

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

JUNE

1968

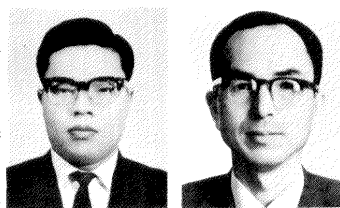
Vol. 11

No. 3

■EPS-3T形 日立自記分光光度計の酵素活性測定への応用

関 周司*, 小田琢三*, 小森律夫**

酵素活性の測定は酵素の種類によっていろいろな方法でなされるが、なかでも酵素反応に伴いその系の基質あるいは反応生成物による一定波長の吸光度が定量的に変化する場合は分光光度計が好んで用いられる。



関 周二



小田琢三

従来分光光度計による酵素活性測定の多くは手動式分光光度計で、酵素反応開始から一定時間おきに吸光度を読みとり記録していた。この方法では読みとりの速さに限界があり10秒あるいは15秒おきに読みとられるのが普通である。また混濁試料での酵素活性測定は光の散乱による非特異吸収のため困難であった。

最近よく用いられる Gilford 社製の装置は活性測定に便利であるが、高価であり、また、この装置でも、混濁試料の活性測定は困難である。

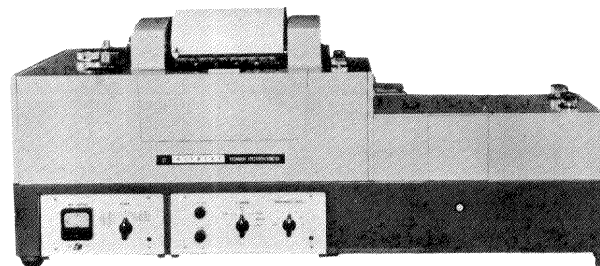
ここに紹介する EPS-3T 形自記分光光度計は、透明試料のみならず混濁試料についても広い波長範囲に亘って吸収スペクトルを記録することができるだけでなく、波長を適当な位置に固定し、チャート送りを動かすと酵素活性の経時的変動を連続的に記録することができる。

チャート送りは活性に応じて、FAST (21.5cm/min.), MEDIUM (10.8cm/min.), SLOW (5cm/min.) の3段階に切り換えられる。透明試料はもちろんであるが、積分球付属装置を用いると、混濁試料の酵素活性も測定でき、また反応温度を20℃から50℃の範囲で任意の温度に設定できる積分球付属の恒温装置も、特別付属品として取り付けられる。恒温方法はセルホルダ底部にあるヒーターで温め、温度をセルホルダに密着した金属棒に埋め込んだサーミスタで検知し、温度の自動制御を行う電熱式である。熱電導がよく容易に短時間で恒温に達し、設定温度に対して±0.5℃程度に調節される。

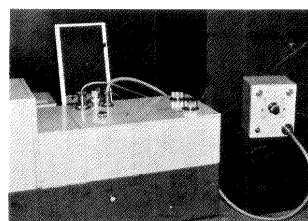
ここでは EPS-3T 形自記分光光度計 (恒温装置付積分球付属装置つき) によってミトコンドリア (Mt と略す) の NADH-チトクローム c 還元酵素活性および NADH-酸化酵素活性を濁った状態で測定した結果を述べる。

材料と方法

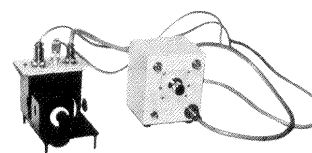
ミトコンドリア: 新鮮なウシ心筋から分離精製した Mt の⁶⁾
0.25M 蔗糖懸濁液 (約40mg 蛋白量 / ml) を



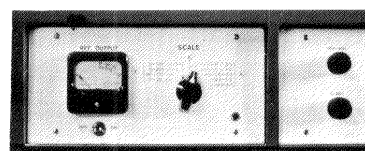
EPS-3T 形 日立自記分光光度計



恒温装置付き積分球付属装置を装着した EPS-3T 形



EPS-3T 形用恒温装置付き積分球付属装置



ABS 0-0.1 スケール付き
EPS-3T 形のパネル

一夜凍結保存したのち、融解し、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で適当に希釈して反応液に加えた。

酵素活性の測定法を述べるに当り、参考までに Mt の電子伝達系について簡単に述べる。²⁾ 電子伝達系は主としてクエン酸回路の脱水素反応で還元された NAD (NADH) と

目 次

- EPS-3T 形 日立自記分光光度計の酵素活性測定への応用……………関 周司 小田琢三 小森律夫……………1
- RSP-2 形 日立ラビッドスキャン分光光度計によるスピロピラン誘導体のホトクロミズムの観察……………井上英一 小門 宏 清水 勇……………5
- 124 形 日立ダブルビーム分光光度計による懸濁試料の測定 (オパールガラス法の応用)……………福満 元……………7
- 原子吸光分光分析法による血清電解質 (Na, K, Mg, Cu) の測定について
——日立 207 形原子吸光分光光度計 (ディスプレイ付き) 使用における測定法——
伊藤賢祐 酒井正衛 児島和代……………9
- 115 形 日立分子量測定装置による、混合溶媒を用いた分子量測定例……………山田英雄……………11

* 岡山大学医学部 癌源研究施設生化学部門

** 日立製作所那珂工場 応用開発課

コハク酸を好氣的に酸化する系で、その過程で遊離するエネルギーの多くはこれと共役するリン酸化系によってATP合成に使用される。

図1は電子伝達連鎖(TCA回路およびリン酸化化学とのつながりを含めて)を模式的に示したもので、 f_D はNADH-脱水素酵素活性をもつフラビン蛋白質、 f_S はコハク酸脱水素酵素活性をもつフラビン蛋白質、Feは非ヘム鉄、Qは補酵素Q、 b, c_1, c, a, a_3 はそれぞれチトクローム b, c_1, c, a, a_3 の略である。

