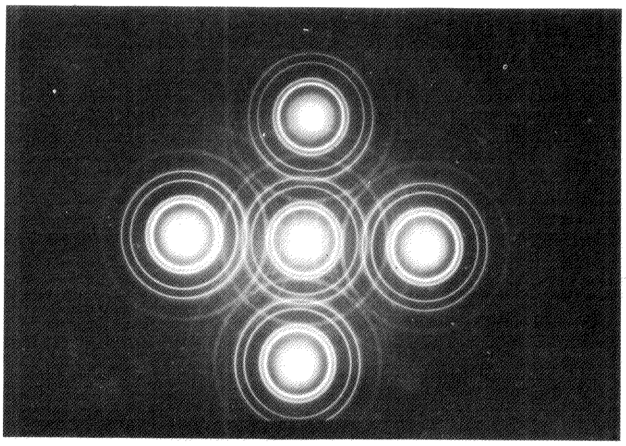
第5－1図 補正コイル



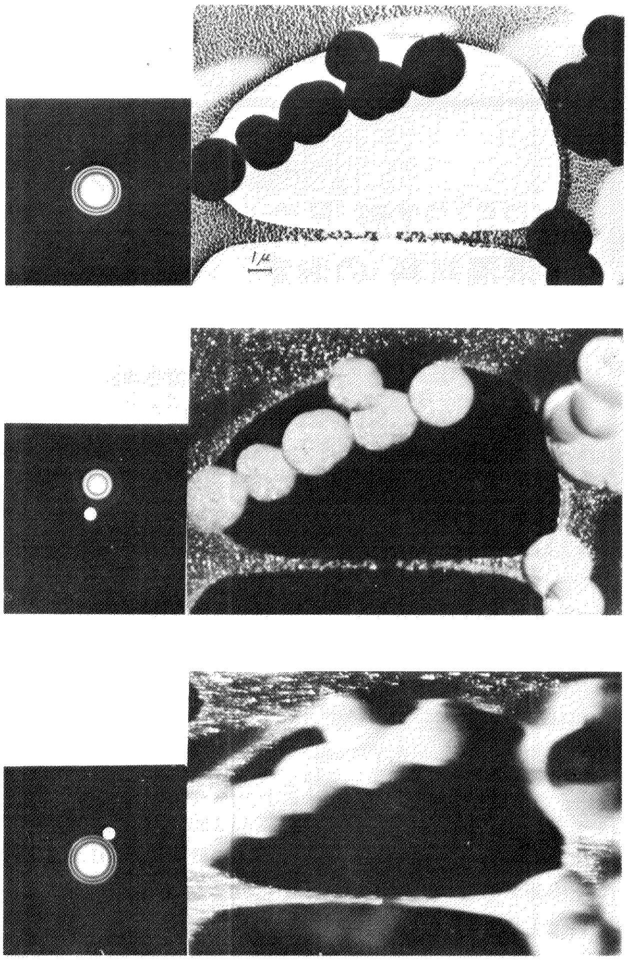
第5－2図　各コイル電流の変化模様



第5－3図　合成非点収差の方位変化の模様



第4－1図
最大偏向角測定例
試料　金蒸着膜
加速電圧　100KV
最大偏向角　＋X……3.3°
－X……3.3°
＋Y……3.3°
－Y……3.4°

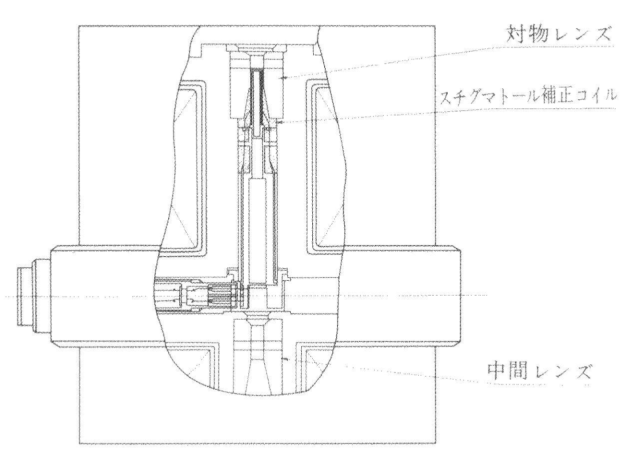


第4－2図
金を蒸着したカーボンブラックの電子顕微鏡像と金の回折像

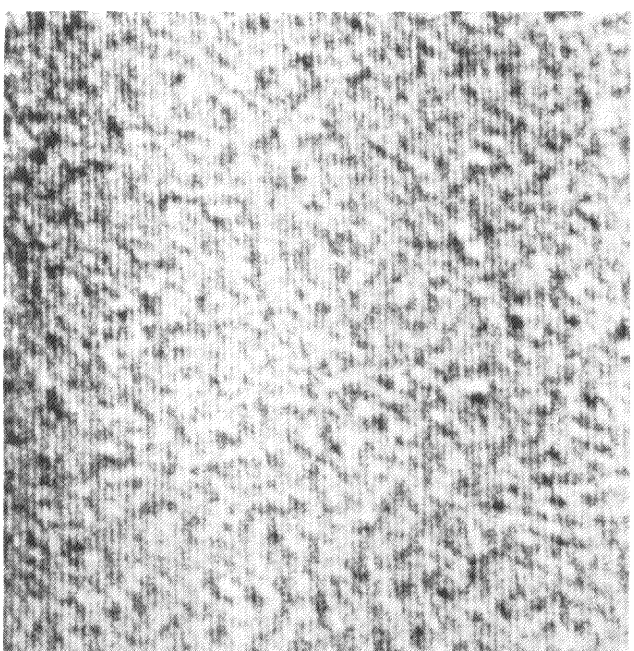
加速電圧　100KV

a：明視野像と金の回折像
b：電子線偏向による暗視野像
偏向角2.3°対物絞り位置0°
c：対物絞りの移動による暗視野像
偏向角　0°対物絞り位置2.3°

注.
写真Cは主に対物レンズの中心を使用しないために生じる軸上色収差による像ボケを示す。



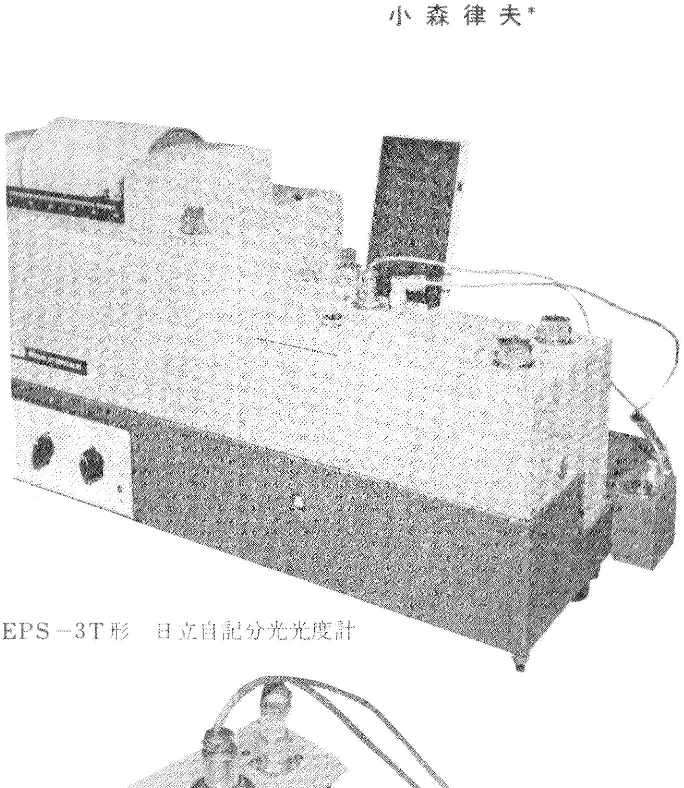
第6図　対物レンズ部


第7図　MoO_3　結晶格子像(110)面
d＝3.81A°　×2,400,000

■EPS-3T形 日立自記分光光度計によるミクロゾーム中のチトクローム(混濁試料)の測定

小森律夫*

近年生化学領域に於て，生物体内に存在する固有物質や新陳代謝の中間産物の同定乃至確認を，その固有吸収スペクトルの上から判別することが甚だ多いが，光学的本質の上から，その応用は可溶性物質乃至近緑体に限局されざるを得なかった。換言すれば生物体の新鮮試料は不透明乃至半透明体なため，この中に存在する標的物質の同定は，予め抽出，その他の人為操作を加えた後か，或は著しい稀釈処置を行った後，始めて可能となる。しかし之等の操作処置に伴い固有物質の変性や吸光度の減弱を生ずる憾いがある。従って半透明体と共存のもとに指標物質の固有吸収スペクトルが定量的に測定することが可能であれば，生物学的試料を直接被検標本として用いる事が出来，迅速且つ的確に同定を行い得る事となる。この様な理由から上述の目的に合致した光学的測定装置の製作が望まれている現状である。今回日立ＥＰＳ－３Ｔ形自記分光々度計の積分球方式附属装置が製品化されたので，上述の目的に適合しているか否か検討するため，ドンリュウＳ系白鼠の肝臓ミクロゾームを，日立製55Ｐ形超遠心分離機を用いて分離し，之を半透明の生物試料（蛋白２mg/cc)として，之に適量のイースト・チトクロームＣを混合させ，後者の吸収スペクトルを指標として，生物学的混濁液中に於ける生物試料の同定，及至その定量性につき検討を加えた。

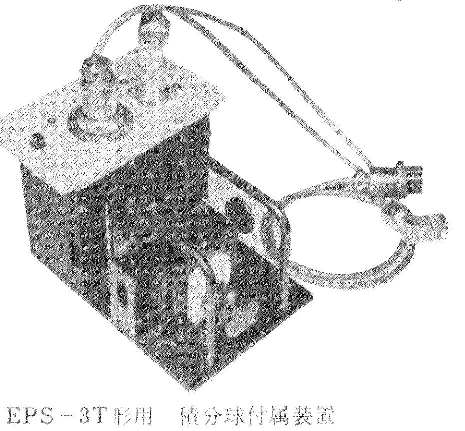

EPS－3T形　日立自記分光光度計

2. 装　置

日立ＥＰＳ－３Ｔ形自記分光々度計に積分球附属装置を用いた。

3. 測定結果

第１図の①は透明液中の還元形チトクロームＣの吸収スペクトルを，②は半透明体の生物試料としてのミクロゾーム中に於ける還元形チトクロームＣの吸収スペクトルを記録した。よく合致し，混濁液中におけるスペクトル測定の可能性を示している。


EPS－3T形用　積分球付属装置

*日立製作所　那珂工場　応用開発課

第2図は標準側光路にミクロゾームを置き，試料側光路にミクロゾームと酸化形，還元形チトクロームCを置いて測定した場合の各々の吸収スペクトルをそれぞれ示す。第3図は標準側光路にミクロゾームと酸化形チトクロームC，試料側光路をミクロゾームと還元形チトクロームCとした時の差スペクトルを示した。両者の差はよく合致している。

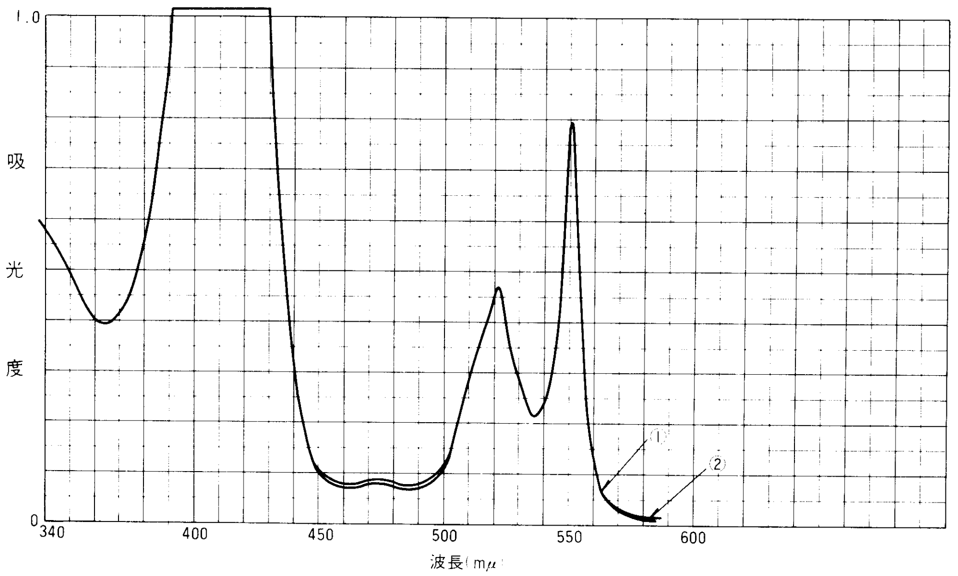
第4図は透明液中に於ける，チトクロームCの検量線である。

第5図及び第6図に半透明体中に於いて同様のことを試験した結果を示す。透明液中に於けると同様良好な検量線が得られる。即ち半透明体に於いても標的物質の定量は可能である。