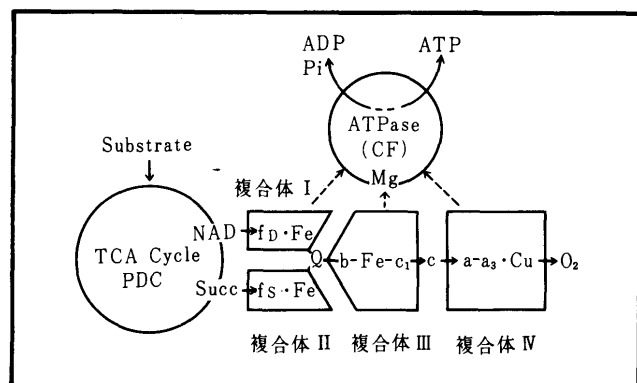
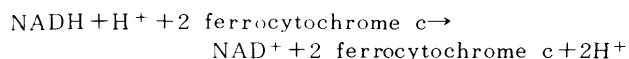


図1 電子伝達連鎖の模式図

NADH-チトクロームc還元酵素活性の測定法¹⁾:

NADH-cyt. c還元酵素は次式のような反応を触媒する酵素(複合体I→CoQ→複合体IIIからなる酵素系)で、その活性測定はNADHによる酸化型 cyt. cの還元を550mμにおける吸光度の変化で測定した。



反応液

	最終液量2.5ml中	終末濃度
1.0M K-リン酸緩衝液(pH8.0)	0.05ml	0.02M
0.1M NaN ₃	0.05	0.002M
1% ferricytochrome c	0.15	0.06%
0.001M EDTA	0.025	0.01mM
Mt 懸濁液	0.01~0.1	

蒸留水を加えて液量を2.437 mlにする。これを試料側と対称側キューベットに入れ、550 mμに波長を固定して0~100%調整をし、吸光度スケールに切換え37°Cに4分間保ち、対称側に蒸留水を0.063 ml加えて2.5 mlとし、試料側に0.01M NADHを0.063ml(終末0.25mM)加え、すばやく攪拌して反応をスタートすると同時にチャート送りをFASTにセットし、すばやく試料室のふたをして記録した。

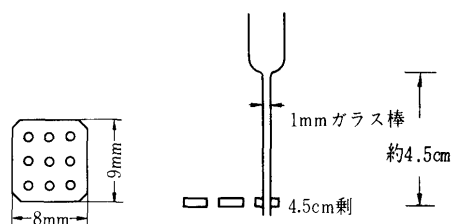


図2 攪拌棒

ポリエチレンの板に加熱した細いガラス棒で穴をあける。不用になった試薬瓶のふたを切って作ればよい。最後の穴あけの時ガラス棒を抜かず直角に立てておくと冷却してポリ板が棒につく。

NADHの添加は、すみやかに行わなければならないが、それには図2のような攪拌棒に、加えるNADH溶液を乗せ、これをキューベット中で1回上下すれば充分攪拌される²⁾

また上述より濃いNADH溶液(例えば、0.0625M)を少量(例えば、0.01ml)添加するようにすれば、反応液が稀釈されることが少なくよい。同じことが、その他の実験についてもいえる。

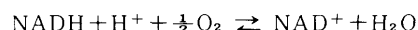
NaN₃はチトクローム酸化酵素の阻害剤で還元された cyt. cが再酸化されるのを防ぐ。Mtの0.25M 蔗糖懸濁液に10%デオキシコール酸(DOC, pH8.0)を1mg/mlの濃度に加え、ついで1.0M K-リン酸緩衝液(pH7.5)あるいは1.0M塩化カリを終末濃度0.05~0.1Mになるように加えて、Mtを可溶化したものを酵素液としてさきに述べた反応液に加え、さらにリン脂質(0.15mg/ml反応液)を添加するとより高い比活性がえられるが、こゝでは濁り度の高い試料での酵素活性測定を検討するため、酵素液としてさきの方法で調整したMt懸濁液をそのまま用いた。そのためリン脂質は添加しなかった。酵素の比活性(S.A.)は、

μ moles of cyt. c reduced per min. per mg of enzyme protein で表わし次式で計算した。

$$\text{S.A.} = \frac{\Delta \text{Absorbance}(550\text{m}\mu)}{\Delta t} \times \frac{1}{18.5} \times \frac{1}{\text{mg enzyme/ml}}$$

NADH-酸化酵素活性の測定法¹⁾:

NADH-酸化酵素はNADHの分子状酸素による酸化を触媒する酵素(複合体I→CoQ→複合体III→cyt. c→複合体IVからなる酵素系)で、全体としてその反応は次式で表わされる。その活性をNADHの酸化による340mμの吸光度の減少で測定した。



反応液

	最終液量2.5ml中	終末濃度
1.0M K-リン酸緩衝液(pH8.0)	0.25ml	0.1M
Mt 懸濁液	0.01~0.1	

蒸留水を加えて液量を2.46mlとした。この反応液を2本分作り試料側、対称側キューベットに入れ、NADHの極大吸収波長340mμにセットし、0~100%調整をし、37°Cに4分間保ち、対照側キューベットに蒸留水0.04mlを加えたのち試料側キューベットに0.01M NADH 0.04ml(終末0.16mM)加えると同時にチャート送りをSLOWにセットして、すばやく試料室のふたをして記録した。

比活性は

μ moles of NADH oxidized per min per mg of enzyme protein で表わされ、次式で計算した。

$$\text{S.A.} = \frac{|\Delta \text{Absorbance}(340\text{m}\mu)|}{\Delta t} \times \frac{1}{6.22} \times \frac{1}{\text{mg enzyme/ml}}$$

結果と考察

(1) NADH-チトクローム c 還元酵素活性:

図3は反応液に加えるMt(酵素)量を0.038mgから0.95mgまで段階的に変え、還元された cyt. c による550m μ におけ

る吸光度の増加をチャート送りFASTで記録したものである。

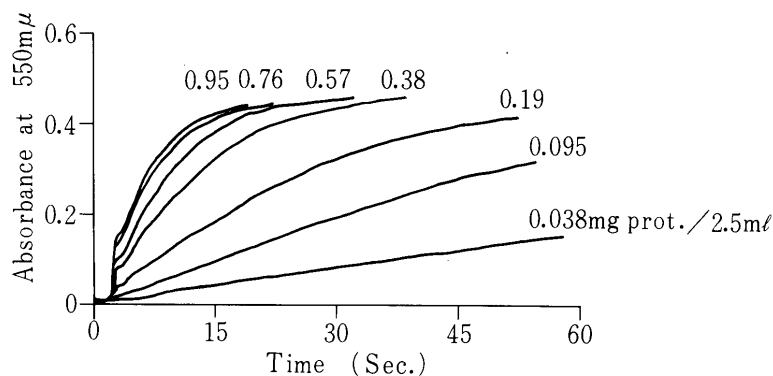


図3 NADH-チトクローム c 還元酵素活性

一定時間後の吸光度の増加は酵素量に必ずしも比例しないが、反応曲線の接線が原点を通る直線の勾配で初速度を求めると図4に示すように0.38mg蛋白量までは、吸光度は酵素量に比例して直線的に増加する。これ以上酵素量が増すと吸光度の増加率は徐々に減少している。図3から明らかなように、試料を添加して試料室の蓋を閉じるに要

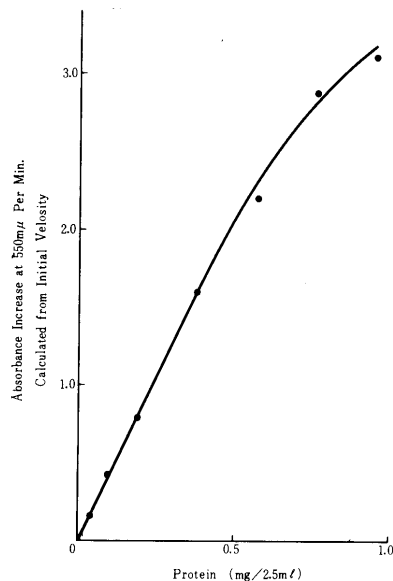


図4 NADH-チトクローム c 還元酵素活性

した時間が3~4秒で、図4で示される結果は、酵素量が0.57mg蛋白量/2.5ml以上になれば、この3秒間内に、すでに活性の低下が起ることを示している。このように比較的高濃度の酵素量を用いた場合でも反応曲線の原点を通る接線の勾配から酵素活性を計算できるが誤差を生じ易い。そこで初期反応で直線的に吸光度が増加する範囲を拡大測定

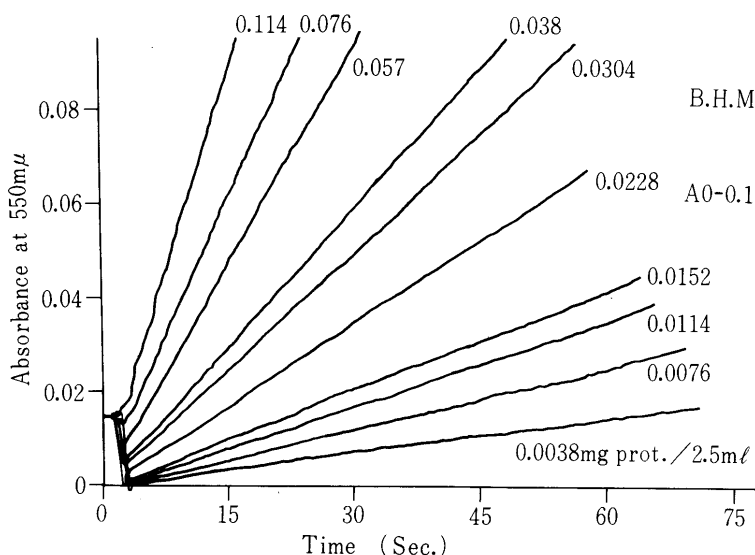


図5 NADH-チトクローム c 還元酵素活性

することが望ましい。図5, 6は、Mt量を図3, 4の約十分の一にし、吸光度スケールを十倍に拡大して0~0.1スケールを用いて測定したもので、吸光度は反応時間に比例して増加し、その勾配で求めた単位時間(分)当りの吸光度の増加量は酵素量とよく比例する。図4および図6の値から計算される比活性は、それぞれ0.57および0.44 μ mole of cyt. c reduced/min /mg proteinである。DOCで可溶化

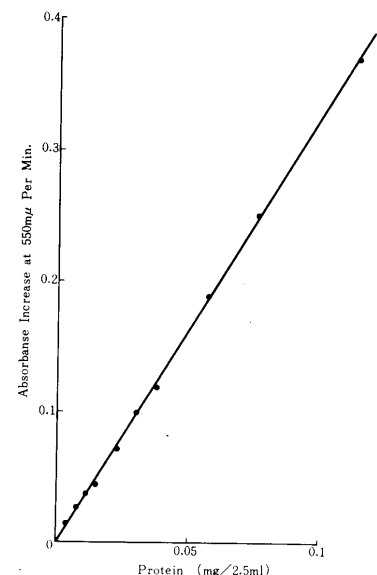


図6 NADH-チトクローム c 還元酵素活性

したMtを用いれば、更に高い比活性が得られる。^{4,5)}

(2) NADH-酸化酵素活性

図7はMt(酵素)量を0.095mgから0.38mgまで段階的に変え、NADHの酸化による340m μ における吸光度の減少をチャート送りSLOWで記録したものである。図8はこれから計算したもので、単位時間(分)における吸光度の変化量が酵素量に比例することを示している。これから比活性を計

算すると $0.39 \mu\text{mole}$ of NADH oxidized per min per mg of enzyme protein となる。