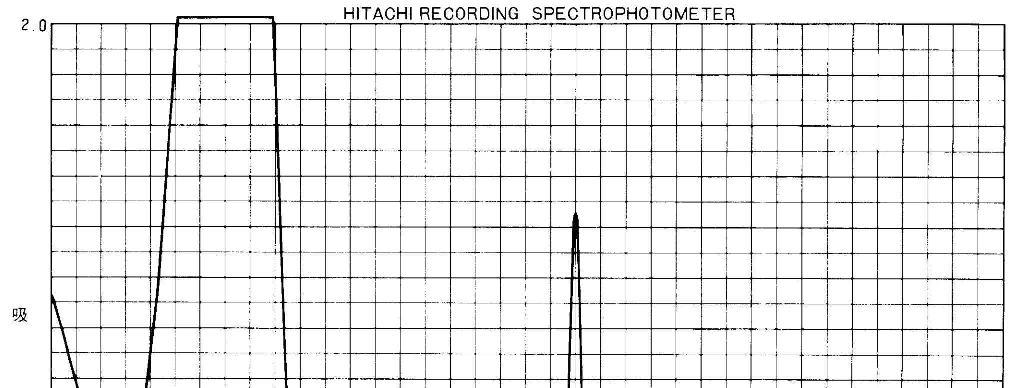
次に種々のイオン強度下でチトクロームCのミクロゾームへの吸着程度を変えた時の吸収スペクトルを第7図第8図に示す。吸着状態を変化させてもチトクロームC固有のスペクトルには変化を来たさない。

結　言

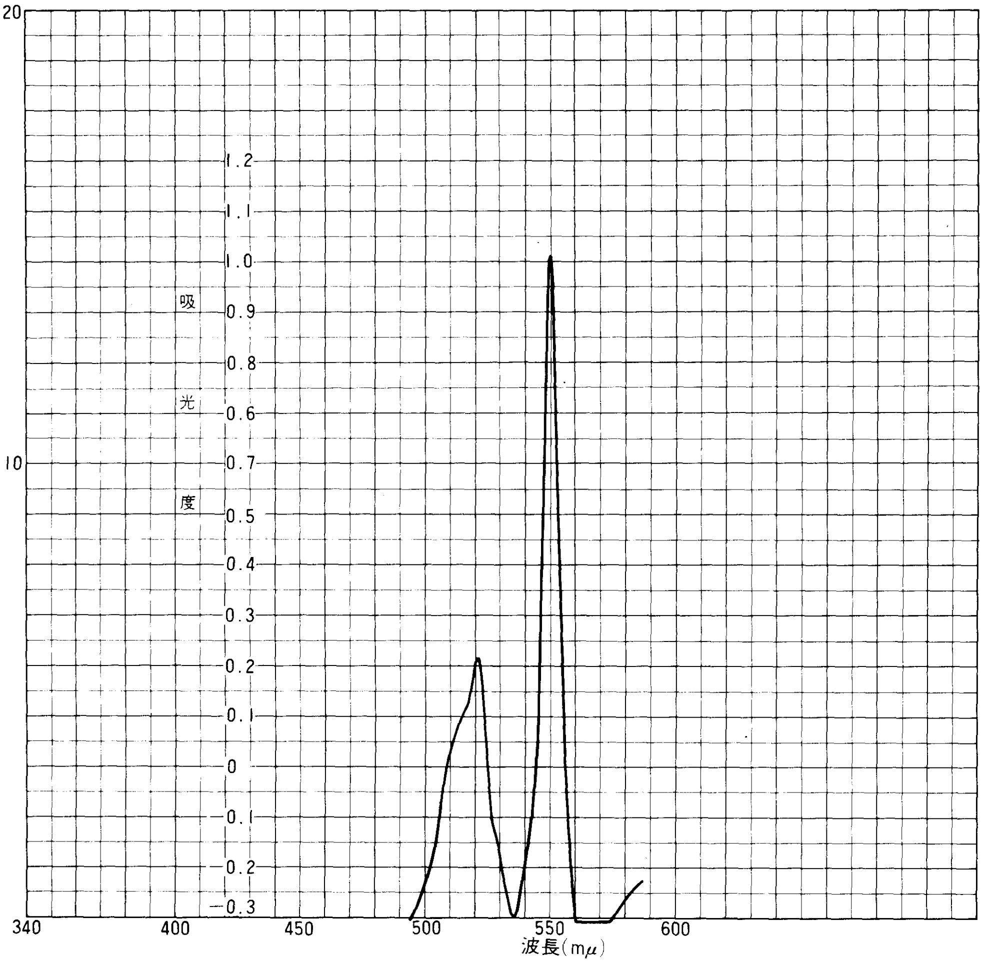
積分球方式附属装置による混濁試料の測定結果は，良好であり，混濁液中の標的試料の定量も可能であることが判った。



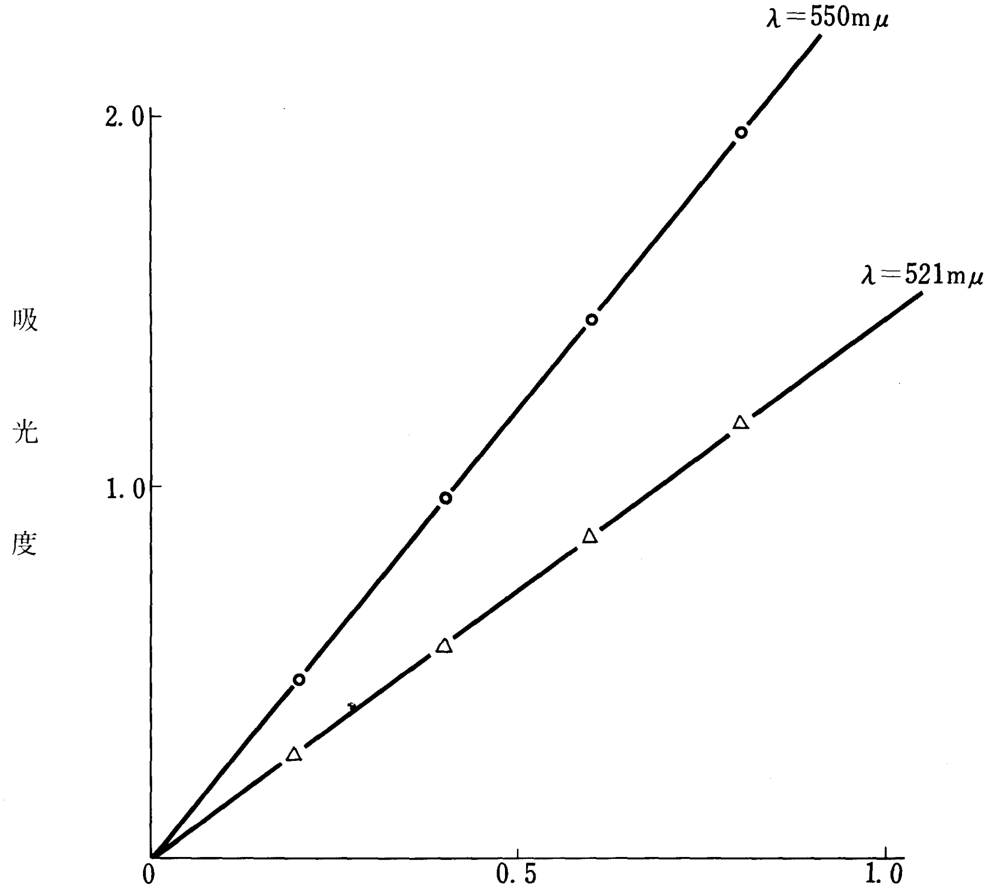
第1図



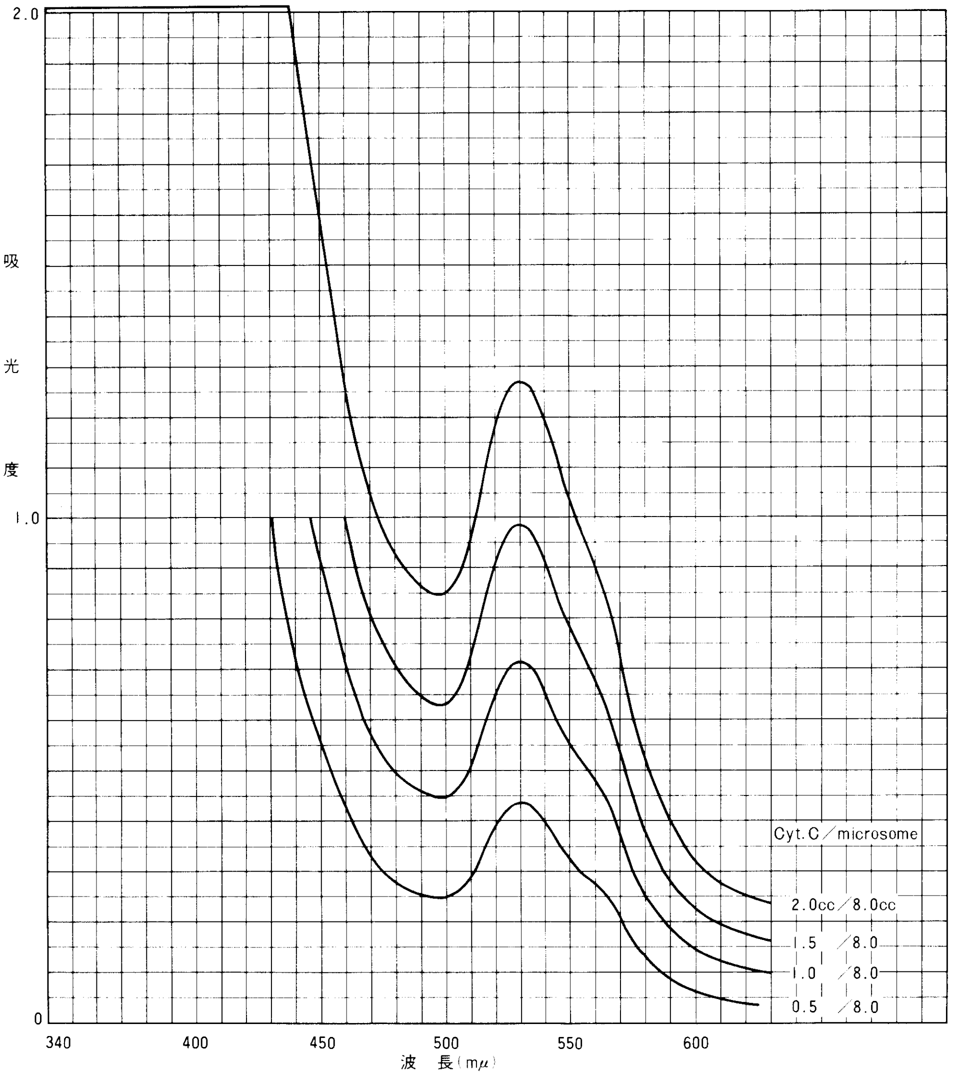
第2図



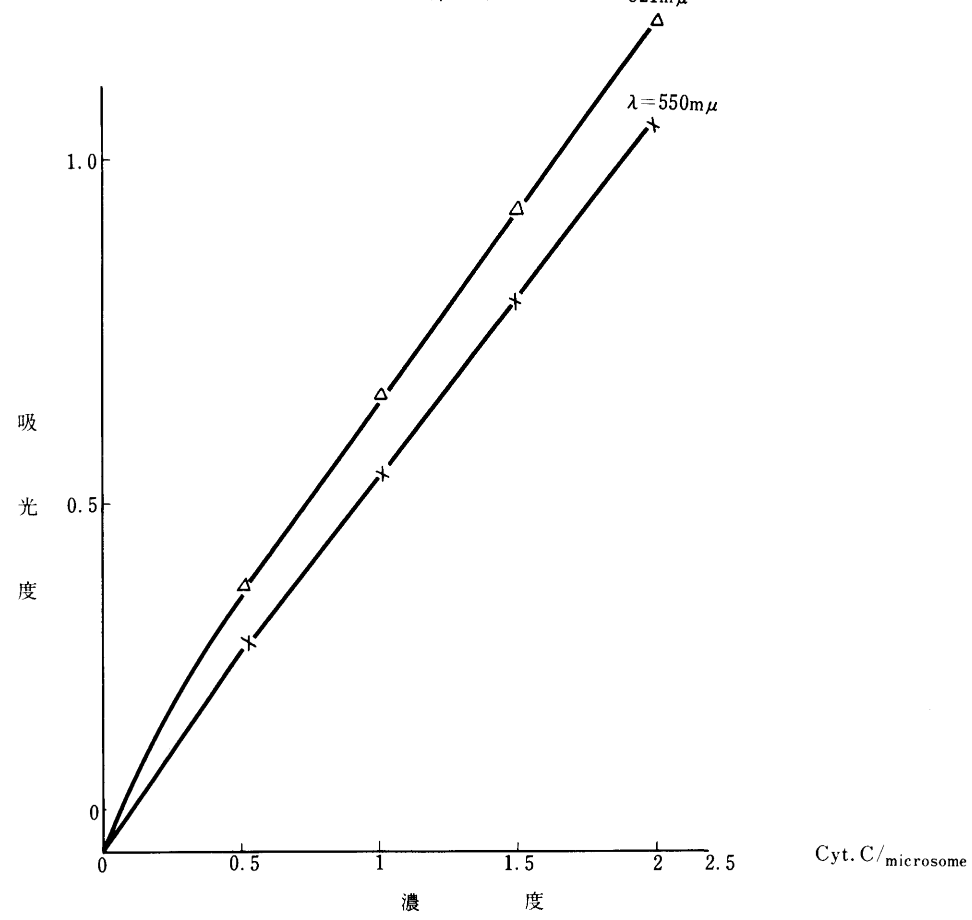
第3図



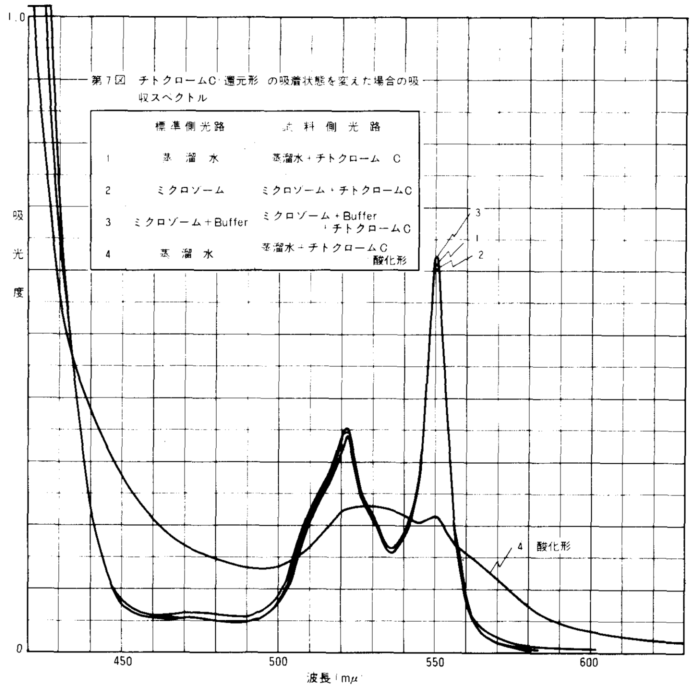
第4図　透明液中のチトクロームCによる検量線（還元形）



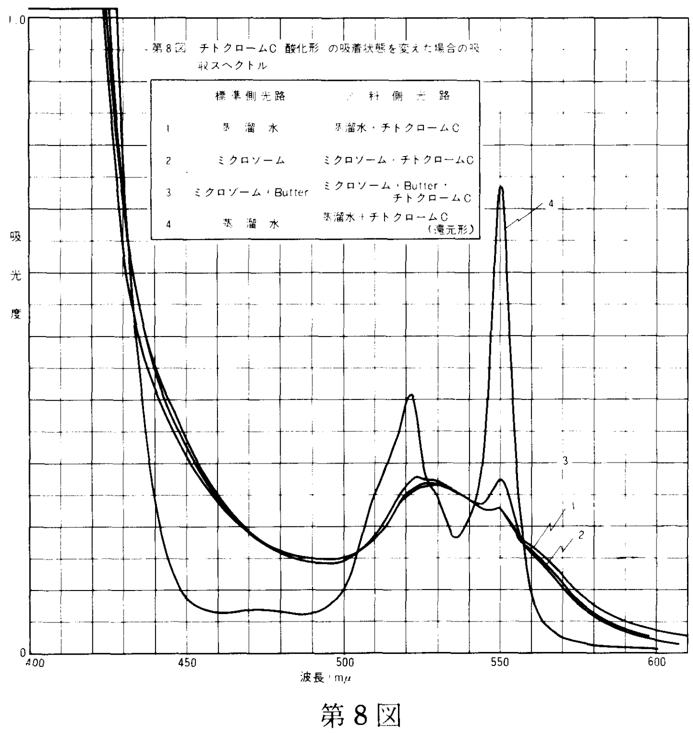
第5図



第6図 ミクロゾーム中のチトクロームC（酸化形）


第7図 チトクロームC 還元形 の吸着状態を変えた場合の吸収スペクトル
標準側光路
試料側光路
1 蒸溜水
蒸溜水＋チトクロームC
2 ミクロゾーム
ミクロゾーム＋チトクロームC
3 ミクロゾーム＋Buffer
ミクロゾーム＋Buffer＋チトクロームC
4 蒸溜水
蒸溜水＋チトクロームC 酸化形
吸光度
1.0
0
450
500
550
600
波長（mμ）
4 酸化形
3
1
2

第7図

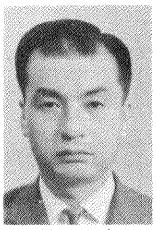

第8図 チトクロームC 酸化形 の吸着状態を変えた場合の吸収スペクトル
標準側光路
試料側光路
1 蒸溜水
蒸溜水＋チトクロームC
2 ミクロゾーム
ミクロゾーム＋チトクロームC
3 ミクロゾーム＋Butter
ミクロゾーム＋Butter＋チトクロームC
4 蒸溜水
蒸溜水＋チトクロームC（還元形）
吸光度
1.0
0
400
450
500
550
600
波長（mμ）
4
3
1
2

第8図

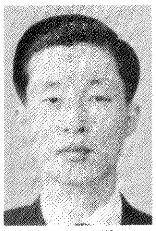
原子吸光分析法による鉄鋼分析の試み

神森大彦* 田口 勇*

原子吸光分析法は選択性が高く，IおよびII族元素をとくに高感度で定量できるので注目を集めている。本法による鉄鋼分析の試みは，元素についてはAl[1]，Cd[2]，Co[3]，Cu[4,5]，



神森大彦



田口 勇

Mg[6~10]，Mn[6,12~14]，Mo[6,15]，Ni[6,16,17]，Pb[6,10,18,19]，Zn[10]などが，鋼種については炭素鋼，鋳鉄，合金鋼などが報告されている。このほか，非鉄金属への適用例のうち，多少条件を検討すれば鉄鋼へも応用できると思われる元素にAg, Ba, Ca, Cr, K, Na, Rh, Snなどがある。

将来，本法が鉄鋼分析にどの程度実用されるかは鉄鋼分析関係者としてもっとも関心がある。現在鉄鋼分析に広く使用されている機器化学分析法は比色分析法（原子吸光分析法と区別しやすいようにここではこの言葉を使う）である。比色分析法と比較すると，本法は前述のように選択性が優れ，感度が高い特徴があるので，後述するように比色分析法では分析しにくいCa，Mg, Zn, Pbなどの分析にはとくに実用されるようになるだろう。

一方，本法の高い選択性を利用して鉄鋼試料を酸で分解しただけで，ただちに本法で分析して多数の元素を定量する試みもある。このような方法では前処理が簡単になり，所要時間が短縮できるなど，利点も多いが光源の取替えが現状では必要であり，また本法の選択性にも限度がある。

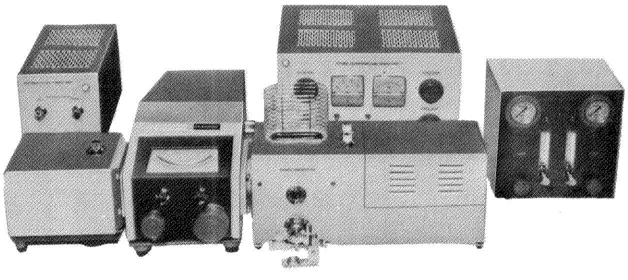
このように考えると，比色分析法に較べて著しい利点がある場合には本法が実用されることは間違いない。また直読式発光分光分析や蛍光X線分析などの高価で能率の高い装置を設置するよりも，比較的安価で割合，能率がよく，化学分析と併用しやすい本法の装置が望まれる場合もあろう。本法に適した分析元素と作業量がある場合には本法の実用化を考慮してもよいのではなかろうか。

以下は当所において本法を鉄鋼分析に適用する研究の一つとして行なった極微量のMg（1～70ppm）とZn（2～100ppm）の定量操作および検量線例（Fig. 1）である。本操作では，従来法が除鉄したのち定量する方法で繁雑だったので，抽出法を併用して定量感度を向上させ，さらに試料量を小にして共存する鉄を抽出時に酒石酸でマスクし，操作を単純化した。本操作では鉄鋼中に含まれる元素の影響は無視でき，約30分間で定量することができる。また検量線は標準溶液のみで作成することができ，MgとZnはほぼ同一の操作で定量することができる。下記の操作はMgの場合で，Znの場合は（ ）内に読み替える。なお，本操作とほぼ同一の操作で鉄鋼中の極微量のCa, Mn, Pbなどが定量できる。

定量操作　試料 0.1 g を100 mlのビーカーにはかりとり，1：1の硝酸10mlを加え，加熱分解したのち，さらに加熱をつづけ約2 mlまで濃縮する。冷却後，水を加えて約10mlとし，10%の酒石酸アンモニウム溶液10mlを加え，1：1のアンモニア水で溶液のpH を 8.5（8）に合わせる。100mlの分液ロートに移し，0.01（0.1）MTTA－MIBK溶液10mlを正確に加え，2（1）分間よく振とうする。有機層を5Aのろ紙でろ過しながら測定用セルに入れる。波長285.2 213.8）mμにおける吸収を測定して定量する。

なお，測定装置および条件はつぎのとおりであった。

装置：日立分光々度計139型および原子吸光付属装置139－0420型，魚尾状9 cmバーナー，
スリット幅0.05（1）mm



光源：日立製Ca－Mg（Zn）中空陰極ランプHLA－2，51177（51282），電流値20mA
フレーム：プロパン0.1 l/min. －空気4 l/min.

1）M. D. Amos, P. E. Thomas：Anal. Chim. Acta 32, 139（1965）.
2）L. Wilson：Anal. Chim. Acta 35, 123（1966）.
3）G. L. McPherson, J. W. Price, P. H. Scaife：Nature 199, 371（1963）［C. A. 59（9）9319（1963）］。
4）K. Kinson, C. B. Belcher：Anal. Chim. Acta 31, 180（1964）.
5）厚谷郁夫：分化 15, 247（1966）.
6）武内次夫，鈴木正己：“原子吸光分光分析法”南江堂 P. 82（1964）.
7）C. B. Belcher, H. M. Bray：Anal. Chim. Acta 26, 322（1962）.
8）鈴木正己，武内次夫：工化 66, 690（1963）.
9）後藤秀弘，池田重良，厚谷郁夫：分化 13, 111（1964）.
10）神森大彦，田口 勇，吉川建二：日本鉄鋼協会昭和42年度春期大会講演予定.
11）W. T. Elwell, J. A. F. Gidley：“Atomic Absorption Spectro photometry”, Pergamon Press P. 79（1961）.
12）鈴木正己，武内次夫：工化 67, 1207（1964）.
13）C. B. Belcher, K. Kinson：Anal. Chim. Acta 30, 483（1964）.
14）厚谷郁夫：分化 15, 672（1966）.
15）D. J. David：Analyst 86, 730（1961）.
16）武内次夫，鈴木正己，道木英之：工化 66, 1194（1963）.
17）K. Kinson, C. B. Belcher：Anal. Chim. Acta 30, 64（1964）.
18）W. T. Elwell, J. A. F. Gidley：“Atomic Absorption Spectro photometry”, Pergamon Press P. 64（1961）.
19）W. T. Elwell, J. A. F. Gidley：Anal. Chim. Acta 24, 71（1961）.