MtをDOCで可溶化し, cyt. cとEDTA (0.25mM)を反応液に加えて測定すれば, さらに高い比活性が得られる。¹⁾

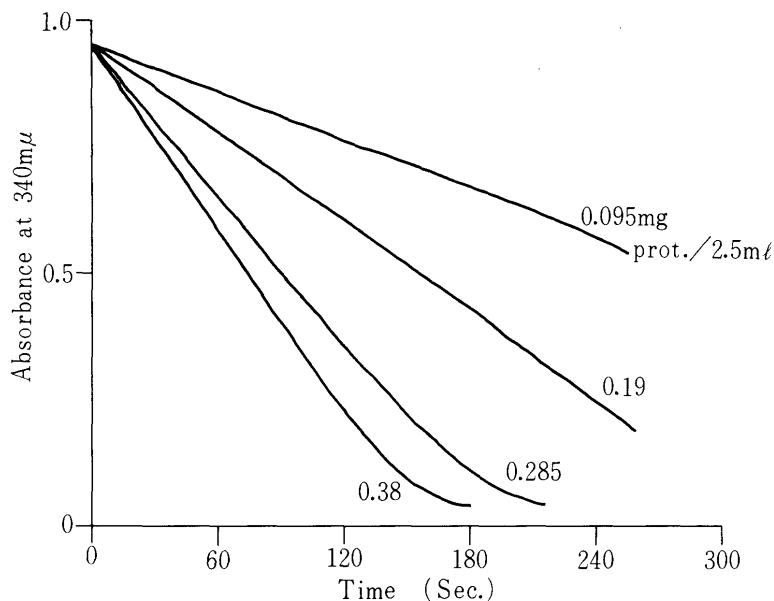


図7 HADH-酸化酵素活性

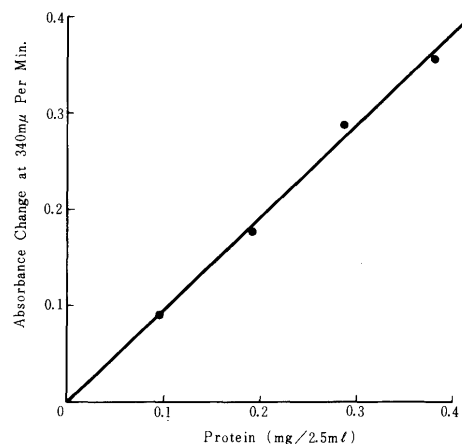


図8 NADH-酸化酵素活性

(3) NADH-酸化酵素活性に与える温度の影響

恒温装置付積分球付属装置を用いて, Mt量を一定 ($0.38 \text{mg}/2.5\text{ml}$) とし, 反応温度を 10°C から 37°C まで段階的に変えて酵素活性がどのように変動するかを検討すると共に,

温度コントロールの性能についてチェックした。その結果温度コントロールは, 極めてよく, また短時間(4分程度)で恒温が得られた。MtのNADH-酸化酵素活性に対する温度効果はすでに述べた反応液では図9, 10のようである。

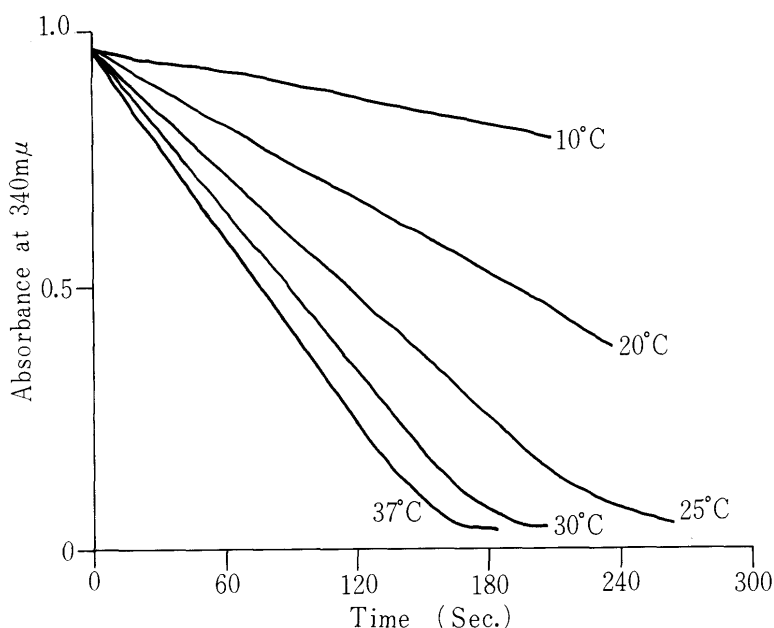


図9 NADH-酸化酵素活性に与える温度の影響

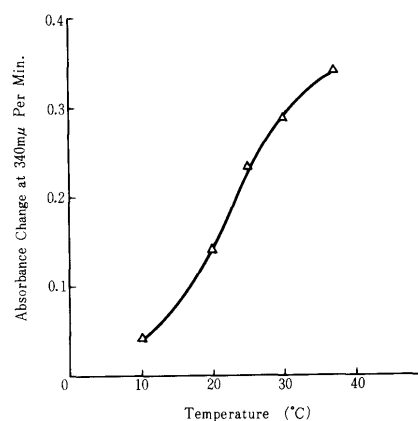


図10 NADH-酸化酵素活性に与える温度の影響

結 語

日立 EPS-3T 形自記分光光度計(積分球付属装置付)は紫外, 可視, 近赤外域の吸収スペクトル分析において優れた性能を示すことは, 多くの報告から明らかであるが, 我々は, これに恒温装置を内蔵した積分球付属装置で混濁試料の酵素活性測定に応用して, よい結果をえたのでその一例を報告した。