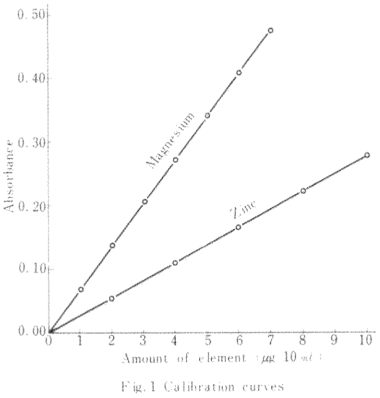
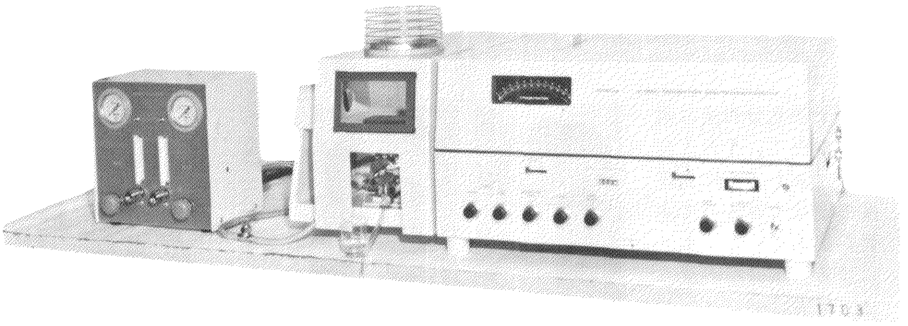


Fig. 1 Calibration curves

* 八幡製鉄株式会社　東京研究所

■207形日立原子吸光分光々度計について

内野興一* 大石公之助** 猪俣博* 久保義隆*



1955年，A.Walshによって原子の共鳴線の光吸収を利用しての金属分析法が提案されて以来，原子吸光分析法として理論面，実用面において多くの研究がなされて来た。原子吸光分析法は標準添加法が可能なこと，干渉が少く，また，あってもその除去が簡単なこと，さらに，水はもちろんのこと，どのような有機溶媒でも使用できる，などがあきらかになった。このため，金属分析の各分野で注目され，現在，各国において原子吸光分析装置が金属工業，臨床化学，食品工業等々の分野で盛んに日常の分析用として使われるようになった。

原子吸光分析法は，他の分析法に比べて前処理が簡単で熟練度はそれほど必要とされないところから，日常の分析にむく分析法と云えるのであるが装置とした場合，高感度であることはもちろん，操作が容易なこと，及び，測定後のデータ処理が簡単であることなどが要求される。このためわれわれは次のような点を重要視してこの装置の開発を行った。

1．ランプの点灯方式

フレームによる試料の発光が導入されないためには光源からの光を変調しておいて検知器からの出力のうち交流成分のみを増巾してメーターに指示される必要がある。光源を直流で点灯しておき，機械的に光束をチョッピングする方法はモーター，チョッパーなどが増え，利点の少いことから，交流点灯方式をとり，光源の光を変調するようにした。そして光の安定性の点から電力は矩形波で与えるようにした。変調周波数を25c/s以上にすればフレーム・エミッションの強さは非常に低くなり，1000c/sまではほとんど変らないこと，また，誘導に対する強さという観点から変調は商用周波数とした。

2．ランプの予備点灯

目的元素ごとに光源ランプが異なるということは分析法における選択性という点では非常に優れた特長であるが，これは同時に欠点ともなりうるものである。すなわち，分析する元素を例えばマグネシウムから鉄に変えた場合，光源ランプもマグネシウムから鉄に換える必要があるわけである。しかしランプは点灯してからしばらく待たねばならないから，いくつかの元素を定量したい場合，測定時間のほかに，試料の数に関係なく，一定の待時間が必要になる。このため，207形原子吸光分光々度計ではターレット式のランプホルダーにランプを3本取り付けられ，その上，これらを同時点灯可能にして，目的元素の切換えの簡易さ，および，待時間の節約を画った。また，さらに，第1図のような複合元素形の光源ランプを用いれば3元素以上にわたってこれが可能である。

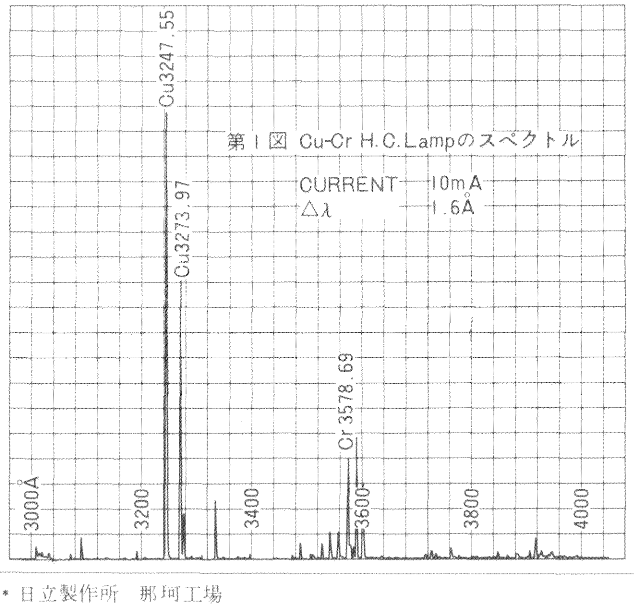
3．バーナー

光束を折り返して，幾度もフレーム中を通すことによって検出感度を向上させることが可能である。しかし，これが有効であるのはせいぜい3回が限度であること，また，装置におけるバーナーの配置とも考え合わせて2回とした。バーナーによる熱から分光器，増巾器などを遠ざけるという意味からも，さらに，他種バーナーと取り換える容易さ，将来，種々なバーナーが開発された場合の可能性といった面からもバーナーは装置の端の方に位置していることが望しいのでバーナーを始め，各部のポジションを決定した。

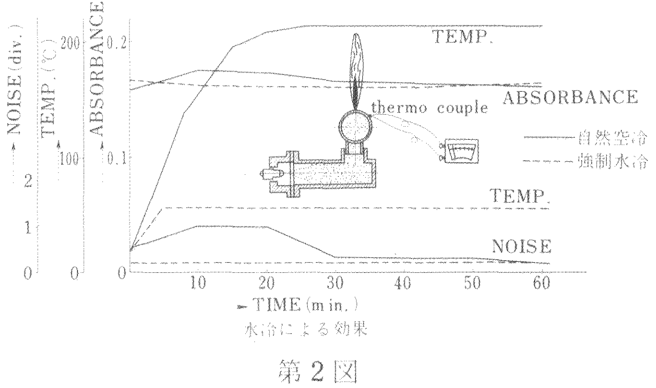
バーナーを点火してからバーナーヘッドの温度が一定となるまでの間は，第2図に示すようにノイズ，および，再現性がやや劣っている。これを避けるためバーナーは水冷式とした。

4．分光器

ランプの寿命はその放電々流と密接な関係があり，また，検



第1図 Cu-Cr H.C.Lampのスペクトル



第2図

* 日立製作所 那珂工場
** 日立パーキンエルマー株式会社

出感度，安定性などの点からもランプは低電流で使用する方が望しい。低い放電々流でも充分な光量が検知器まで到達するよう，分光器はF7.5と，大変明るいものにした。

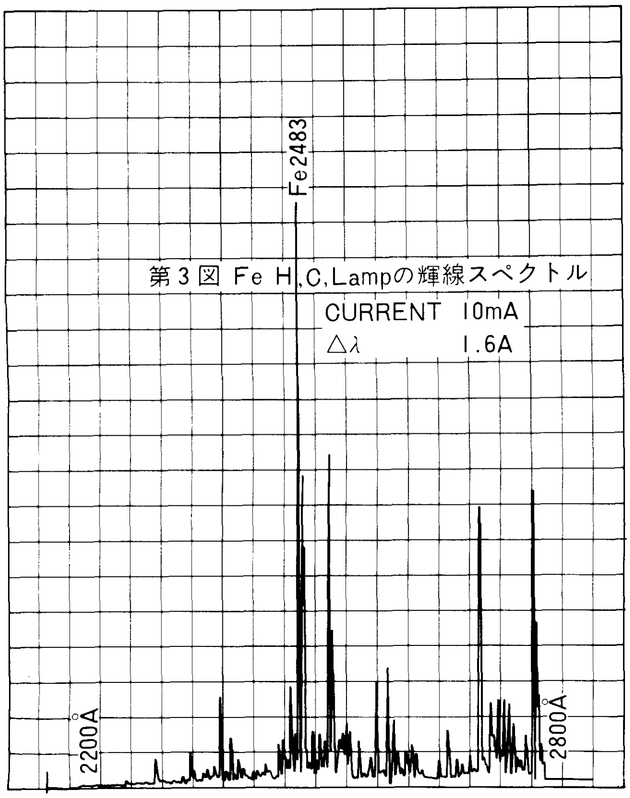
光源に用いる放電管の輝線スペクトルの一例として鉄を第3図に示す。分析に使用する，2483A°のすぐ近くに鉄自身の輝線が出ているがこれらは分析に際して障害となるものである。従って,207形原子吸光分光々度計ではこのような近接線を充分，分離できるよう分光器は分散度18A°／mmと，高いものにした。

5．読み取り

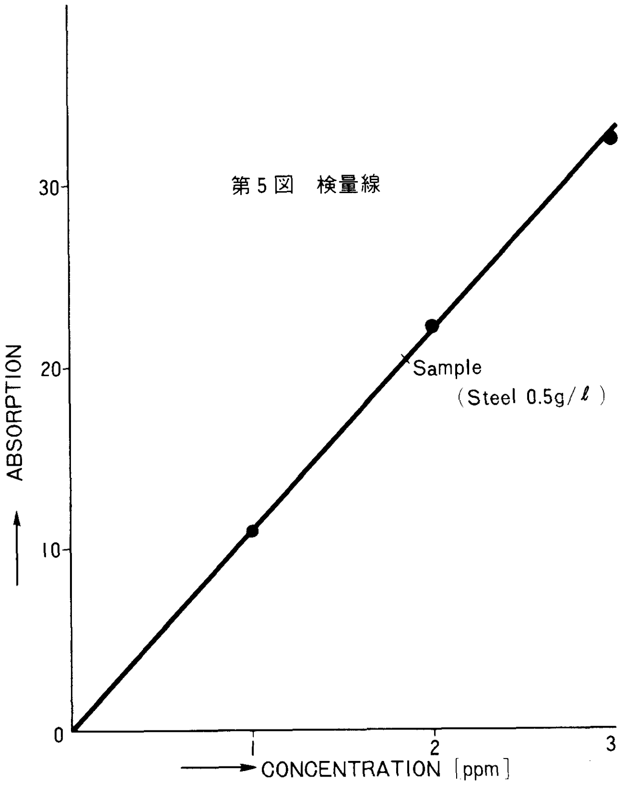
原子吸光分析法は吸光測定であるから指示は対数で出てくることになる。したがって指示計が%目盛であれば対数換算の必要がある。207形原子吸光分光々度計では電気的に対数換算して，このようなわずらわしい操作をしなくてすむようにした。すなわち，本装置での指示は第4図のようであり，吸収の読み取りをそのまま書き込めば良い。第5図にその例を示す。

6．スケール拡大

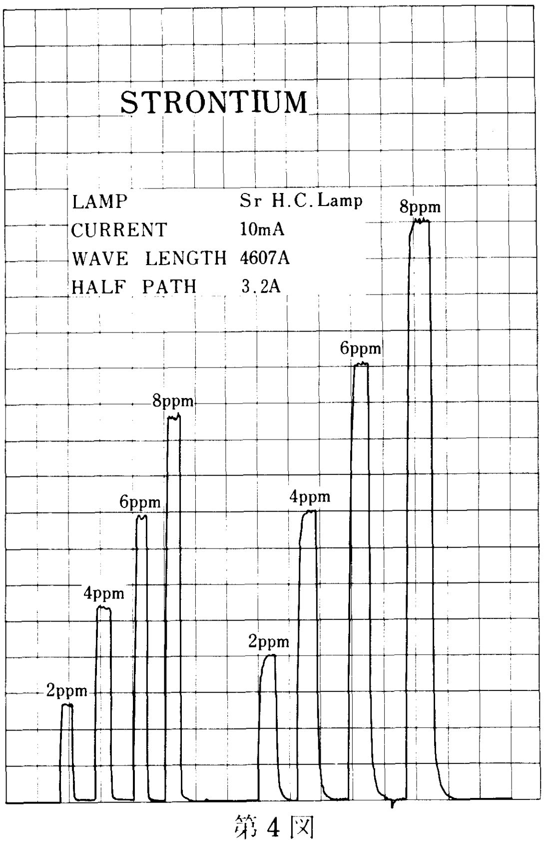
×2～×20まで連続的にスケールを拡大することができるようにした。したがって濃度が低い場合には大きく拡大して読みとることができる。その様子は第6図に示す通りである。また，吸光度リニア方式と相まって濃度直読も可能である。



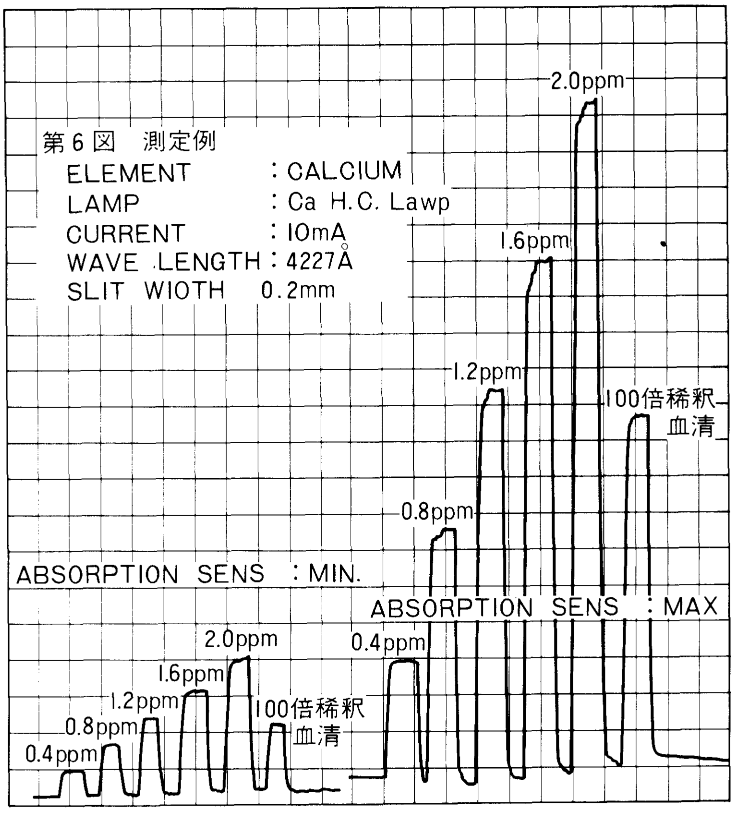
第3図 Fe H.C.Lampの輝線スペクトル



第5図 検量線

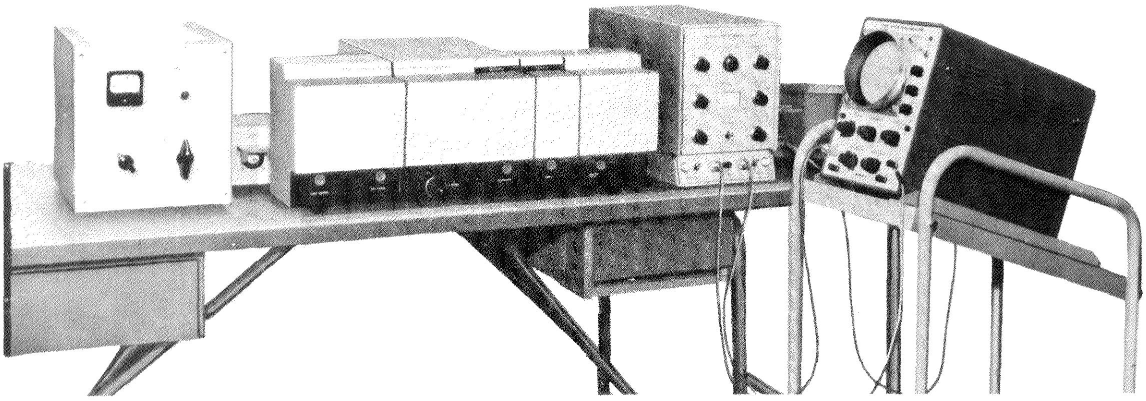


第4図



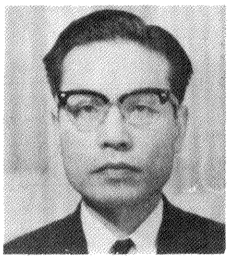
第6図 測定例

ラピッドスキャン形分光々度計 特集



■ラピッドスキャンということ

馬 場 宏 明*



速いとか長いとかいう言葉は，もともと相対的な意味を持っているに過ぎない。「長い一生から見れば…」，「人生は短く…」というように，比べる相手次第で長くも短かくもなる。それにもかかわらず，この種の語句は比較すべき対象を明らかにしないで気ままに用いられることが少なくない。日常的にはそれでも大した不都合なしにすむかも知れないが，厳密さを生命とする科学・技術の用語としては，言葉の真の意味を理解し，明瞭な定義を下す用意が必要であろう。

たとえばラピッドスキャン形スペクトロメーター（高速走査形分光々度計）というものがある。この場合の"高速"とは何を意味するか，必ずしも明らかではない。遠赤外領域では，1走査に15分かかるスペクトロメーターでも，ラピッドスキャン形と呼ばれている。分光々度計が科学的な測定器の1種であるからには，高速の意味についてもそれなりの吟味をしておくことが望ましいであろう。

本稿では，近く世に送られようとしている紫外・可視用の日立ラピッドスキャン形分光々度計ＲＳＰ－２形について考えてみる。この光度計は，紫外220mμから可視700mμにわたる吸収スペクトルを，0.15秒でブラウン管上に画く。ここで0.15秒という走査時間が高速の名に値するかどうかが，さし当っての問題である。以下５つの観点から検討してみよう。

1．従来のものと比べての速さ

当然のことながら，これまでの分光々度計と比べて速いかどうかがまず問題となる。光電式の分光々度計として最初に普及したのは，ベックマン分光々度計を代表とする手動形の光度計である。これは，一つずつ波長を選んで，それに対する吸収量を求め，これらの測定点をつないで吸収曲線をつくるという方法である。他の方式に比べて装置が安価であり，精度もよいので，現に広く使われているが，紫外・可視にわたる一つの吸収スペクトルを得るには，１時間もの時間を必要とする。つぎに現われたのは，自動記録形の分光々度計で，これにより測定時間はかなり短縮された。しかし，この形の光度計は機械的にペンを動かすという機構を含んでいるので，先の吸収スペクトルを得るのになお10分程度を必要とする。

ラピッドスキャン形のＲＳＰ－２形の場合，吸収スペクトルは電子ビームによってブラウン管上に画かれる。紫外・可視の全波長域を走査するのに要する時間は，前述のように，0.15秒である。図１は，アントラセンの吸収スペクトルのうち近紫外の部分を，ＲＳＰ－２形で測定した結果である。

以上要するに，手動形は時間のオーダー，自動記録形は分のオーダーの測定時間を必要とするのに対し，ＲＳＰ－２形の所要時間は0.1秒のオーダーであって，従来品に比べて測定は1000倍程度速くなっている。それに応じて，測定能率が向上し，労力が軽減されることは明らかである。

2．高速化によって実際上可能になったことの有無

第二の観点は，測定の高速化が単純な能率向上，労力の軽減以上の効果をもたらすかどうかということに関する。この問題に入るまえに，計算機の場合を考えてみよう。自然科学や技術の領域では，手回し計算機で50年もかかる複雑な計算が現われることは珍らしくない。このような計算を手回し計算機で行なうことは，原理的に可能であっても，実際には実行されないであろう。一つの計算に一生をかけるということは，まずありそうもないからである。しかし，電子計算機は，同じ計算を数日のうちに仕上げてしまう。電子計算機の出現は，単に計算の能

＊北海道大学　応用電気研究所

率を高めただけでなく，それまでの計算機では実際上不可能であった計算を可能にしたという点に，一つの大きな意味を持っている。

いま，集団検診や製品の検査などで，1000個の試料の吸収スペクトルをひんぱんに測定する必要があるとしよう。自動記録形の分光々度計による場合，測定時間は延べ10分×1000≒170時間にもなるので，このような多数試料の測定は実際上行なわれ難いであろう。しかるにＲＳＰ－２形によれば，上の170時間に相当する時間がわずか２～３分になってしまう。いいかえれば，ラピッドスキャン形の場合，スペクトルそのものを得るに必要な時間は無視してよいので，試料の調整や結果の判定に手まどらない工夫ができれば，多数試料の処理も実際に可能となるのである。

3．制御の立場から見た速さ

再び計算機の例をとろう。ロケットを月に命中させるための重要な仕事の一つは，発射後ロケットの位置と速度とを観測し，必要な計算を行なって，軌道の修正を行なうことである。その際，ゆっくり計算していたのでは，答が出ないうちにロケットはあらぬ方に行ってしまうであろう。電子計算機を用いた迅速な計算によって，はじめて意味のある軌道修正が可能となる。

一般にある速さで進行している現象を有効に制御するためには，その現象に比べて十分に速い速度で現象の状態を知ることが本質的に必要である。いま化学工場で反応が進行していると仮定し，この反応の状態が，反応物質のスペクトル分析によって知られるとする。ラピッドスキャン形によれば，この分析は瞬時に終ってしまうので，直ちに反応の制御に進むことができる。一方この分析に手まどれば，制御はそれだけ遅くなる。工場規模の生産では，10分程度の遅れでも，大きなロスの原因となる。

4．人間の応答時間に比べての速さ

たとえば，上に述べた工場での反応の制御が，人の手によってなされるとしよう。この場合，スペクトル測定の時間が，0.01秒，0.001秒というように，むやみに短くなっても大した意味はない。何となれば，スペクトル曲線を見て反応の状況を判断したり，その結果に応じてバルブを開閉したりするのに，秒のオーダーの時間を必要とするからである。人間が判断し動作する時間を人間の応答時間と呼ぶことにすれば，この応答時間は１秒程度であって，どのように短く見積っても0.1秒以上であろう。

上の例から類推されるように，一般に測定の迅速性を問題とするとき，測定に要する時間が人間の応答時間と比べて短いかどうかということが，判定の一つの基準となる。この立場から見れば，0.15秒という走査時間は，ラピッドスキャンというに値する。

5．変化過程追跡の立場から見た速さ

最後に，化学反応のごとき自然界に生ずる変化過程を時間的に追跡する立場から考えてみる。従来の分光々度計は，化学的に安定な試料の吸収スペクトルを測定することを目的としていたといえる。これに反して，ラピッドスキャン形は，反応追跡を一つの大きな目標としている。実際，これによってスペクトル測定が速くなった結果，従来取扱いにくかった速い反応の追跡が可能となった。本号にはその二，三の実例が掲載されている。しかし，ここでもまた速さは相対的な意味しか持ち得ない。爆発反応を考えてみれば容易に推測されるように，化学反応にはきわめて速く進行するものがいくらもあり，10^{-6}秒位で終ってしまう反応も珍らしくない。この種の反応を追跡するには，0.15秒という走査時間では遅すぎるという他はない。* すなわち，自然に起る高速反応を追跡する立場からは，際限のない測定の迅速化が要求されるのである。

以上，極端に速い反応の測定を除外すれば，ＲＳＰ－２形の走査時間0.15秒は，ラピッドスキャンという名に値すると結論してよいであろう。

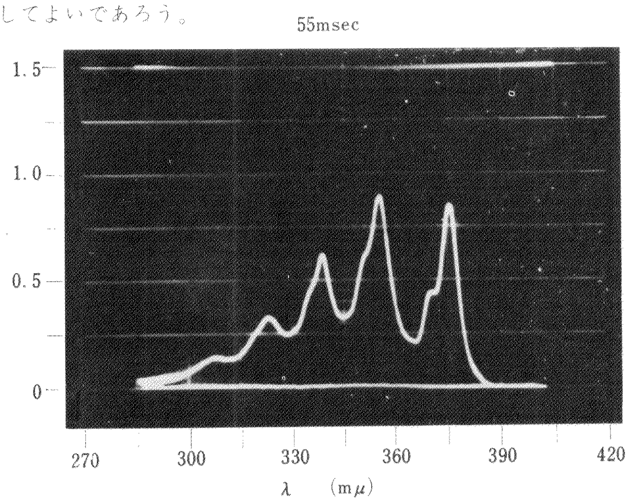


図１．ラピッドスキャン形分光々度計によって測定したアントラセンのイソオクタン溶液の近紫外部吸収スペクトル。（λは波長，Aは吸光度。）この写真に現われている波長域についての走査時間は55msecである。
アントラセン濃度，1.07×10^{-4}mole/ℓ；セルの厚さ，10mm。

*ただし，いわゆる continuous flow method を採用すれば，この走査時間でも10^{-3}秒程度の速い反応の研究に有効であると予想される。

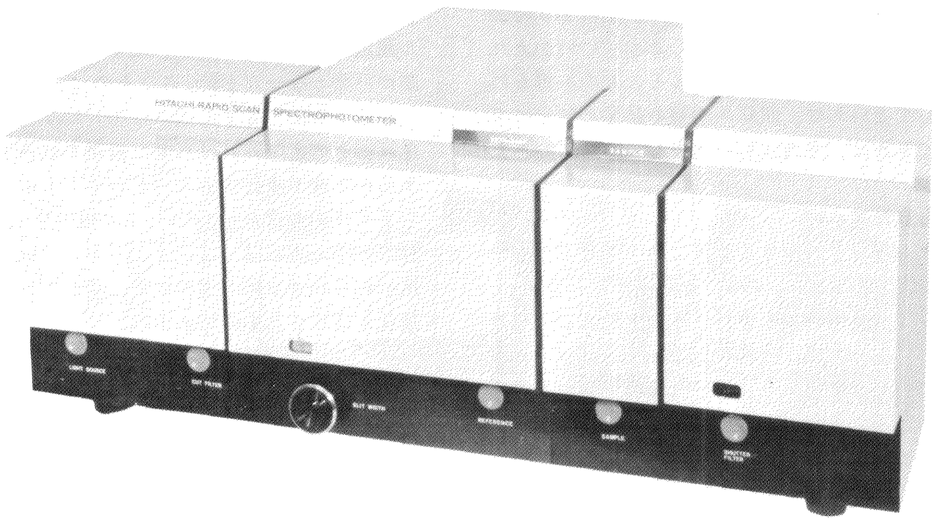
ＲＳＰ－２形　日立ラピッドスキャン形分光光度計

仕　　様

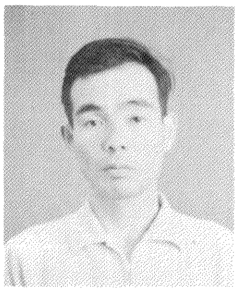
光　源	タングステンランプ（可視域）クセノンランプ（紫外可視域）
分光器	複光束　回折格子分光器
検知器	光電子増倍管（２個）
表示装置	日立シンクロスコープ（メモリスコープも使用可能）
測定モード	透過率（0～100%）　吸光度（0～1.0）エネルギー
波長走査時間	0.15秒（繰り返し周波数３サイクル）
測定波長域	220～700mμ
スリット幅	0.01～３mm 可変（測定中は一定）
分解能	１mμより良好
測定精度	±２％
寸　法	分光器　700（幅）×245（高）×452mm（奥） コントロールユニット　220（幅）×310（高）×450mm（奥） シンクロスコープ
消費電力	AC 100V　50，60 c/s　約 600VA