終りに当りミトコンドリアの分離にご協力いただいた高城, 谷端, 有井諸氏に感謝する。

文 献

- 1) 小田琢三, 関周司; 続生物物理学講座Vol.8 印刷中
- 2) 小田琢三; 蛋白質 核酸 酵素 11, 64, 1966

- 3) 瀬屑一郎, 折井 豊, 大西 権: 蛋白質 核酸 酵素 10, 1610, 1965
- 4) T. Oda, S. Seki, G. Yamamoto, H. Hayashi, O. Hatase and A. Wakabayashi; Acta Haematologica Japonica, 29, 578, 1966
- 5) S. Seki, O. Hatase, H. Hayashi and T. Oda; Acta Med. Okayama, 21, 79, 1967
- 6) 関 周司・小田琢三・小森律夫; HITACHI Scientific Instrument News Vol.11, No.2, 1, 1968

■RSP-2形 日立ラピッドスキャン分光光度計によるスピロピラン誘導体の ホトクロミズムの観察

井上英一* 小門 宏* 清水 勇*

光刺激により、可逆的に色変化を示す現象を一般にホトクロミズムと称し、最近では光記録材料、光学フィルタなど応用面に着目され、その開発が活発になってきた。ここでは、ホトクロミズムを示すスピラン誘導体に関する知見を報告する。



井上 英一



小門 宏

スピラン系化合物は、一般に有機溶媒中無色であるが、紫外線照射で、可視部に強い吸収を示すメロシアニン色素形に変化する。この発色は光照射を止めることにより、徐々に消失し、元のスピラン構造に戻る。即ち、この発色状態は比較的寿命の長い熱的準安定状態であり、従来の分光器では、その吸収スペクトルを正確に測定するには、低温にする必要があった。我々は、日立 Rapid Scanning Spectrophotometer RSP-2形を使って、光照射による試料の吸収スペクトル変化を測定し、発色形、無色形にたいする溶媒効果、酸、塩基分子添加効果などの観察を行った。¹⁾

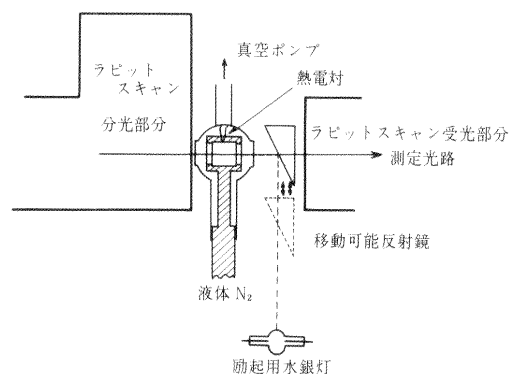
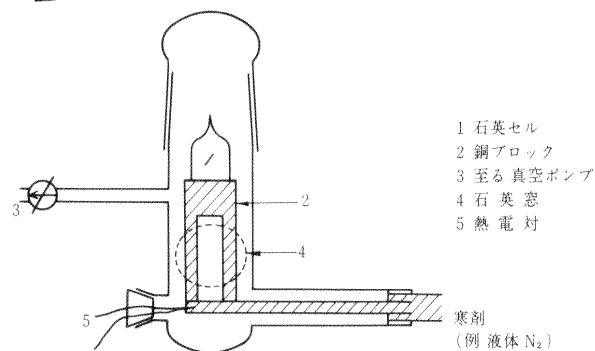
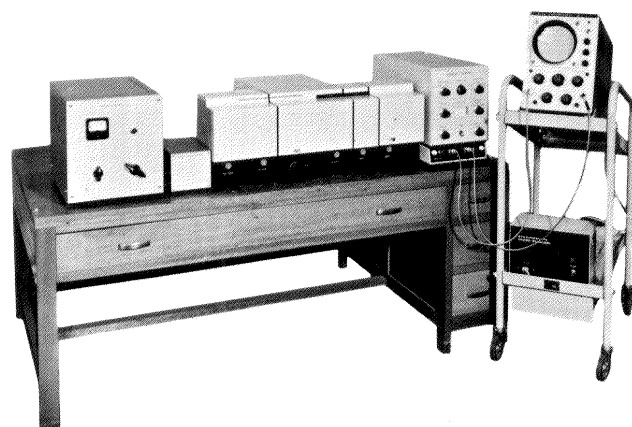
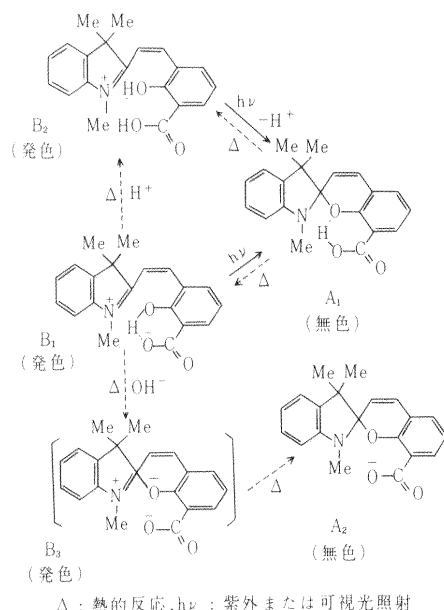


図1 試料室部分改良模型図

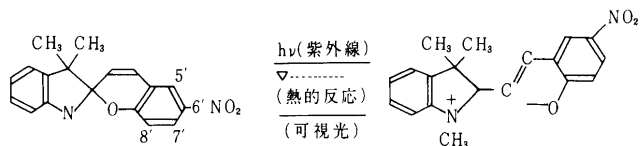
実験

光照射直後の吸収スペクトル変化を測定するために、同器の試料室部分を図1のように改良し、更に用途によっては、低温にて吸収スペクトル測定が可能になるようにした。オシログラフ上の画像は写真で記録した。又添加物による吸収スペクトル変化は、混合セルを使用した。励起光源はウシオ超高压水銀灯USH-500、紫外光として313m μ 、365m μ を用い、可視光としては、ガラスフィルタで390m μ より短波長の紫外線を除いた状態で用いた。