■RSP-2形 日立ラピッドスキャン形分光々度計によるアントロンの異性化反応の追跡

馬場宏明＊　　竹村　健＊



1. まえがき



竹村　健

化学反応の経過を時間的に追跡する方法はいくつかあるが，分光化学的方法はその典型として今日広く使われている。しかし，必要な波長域を走査する時間に比べて反応が速く進行する場合には，スペクトルそのものを反応追跡に用いることができず，単色光の波長を固定して吸収強度の変化を調べる方式に頼らざるを得ない。この固定波長の方法によれば，可視・紫外域に関するかぎり10^{-6}秒程度の速い測定も容易に行なわれるという利点はあるが，この方法で観測されるものは，その波長における吸光度というただ一つの量に限られる。しかもこの量は，反応系に含まれるいろいろな分子種に対応する量の総和を与えるに過ぎないので，これをもとにして反応過程でつぎつぎと生成消滅する分子の種類と量とを一義的に定めることは望めない。これに反して，スペクトル全体が刻々に得られるならば，上のような固定波長の吸光度が無限個与えられたのと同じ効果が生じ，反応の定性と定量とを同時にかつ完全に行なうことが原理的に可能となる。

アントロンとアントラノールとは，よく知られたケトーエノールの互変異性体である。340mμから420mμの波長域でアントロンの吸収はきわめて弱いが，アントラノールは同じ領域に強い吸収を持っている。炭化水素溶媒中ではこの異性化反応は非常に遅いので，手動形分光々度計によっても必要なスペクトルをとりながら反応追跡を行なうことができる。しかるに，上の炭化水素溶媒に塩基性物質を加えると，反応は触媒的に加速され，10秒位で反応の半ばが終り，数分で平衡に達してしまう。したがって，自動記録形の分光々度計を用いてもこれを追うことは不可能である。ラピッドスキャン形の分光々度計の出現によって，この種の比較的速い反応を手軽に研究する道が開けたわけである。

先にわれわれは北大においてラピッドスキャン形の分光々度計を試作し[1]，アントロンの異性化反応を観測して，その結果を予備的に報告した[2]。その後この分光々度計は，新技術開発事業団を経て[3]，日立製作所において開発が進められ，最近，日立ラピッドスキャン形分光々度計ＲＳＰ－２形の試作装置が完成した。そこでこの試作装置を用いて改めて同じ異性化反応を調べたので，その結果を速報する。（なお，本号所載の他の二つの稿において扱われている反応も，同じ試作装置を用い，以下本稿に述べるのと同様な操作によって研究されたものであることを付記する。）

2. 装　置

分光々度計としては，既述のように，日立ラピッドスキャン形分光々度計ＲＳＰ－２形を使用した。スペクトルの表示にはメモリスコープを用い，そのブラウン管上に必要数だけのスペクトルを画かしめ，その結果を市販のポラロイドカメラによって撮影した。

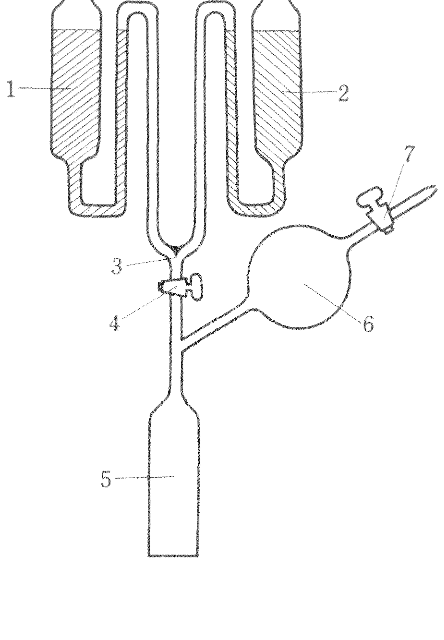


図１．混合セル

＊北海道大学　応用電気研究所

さてこの研究では，2液の混合によって開始される反応を時間的に追跡する必要があるので，つぎの二つの装置を製作使用した。

(1)混合用セル

(2)必要な波長走査に対応する吸収スペクトルを抜き出す装置[4)]

後者は反応開始後の経過時間の測定をもかねる。

まず混合用セルは，図1に示すような構造を持っている。吸収セル5は，ふつうの10㎜の石英セルで，その上部はアラルダイト接着によってガラス管につながれている。2種の液を1および2の部分（それぞれ約5ccの容量）に入れておく。コック4を閉じ，コック7を開けて真空ポンプにつなぎ，吸収セル5およびガラス球部6よりなる系を真空にしてから，コック7を閉じる。この状態でコック4を開けば，大気圧によって1，2に入れた液は押出される。3に達したとき両液は混合して反応が開始する。その後，混合液は落下してセル5を充し，余分の液は溢れて6に入る。

RSP－2形は⅓秒の周期で，すなわち1秒3回の割合で吸収スペクトルを与える。実際には，1サイクルに要する時間の約半分の時間（正確には0.14秒）で短波長から長波長への走査が行なわれ，一つのスペクトルがブラウン管上に画かれる。ここではメモリスコープを用いたので，蓄積管と呼ばれる特殊ブラウン管にスペクトルが画かれ，その像は長時間保存される。反応進行によって吸収スペクトルが変化しつつある場合に，各走査ごとのスペクトルを全部ブラウン管上に画かせるならば，管面のスペクトル像は重畳して無意味な結果となることは明らかである。そこで，電子式カウンターの機構を利用して，任意の必要な時間に行なわれる波長走査に対応するスペクトルのみがブラウン管に画かれるようにした。また，ホト・トランジスタを用いて試料液の流動を電気的パルスとして取出すことにより，反応開始後最初の波長走査が行なわれるまでの時間を電気的に表示できるようにした。

3．測定と結果

試料は，(1)アントロンのイソオクタン溶液；(2)トリエチルアミンのイソオクタン溶液の2液よりなる。測定温度は室温，～20℃。上の2液混合の直後，すなわち反応開始時における混合液中のアントロンとトリエチルアミンの濃度は，それぞれ，1.4×10^{-3} mole/ℓ，0.9mole/ℓである。

混合液中で進行するアントロンの異性化反応をRSP－2形で追跡した結果を図2に示す。エノール型の増すにつれて，明瞭に吸収が増している。反応時間 t が20秒より短い範囲では，装置の項で述べた方式によって t を求めた。詳細は略するが，この方式により，各スペクトルの任意の波長における t を容易に定めることができる。また20秒以上の t の測定はストップウォッチによった。

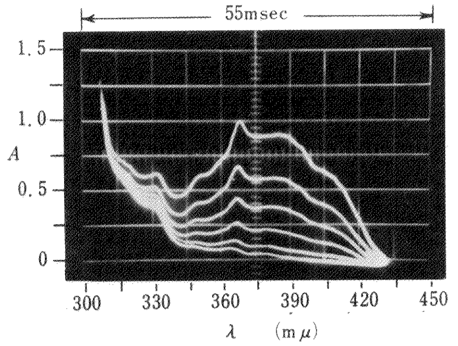


図2．アントロンからアントラノールへの異性化反応の追跡。下方から上方への各スペクトルの375mμ の波長位置は，それぞれ反応開始後0.54秒，1.87秒，4.87秒9.87秒，20秒，120秒に相当する。
（λは波長，Aは吸光度）

4．解　析

いま図2において二つの波長を選び，吸光度 A を t に対してプロットしてみると，図3のように滑らかな曲線が得られ，測定が定量的に行なわれたことが推察される。

そこで，反応を速度論的に解析するために，図4のごとき可逆反応を考える。反応はトリエチルアミンの存在により2次反応として進行するが，アミン量がアントロンの量に比してはるかに大きいので，見かけ上一次反応として取扱うことができる。また実際には生成したアントラノールの大部分はアミンとの水素結合体を形成すると考えられる。以上の諒解のもとに，アントロンの初濃度を a，エノール型の生成量を x とすれば，速度式は

$$\frac{dx}{dt}=k_1(a-x)-k_2x \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(1)$$

となる。

平衡に達したときの x を x_e で表わせば，$k_1(a-x_e)=k_2x_e$

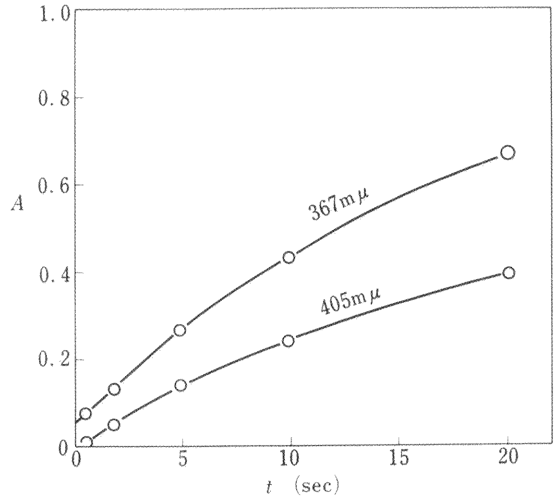
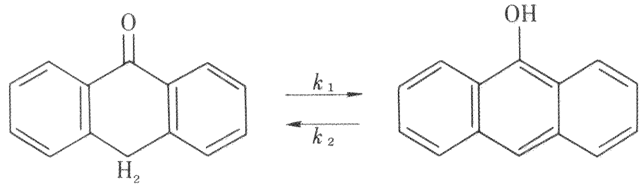


図 3.



アントロン　　　　アントラノール

図4.

の関係が成立つ。この点を考慮して解析すれば，

$$\log\frac{x_e}{x_e-x}=\left(0.434\frac{a}{x_e}k_1\right)t \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(2)$$

を得る。ここで $t=0$ のときの A を A_o，t が十分に大きくて，事実上平衡に達したと考えられるときの A を A_e で表わすと，$x_e=\text{Const.}\times(A_e-A_o)$，$x_e-x=\text{Const.}\times(A_e-A)$ とおける。したがって，

$$\log\frac{A_e-A_o}{A_e-A}=\left(0.434\frac{a}{x_e}k_1\right)t \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(3)$$

となる。(3)式の右辺のかっこ内の値を c とおけば，c は一定値であるべきだから，(3)式の左辺の値を t に対してプロットするとき，原点を通る直線が得られるはずである。

この測定では，$t=0$におけるAの値は直接に求められていないので，図3から外挿によってA_0を定めた。またA_eとしては，t=120秒の値を使う。このようにして(3)式の左辺を計算し，tに対してプロットすれば，図5に示すように，予想通り原点を通る直線が得られ，その直線性はきわめて良好である。この図には367mμのA値を解析した結果が示されており，直線の傾斜から$c=0.023\mathrm{sec}^{-1}$と定められる。同様にして，405mμのデータからは，$c=0.021\mathrm{sec}^{-1}$が得られる。このようにして，いろいろな波長について，ほぼ一定のc値が求まるので，反応は単純なアントロンからアントラノールへの異性化であると結論することができる。なお，このcの値から異性化の速度定数が求められることはいうまでもない。

文　　献

1）馬場宏明，進藤善雄，応用電気研究所彙報，15，107(1963)
2）H. Baba, T. Takemura, Bull. Chem. Soc. Japan, 37, 1241 (1964)；馬場宏明，化学と工業，17，1013(1964)
3）新技術開発事業団委託開発第26号。
4）進藤善雄，馬場宏明，他に発表予定。

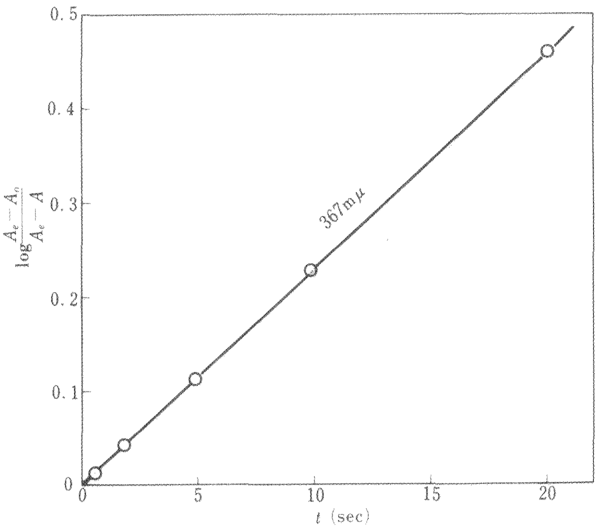


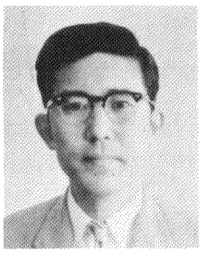
図 5.

■RSP-2形 日立ラピッドスキャン形分光々度計による p-ニトロフェニールヒドラジンのアルカリ分解反応の観察

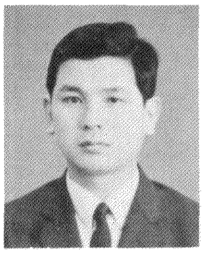
木村道也*　仁科甫啓*

1. まえがき

p-ニトロフェニールヒドラジンがアルカリによって速やかに分解され，窒素ガスを放出しながら，主としてニトロベンゼンと少量のp-ニトロフェノールになる



木村道也



仁科甫啓

ことが先に観察されている。この分解の際，反応液は一旦呈色するが，わずか数秒の間に褪色してしまい，従来の装置ではこの呈色の吸収曲線を測定することは困難であった。ラピッドスキャン形分光々度計を用いることによって測定が可能になった。

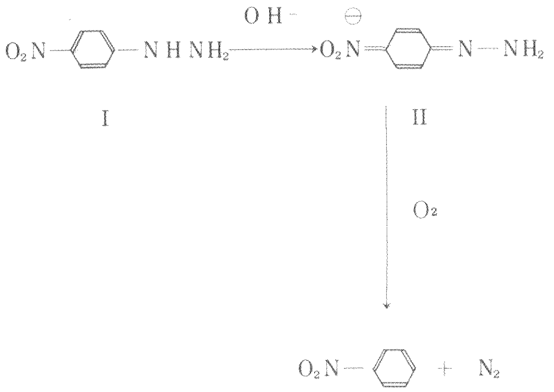
2. 実　　験

装置としては日立ラピッドスキャン形分光々度計RSP－2形を用いた。

試薬は，(1) 100 μg のp-ニトロフェニールヒドラジンをジメチルホルムアミド5 mlに溶解したもの；(2)N/100，NaOH 水溶液0.2 mlを含むジメチルホルムアミド5 mlの2液よりなる。(1)および(2)の各溶液を混合セル（馬場研究室製）の別々のサンプル管に入れたのち，両液を混合して反応を開始させ，スペクトルの測定を行なった。結果は図1に示す。

3. 結果と考察

p-ニトロフェニールヒドラジンIは，ジメチルホルムアミド中で，394mμに吸収極大を有している。これにアルカリを加えた場合，添加后0.35秒の測定で，すでに394mμの吸収はなく，480mμに新しく吸収が生じている。ついでこの吸収が減少していくのが観察される。これより下記のような分解が行なわれていると推定される。



一方，480mμの吸収はIIの寄与構造によるものと考えられる。また，0.35秒后にすでに394mμの吸収がないことは，このアルカリによる反応はまずイミノ水素の脱離の反応であって，求核置換反応による水酸イオンのベンゼン核への攻撃ではないことが推察される。

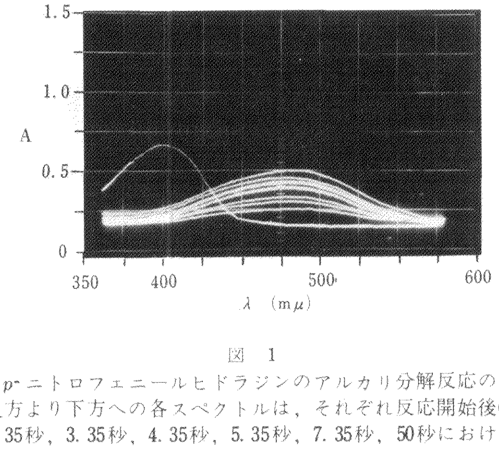


図 1

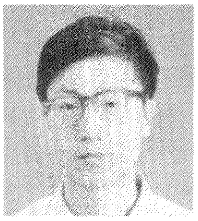
図1．p-ニトロフェニールヒドラジンのアルカリ分解反応の追跡。上方より下方への各スペクトルは，それぞれ反応開始後0.35秒1.35秒，3.35秒，4.35秒，5.35秒，7.35秒，50秒におけるものである。（λは波長，Aは吸光度。）

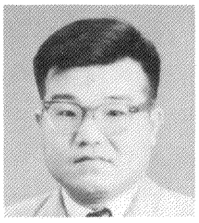
* 北海道大学　薬学部　薬学科

■RSP-2形 日立ラピッドスキャン形分光々度計によるペルオキシダーゼとハイドロサルファイトと酸素との反応の解析

山崎勇夫＊ 田村 守＊ 横田健之助＊

1. はじめに


田村 守


横田健之助

還元ペルオキシダーゼ（フェロ型）は酸素と反応してオキシミオグロビンに類似したオキシフェロペルオキシダーゼ（CompoundⅢ）を形成することを最近私共は確認した。この単純な反応は従来多くの研究者によって行われてきたが，結局フェロペルオキシダーゼは酸素によって直接フェリペルオキシダーゼに酸化されるという間違った結論を与えていた。Compound Ⅲ の安定度は実験条件によって微妙な影きょうをうけ，特にペルオキシダーゼの還元に用いたハイドロサルファイトが残存している場合には，通常Compound Ⅲの観測は難しい。ラピッドスキャン形分光々度計による実験はその事実を的確に伝えてくれる。Compound Ⅲ が明瞭に観測されるのは，過剰のハイドロサルファイトの存在しない状態でフェロペルオキシダーゼが酸素と反応した場合で，そのとき生成したCompound Ⅲはかなり安定である。しかし，ハイドロサルファイトと酸素とが共存するときには，実験Ⅰ及びⅡに示すように非常に異なった結果を与える。

2. 実 験

装置としては日立ラピッドスキャン形分光々度計ＲＳＰ－２形を用いた。

実験Ⅰ：混合セルの一方にフェロペルオキシダーゼ(1.25mM ハイドロサルファイト溶液，pH 5)，他方には空気と平衡にある緩衝液（pH5）を入れておき，両者を混合して反応を開始させる。そして混合してから

0.4秒(Ａ)，1.4秒(Ｂ)，2.4秒(Ｃ)，10.4秒(Ｄ)

後における反応液の吸収スペクトルをとった。これら４つのスペクトルをそれぞれＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄと名付ける。測定結果は図１に示す。

実験Ⅱ：純酸素を飽和させたペルオキシダーゼ溶液３ccに，注射器でハイドロサルファイト0.1ccを加える（この実験では混合セルは使用しなかった）。そしてハイドロサルファイトを添加してから

0.4秒(Ａ)，2.4秒(Ｂ)，4.4秒(Ｃ)
6.4秒(Ｄ)，30.4秒(Ｅ)

後における反応液の吸収スペクトルをとった。これら５つのスペクトルをそれぞれＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄ，Ｅと名付ける。測定結果は図２に示す。

3. 結果と解析

実験Ⅰでは，フェロペルオキシダーゼFe_p^{2+} （吸収極大 437 mμ，図１のスペクトルＤに相当）に酸素を混合した際に，ハイドロサルファイトの量が酸素より多かったので，最終的に得られたものはやはりフェロペルオキシダーゼであった。しかし途中で403mμ に吸収極大を持つフェリペルオキシダーゼが数秒間出現したことが，図１から知られる。すなわち反応機構は

$$Fe_p^{2+} \xrightarrow{O_2 \ll S_2O_4^{--}} Fe_p^{3+} \xrightarrow{S_2O_4^{--}} Fe_p^{2+}$$

なおこの条件ではCompound Ⅲは現われない。

つぎに実験Ⅱは，ペルオキシダーゼFe_p^{3+} と酸素とが存在する液に$S_2O_4^{--}$ を少量加えたもので，最初と最後はFe_p^{3+} （吸収極大403mμ，図２のスペクトルＥに相当）であるが，途中で明らかにFe_p^{3+}とは異る中間体が現れていることが図２から知られる。よってこの場合の反応機構は

$$Fe_p \xrightarrow{O_2 \gg S_2O_4^{--}} 新中間体 \longrightarrow Fe_p^{3+}$$

この新中間体は，400～500mμ の間の吸収像はCompound Ⅰといわれるものに似ている。この新中間体の性質については未だくわしく調べていないが，この種の実験はこれまで技術的困難から手がつけられていなかったものであって，今後ラピッドスキャン形分光々度計に負うところが大であると考えられる。

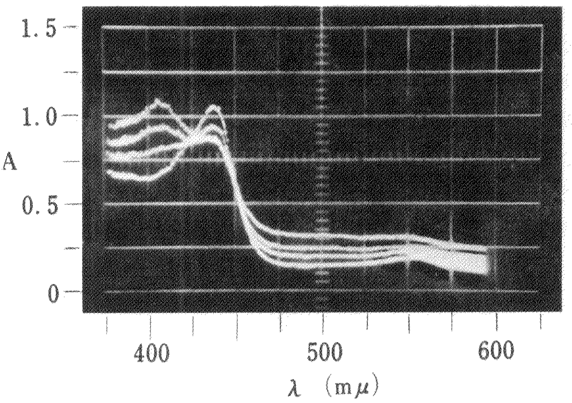


図１．ペルオキシダーゼ反応の追跡（実験Ⅰ）。本文記載のスペクトルＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄは，400mμおよび500mμ付近においては上方より下方へ，440mμ付近においては下方より上方へ至る。（λは波長，Ａは吸光度。）

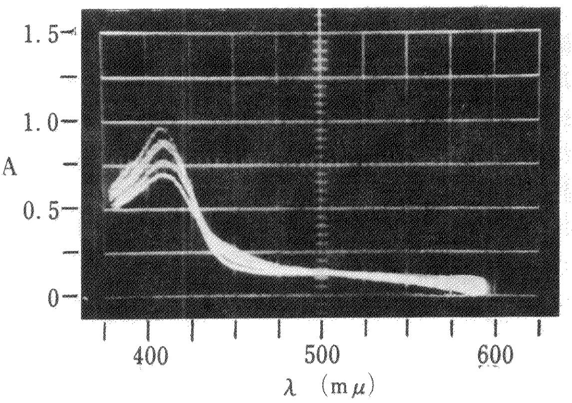
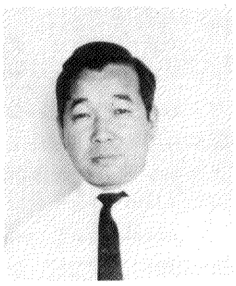


図２．ペルオキシダーゼ反応の追跡（実験Ⅱ）。本文記載のスペクトルＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄ，Ｅは，400mμ付近においては下方より上方へ，450mμ付近においては上方より下方へ至る。（λは波長，Ａは吸光度。）

＊北海道大学 応用電気研究所

■ラピッドスキャン形分光々度計とエレクトロニクス

進藤善雄*



ラピッドスキャン形分光々度計の最大の特長は，従来の自記分光々度計等に比して波長走査速度が1000倍も大きいということにあります。これは人間の歩く速さとジェット機位の速さとの差で，測定回数が多くて普通の分光々度計では1年以上かかるような仕事も2，3日で片付くことになり，今まで不可能であった測定，新しい研究，従来の分光測光の能率向上等に有用と思われます。

分光測光を迅速化することは，測定器やから見ると，大略二つの目的があるように思われます。その一つは反応過程のごとく吸収スペクトルが時間とともに変化する現象を測定する場合で，波長走査は現象の変化に比し短い時間で行なわれる必要があります。しかし吸収スペクトルの真の値は，必要に応じ長時間をかけて補正換算してもよい場合が多く，半迅速とも言えます。第二は測定に要する全時間を短縮することで，吸収スペクトルは真の値が読みとりやすく直示されることが必要となります。人間の応答速度を基準にすると，0.1～0.2秒で吸収スペクトルが画かれれば，瞬時に測定が行なわれ表示されたように感じられます。

以上の考察をもとにすれば，ラピッドスキャン形分光々度計の具備すべき性能はつぎのようになります。

(1) 0.1～0.2秒で吸収スペクトルが直示されること。
(2) スペクトルの表示は毎秒1回以上行なわれること。
(3) 波長，透過率，吸光度は等間隔目盛であること。
(4) 透過率100%に対応する線は波長により変化しないこと。
(5) 溶媒等による吸収の補正も可能なこと。
(6) 吸収スペクトルの比較が容易なこと。
(7) 紫外・可視全域およびその一部も拡大表示できること。
(8) 反応過程の追跡等も可能なこと。

そのほか波長掃引が速いため，スペクトル表示の時期，回数等の制御も必要な場合が生じます。(3)，(4)，(5)については，すでに自記分光々度計において機械的な機構と電気的な回路とを組合せて実現しているが，ラピッドスキャン形の場合，機械的機構の採用は困難なので，電気的に行なうのが有利となります。また電気的制御には表示の尺度を変えることが容易であるという利点があり，波長域50mμ，透過率のフルスケール10%という表示でも容易に実現することができます。

以上の条件を充すスペクトロメーターの実用化には，新しい方式の採用のほかにエレクトロニクス技術，とくに半導体の進歩が大いに関係してきます。この装置では補正，制御等をすべて電気的に行なうため，数百個の半導体を使用しているが，これを数百本の真空管におきかえると故障が非常に多くなり，実用上問題を生じます。例えば，真空管が原因となる故障は使用個数×使用時間が10^4オーダーで1件発生するといわれ，数百本の真空管を使用した装置では約100時間ごとに故障するので，保守は電子回路の技術者が行なわなければならず実用性がうすくなります。それに比べ半導体ではこの値が10^7～10^9なので，故障の度合も1/1000～1/100000に減少し，毎日10時間使用しても10年以上も半導体が原因となる故障は発生せず，実用的には全く問題がなくなります。

この故障率の違いは，家庭用ラジオや，テレビの故障の90%は真空管が原因であり，トランジスターラジオでは落したことなどによる機械的破損が故障の原因のほとんどであることからもわかります。また半導体は真空管に比べて非常に小型であり，消費電力も僅少なので，装置を小型にすることができ，さらに好都合となります。