* 混合用セルは、日立の厚意により借用したもの。

結果

常温での1.3.3-trimethylindolino-6'-nitro-benzopyrrolspiran(I)の光照射前後の吸収スペクトルを図2に示す。次の反応式に示すように紫外線照射前は、無色のA形分子が、後にはメロシアニン形色素構造のB形に変化し、可視部に強い吸収を示す。光照射を止めるとBは一次反応過程で、Aに戻る事が図2から判明する。試料を低温にし熱的なB $\rightarrow$ A反応を止め、Bに可視光照射すると光化学反応としてAに戻る。以上の過程を下式に示すことができる。



又同種スピラン誘導体で8'の位置にカルボキシル基をもつ1,3,3-trimethyl spiro[indoline-2,2'-benzopyran]-8'-carboxylic acid (II) は上記の現象と逆の発消色変化を示すことを見いだした²⁾ すなわち、置換基効果により、熱的安定形は、発色形(B')で、このアルコール溶液を光照射すると、無色形(A')に変化する。また光照射を止めると、徐々に元の状態に戻る。この過程が図3の吸収スペクトル変化で非常に明確に示される。この発色種は、他のスピラン誘導体で示される熱的な色変化サーモクロミズム(無色形と発色形の化学平衡が温度により変化するための、熱的な可逆的な色変化)により現われるものでない事は、-90℃程度まで冷却し、長時間その吸収スペクトルを観察しても変化が見られなかったことで示される。無色種(A')から元の状態(B')に戻る熱的な反応は、この場合も一次反応過程で低温(-30℃以下)では、非常に起りにくいこともわかった。(B')の水溶液に水酸化ナトリウム水溶液を添加すると瞬時、長波長領域(540mμ近傍)に強い吸収帯が現われ、更にこの吸収帯は徐々に消失する。この中間体の吸収スペクトルは、他の溶媒(アルコール、アセトンなど)では現われず、この場合は、混合瞬時に可視部領域の吸収帯が全て消失してしまう。また、酸を添加した場合、添加と同時に可視領域の吸収帯が、短波長側に移動し、黄色になり、光照射により消失し、光照射を止めることにより、この黄色種が再び現われる。この過程も、ほぼ可逆的過程として起る。図4このようにいろいろな状態での吸収スペクトル変化を観察して、我々は、本物質の反応過程を前頁の式のように推測した。

以上、スピラン化合物のホトクロミズムに関する概略を紹介したが、三重項状態など短寿命の分子状態にせん光法による吸収スペクトル測定が活発に活用され成果をあげているように、本研究のような、比較的長寿命の不安定種の分子状態の吸収スペクトルを比較的平易な条件で測定することで、非常に有用な知見を得られたことを報告した。

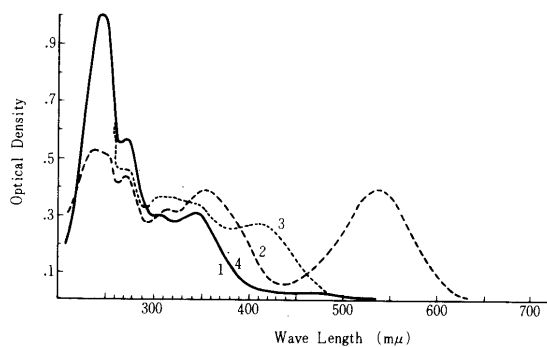


図2 1,3,3-Trimethyl indolino-6'-nitro-benzopyrrolospiran (I) の吸収スペクトル変化

1. 物質(I)のエタノール溶液の吸収スペクトル
2. (1)を紫外線照射後
3. (2)に酸(マレイン酸)添加後の吸収スペクトル
4. (2)を暗所放置後

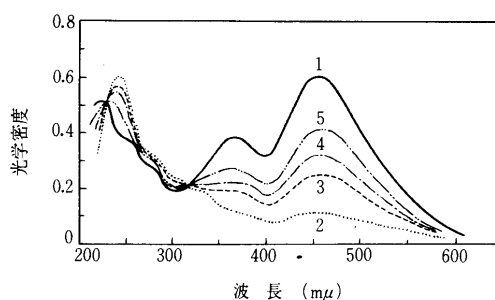


図3 (II)のホトクロミズム変化に伴う吸収スペクトル変化(C₂H₅ OH液)

1:暗所調整試料, 2:可視光照射後, 3,4,5: 2を暗所放置

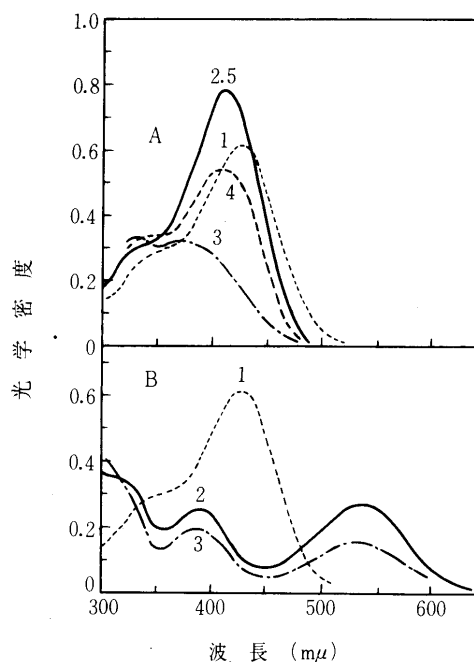


図4 (II)に対する酸・塩基の効果

A : [(II)水溶液に酸添加による吸収スペクトル変化

- 1: [(II)水溶液の吸収スペクトル
- 2: 1にHCl添加
- 3: 2を可視光照射
- 4,5: 3を暗所放置

B : [(II)水溶液に塩基添加による吸収スペクトル変化

- 1: [(II)水溶液の吸収スペクトル
- 2: 1にNaOHaqを添加直後
- 3: 2を暗所放置

文 献

- 1) 清水, 小門, 井上 工業化学雑誌 70巻12号 2344~2348
- 2) 清水, 小門, 井上 日本化学雑誌 88巻10号 1127~1128

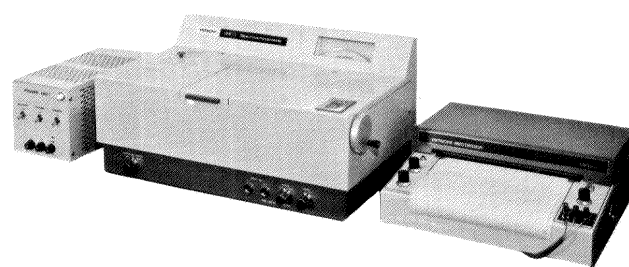
■ 124形 日立ダブル・ビーム分光光度計による懸濁試料の測定 (オパール・ガラス法の応用)

福岡 元*

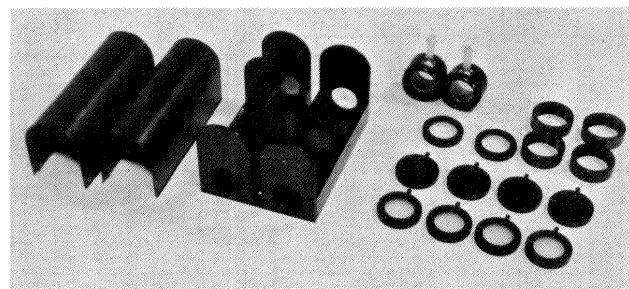
はじめに

近年、生化学領域や医学等の分野では、生物試料などをそのまま分光器にかけて、その吸収スペクトルを測定する方法が注目されてきた。特に、生化学分野の試料は概して不透明、又は半透明であるため分光器にかけるときは、抽出するか、極低濃度に希釈する必要がある。しかし、すべての試料を溶液、あるいはガス状にして問題が解決するとは限らないし、その処置はきわめて面倒なうえ試料の変性や、吸収帯が移動することもある。

混濁試料をそのまま吸収スペクトルを測る方法は種々考えられるが、今回、124形用オパール・ガラス付属装置を使用して混濁試料を測定し良好な結果が得られたので報告する。右に124形のオパール・ガラス付属装置概観を示す。



124形ダブルビーム分光光度計



オパールガラス付属装置

原理概略

混濁試料の分光測定に関する問題を一般的に取り扱ったのはMie, Hulst等で理論的な説明がなされている。国内でも赤松¹⁾、品川²⁾、柴田³⁾等の報告があるので、ここでは124形オパール・ガラス法の概略を述べる。

図1は通常測定の光学系である。この通常法で混濁試料を測ると図2に示すように、入射光の一部は反射され、残りが吸収光と透過光になる。このときの透過光は透明溶液のときと違って、混濁液の媒質部分だけを透過した平行な透過光と粒子にあたり、吸収されて残って出てきた散乱透過光との2種類からなる。

溶液吸収の測定原理は吸収されて残って出てきた光、すなわち、透過光量を測って吸収光量を求めるわけである。だから、混濁液の散乱透過光にも当然、溶液の光吸収特性が含まれることになる。

通常法では、このような理由により、平行透過光と、ごく一部の散乱透過光が検知されるだけで、得られたスペクトルは全体が高い吸光度レベルに移行され、その上に僅かな吸収帯がみられるだけである。この僅かな散乱透過光を検知する最も簡単な方法がオパール・ガラス透過法である。図3に示すようにオパール・ガラス法は試料及び対照側セルを透過した光を、ガラス、あるいは石英板表面を擦り粗面にした半透明の拡散板を密着させ、その透過光を拡散させて、拡散透過光を受光部で検知し、混濁試料の吸収スペクトルを測定する方法である。

結果

図4に示した吸収スペクトルは市販牛乳の希釈液を通常法とオパール・ガラス法とで比較したもので、オパール・ガラス法では明らかにバック・グラウンドは低下し(約1/2)、又、カゼイン蛋白の吸収帯(ピーク280m μ)が判然(約2倍)としている。また短波長の散乱によるバックグラウンドの急傾斜が著しく改善されている。これらの傾向は図5、図6に示

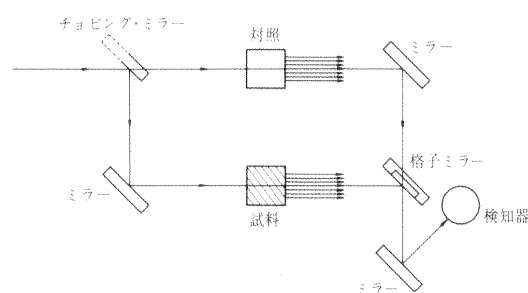


図1 通常法の光学系

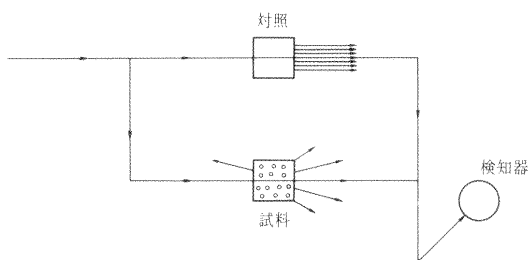


図2 通常法による混濁試料測定の光学系

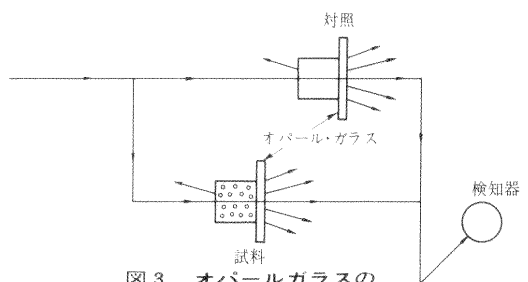


図3 オパールガラスの光学系

す可視域における血液ヘモグロビン、クロレラの吸収スペクトルでも明らかである。特にクロレラのA、B吸収帯部の吸収スペクトルは、通常法では表れないのにオパール・ガラス法によると明らかに正しい吸収スペクトルを示している。図7～図9には牛乳、血液、クロレラの各濃度での吸収スペクトルを示した。それらの吸収スペクトルは各濃度と吸光度の関係をベース・ライン法で値を読みとると、図10に示す検量線は比較的よい直線性を示し、定量的である。又、測定にはオパール・ガラスの種類や、セルが問題になるが、石英拡散板と液槽10mmの角型セルを用いた。