吸収スペクトルを瞬間的に直示させるためには，通常ブラウン管オッシロにより観測します。このブラウン管としてエレクトロニクス応用の蓄積型のものを使用すると（通常メモリースコープといわれている），ブラウン管自体に記憶作用があり，1回の波長掃引のみでも長時間吸収スペクトルを記憶表示することが可能で，応用範囲はさらに広くなります。例えばA，B二つの試料の吸収スペクトルを比較するには，先ずA試料のスペクトルを記憶させ，つぎにB試料のスペクトルを記憶させて表示すると，同じ管面上に両方のスペクトルが同時に表示されて容易に比較することができ，さらにC，D試料が加わっても同様となります。このように，吸収スペクトルの記録を残す必要のないときは，すべてブラウン管上で解析可能で，必要のときだけ写真，トレース等により記録を保存するならば，無駄な記録は大いに減少することになります。

反応過程追跡の測定を行なう場合は，装置の全動作を電気的に行なわせ，反応開始後適当な時間ごとの吸収スペクトルを抜き出して同一管面に表示させると，多数の写真によるスペクトルの比較に比べ解析ははるかに容易になると思われます。

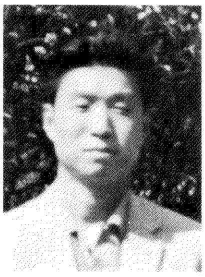
ラピッドスキャン形分光々度計を迅速化学分析の立場からみれば，測定がほとんど瞬時であるため，例えば試料の濃度，溶媒の純度等の予備測定を数多く行なっても時間の損失が少なく，容易に最良の測定条件を見出すことができます。また，製品の連続監視，制御等に応用することも容易で，品質の管理向上に役立つと期待されます。

なお，波長掃引を手動で行ない，吸収スペクトルをX－Yレコーダーで画かせるならば，従来の自記分光々度計と同様な記録を得ることもできることを付記します。

* 北海道大学　応用電気研究所

■RSP-2形 日立ラピッド・スキャン形分光光度計による酵素活性の測定

山本定明*

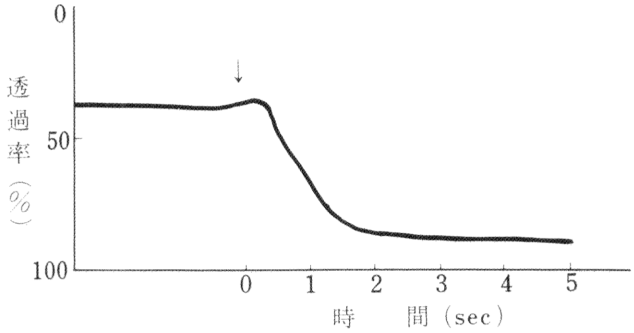


生体に数多く存在する脱水素酵素は補酵素としてFAD, NAD, NADPなどを必要とするので，その活性の測定にはこれらの補酵素の酸化型—還元型の変化に伴なう吸収変化を利用することができる。この方法は測定が容易であり，比較的早い反応でも追跡できることから，従来多くの研究者によって用いられてきた。

しかし，酵素反応の初速度を正確に求めるためには，従来の分光々度計に記録計を接続するという方法では十分でなく，何らかの工夫を加えないと結果の信頼性が低く，近似値しかえられないという難点があり，特に反応速度の早い場合には問題であった。

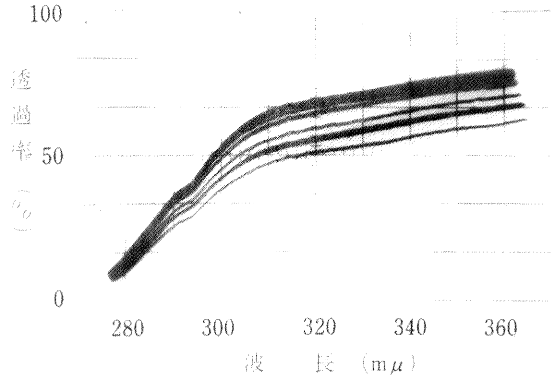
筆者の研究室ではこの点を考慮して(i)酵素と基質との混合法と(ii)反応の記録法を改良して正確な反応初速度を求めることにほぼ成功した。しかし，この結果をさらに確かめるために日立RSP－2型，ラピッド・スキャン分光々度計を使用して同一条件で反応速度の測定を行うことができたので，ここには乳酸脱水素酵素の測定を例にして両者を比較して述べてみたい。

乳酸脱水素は牛の心筋から抽出された結晶を使用し，その活性はピルビン酸を基質としてNADHによる340mμの吸収変化を追跡して測定した。はじめに筆者の研究室で行った方法を述べると，あらかじめ酵素と基質を混合して試料セル中に入れておき，小型のマグネチック・スタラーで撹拌しながら毛細管中に入れたNADHを圧力によって急激に噴出させ，同時に340mμの吸収変化を記録させた。この方法によってきわめて短時間に混合させることができたので，記録紙を50mm/secで送りほぼ期待通りの結果をえた（第1図）。図の矢印は酵素と基質の溶液にNADHを混合した時点を示す。反応の進行とともに340mμの吸収が減少して平衡状態に達する。反応初速度はこの曲線の傾斜から求めた。この方法では混合の際に多少の泡立ちがおきるので，そのために吸収が一時的に乱れるので，この点をさらに改良する必要がある。

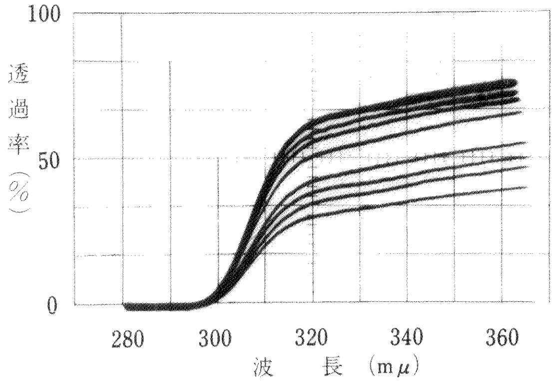


第1図　乳酸脱水素酵素の活性の測定例
乳酸脱水素酵素：43.3μg/ml，リン酸緩衝液：0.1M，pH7.0，ピルビン酸：1mM，NADH：1mM，測定温度：20℃

次にRSP－2型による乳酸脱水素酵素の測定例を第2，3図に示す。これらの場合にはNADHの340mμ附近の吸収の巾が広いので，ほぼその全域の変化を追跡できるように波長領域をとってある。これらの測定にはRSP－2型付属の混合セルを使用し，試料槽中に酵素溶液と基質–補酵素（ピルビン酸－NADH）の混合溶液を別々に入れ，両者を混合後⅔ secより測定記録を開始した。吸収スペクトルの変化は透過率によってメモリスコープで記録した。



第2図　RSP－2型による乳酸脱水素酵素の活性の測定例－1
乳酸脱水酵素：48μg/ml，リン酸緩衝液：0.1M，pH7.1，ピルビン酸：5mM，NADH：0.75mM，測定温度：28℃
測定時間は下より⅔，1，1⅓，2，3，4，5，10，15，20 30 sec.



第3図　RSP－2型による乳酸脱水素酵素の活性の測定例－2
乳酸脱水素酵素：1200μg/ml，他は第2図と同じ

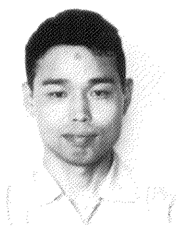
第2，3図から340mμの数値を読みとり，第1図のような反応曲線を求め，さらに反応初速度を求めた。第2図から求めた値は4.778(△O.D.340/min)，第3図からの値は7.496であった。この値は前述の方法でえられた値とはやや異っているが，測定温度などが異ることを考慮すればほゞ満足すべき値である。現在RSP－2型には温度調節装置がないので，反応速度等を問題にする場合には厳密な比較はできない。しかし反応中のスペクトル変化が追跡できるという大きな利点があるので，温度調節ができるようになれば，酵素反応の測定にはきわめて有用な計器となろう。たとえば第2図でも明らかなように，292－294mμに見られる吸収の肩（酵素タン白のトリプトファンの吸収によるものと考えられる）は，反応進行とともに吸収値が減少するが，波形そのものの変化は見られない。このことはおそらく酵素タン白には反応中に大きな変化が起きていないことを示唆している。また第3図に見られるような340mμ附近の巾の広い吸収帯にも，特別な変化は認められない。これらの結果は反応中に酵素とNADHとの特殊な結合はないことを示すもののようであるが，詳しいことは今後の研究にまたなければならない。

* 名古屋大学　理学部　放射性同位元素綜合研究室

■ラピッドスキャンの使用経験

大場操児*

1．臨床検査室における生化学検査の目的



臨床生化学検査の目的は尿及び血液その他，体液中の代謝産物を正確に測定することである。これらの有機無機を問わず各成分は，健康人体内では，常にせまい範囲で恒常性を維持しており，疾病により代謝のバランスが崩れたとき，既知成分の増減や未知成分の出現がおこり，臨床診断出とつながるわけである。従って，これら体液成分を微量で迅速に，正確かつ簡単に分析することが最終的な目標である。このため定性検査は目的成分の異常な増減を迅速，簡単にその傾向を知るためと，未知成分が検出されるか否かが，検査目的であり，定量検査では既知成分の増減を正確かつ精密に速く知ることが目的である。従来の検査手技はこれらの目的には，なかなか相反する要素ばかりで，実用性に乏しく，臨床生化学検査成績の実際的応用を阻んでいたものであるが，ラピッドスキャンは，迅速性と正確さ，さらに定性定量双方に利用できる面をもつと考えられるので，使用した経験を述べる。

先ず臨床材料では未知物質の追求が標準物質の関係から，ほとんど困難で，標準物質の吸光度特性がそのよりどころとなっている。ところが吸光特性曲線と分子吸光係数から定性及び定量検査を進めることが非常に頻回に行なわれなければならない面，時間と人手の制約であまり実施されていないのが現状である。また比色に際しては試薬添加後の吸光度の最大値を，大体測定しているが，検出中の複雑な成分が干渉することも考えられ，経時的な分光特性を明らかにすることも，検査術式をより正確にするために必要と考えられていたところである。

2．実験目的からみたラピッドスキャンと経時分光特性曲線の応用。

(a)　酵　素

酵素測定は初速度を用いるのが原則であるが，臨床検査室では可視部の呈色反応を見ている所がない。この点ラピッドスキャンを利用すれば試料と試薬の同時添加ができ，原則的に正しい理想的な酵素活性の測定に応用できる。

(b)　比　色，呈色反応機構の検討

呈色反応の色調の変化を観察しながらスキャンニングできることは反応機構の検討に役立つわけである。

(c)　妨　害，阻止物質の検討

呈色反応における目的成分以外の同じ原子団を持つ成分や，同一色調を呈する妨害物質の存在を検討するのに利用できる。妨害を避けるために類似発色成分を純品の特性曲線と比較して，阻止物質についての検討も比較的簡単にできるであろう。

3．尿アルデヒド反応の呈色

尿中Ursbilnoidのアルデヒド反応陽性物質は，健康人でも排泄されるが，肝疾患の際に尿中にウロビリノーゲンが多量に排泄され，尿中アルデヒド反応陽性の度合が高くなる。アルデヒド反応定性試験は，肝疾患のスクリーニング・テストとして利用される頻度が高い。ただ尿中にはアルデヒド試薬でウロビリノーゲンと類似の呈色物質や反応を妨げる物質が非常に多種類存在する。従って，臨床検査としては尿中ウロビリノーゲン以外の物質の呈色反応は，多少言い過ぎになるが誤診につながることになるので，吸光性の面からこれを除外できないかと云うのが私共の検討の目的である。実験の方法は簡単で健康人尿，病人尿にEhrlich Aldehyde試薬を添加し，標準物質と吸光特性を比較することである。結果は次に記す如くである。

(a)　標準物質は糞便より作製したStercebilinogen を用いたが，これは瞬間的に最大吸収を示すが，精製Bilirubin より作製したMesobilinogen 及び患者のアルデヒド反応性尿は，最大吸収を示す時間がや丶延長した。

(b)　尿から抽出したアルデヒド陽性物質の吸光特性曲線は480mμ，570mμに最大吸収を有する二相性を示した。Aldehyde試薬添加後，この二相性ピークは患者の種類により増加の態度が異る事が解った。

(c)　種々のピリン剤や，其の他の薬剤は570mμ附近にピークを示し，従来のAldehyde定性反応にプラスの誤差を興出している。

4．将来の利用方法と、その開発

(a)　Chromatographyyを行う際，Fraction collectorよりの流出液をラピッドスキャンに接続し，自動的に発色試薬を添加し観察すれば，必要な流出液を殆んど完全に分画利用出来ると考えられる。

(b)　目的成分の抽出，再抽出の繰返し操作の際，抽出液を直ちにスキャンニングすれば，妨害物質の混在，抽出の不充分を知ることが出来る。又，抽出液の再利用もでき，変化の早い物質の同定にも利用出来よう。

以上，私共の使用経験から，臨床化学検査で最も人手と時間を要した部分が，ラピッドスキャンで解決されつ丶あると考える。

*順天堂大学　医学部　付属病院　中央臨床検査室

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 9 No. 5

昭和41年9月20日印刷　　昭和41年10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　株式會社 日立製作所　　印刷所　株式會社 日立印刷所