オパール・ガラス付属装置は混濁試料の簡易測定法として、十分な実用性をもつものと考ええる。

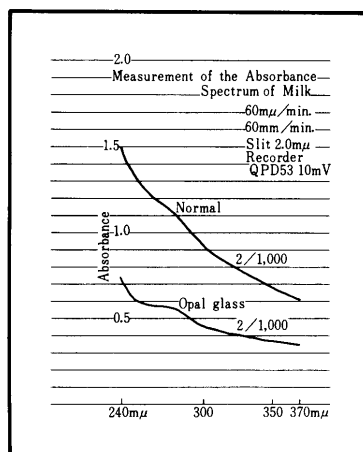


図4 市販牛乳によるオパール・ガラス法と通常法の比較

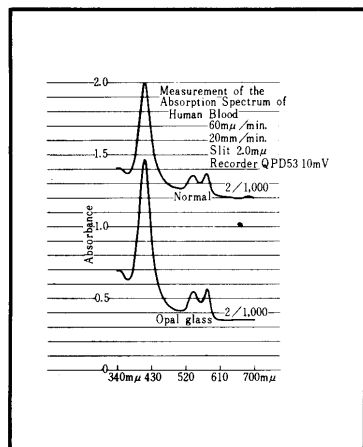


図5 血液によるオパール・ガラス法と通常法の比較

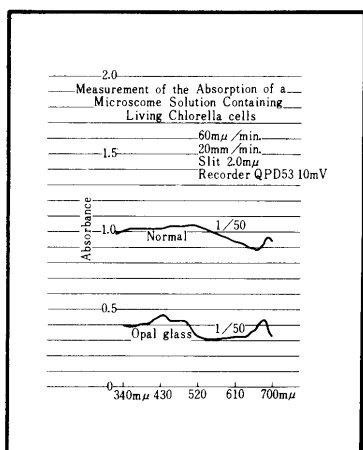


図6 クロレラによるオパール・ガラス法と通常法の比較

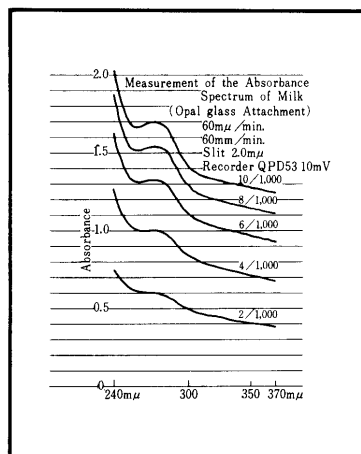


図7 オパール・ガラス法による牛乳の吸収スペクトル

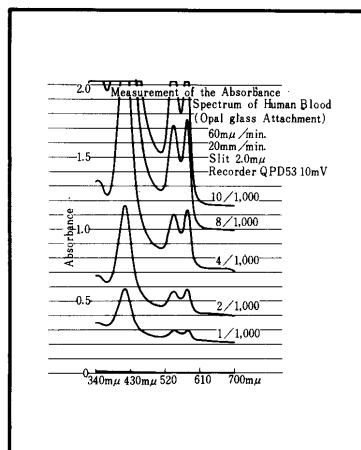


図8 オパール・ガラス法による血液の吸収スペクトル

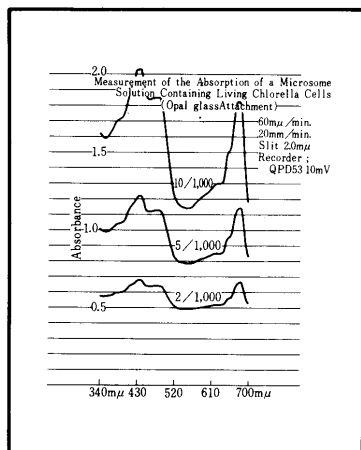


図9 オパール・ガラス法によるクロレラの吸収スペクトル

文 献

- 1) 赤松, 青木, 嶺岸 混濁試料の吸収スペクトルについて
分光研究 第15巻 第3号 1966
- 2) 品川, 他 EPS-3T積分球付属による細胞内
顆粒の差スペクトル Hitachi S.I.
News Vol. 10 No. 3
- 3) 柴田 オパール・ガラス分光測定法の実際
植物生理 Vol. 4 1964

■原子吸光分光分析法による血清電解質(Na, K, Mg, Ca)の測定について

ー 日立207形原子吸光分光光度計(デスパーザー付き)使用における測定法 ー

私たちは1963年来、臨床検査における血清電解質の測定分野に原子吸光分光分析法を採用し、簡易、迅速、正確を旨とし、すでに1965¹⁾ 1966²⁾ 1967³⁾ 1968⁴⁾ 年に報告した如く、血清電解質測定にSrイオン標準添加法⁵⁾を採用してきた。即ち1. 測定条件を固定し、2. 一定濃度のSrイオンの添加により焰の温度変化を防ぎ、且妨害イオンの影響を除去し、3. 希釈試験管の本数を少くし、4. テクニシャンが安易に大量の検体を処理出来るよう意図し、実験を続けてきた。



伊藤 賀 祐

今回は日立207形原子吸光分光光度計にデスパーザーを使用し、良好な結果を得たので報告する。

実 験

- A. 機種 日立207形原子吸光分光光度計 デスパーザー使用
- B. 測定条件 表1の通り
- C. 測定時におけるSrイオンの影響 標準液¹並びに任意に選んだ血清を用い、Srイオンの各種濃度における影響をみると図1, 2, 3, 4の通りであった。
- D. C項の検討の結果から、Srイオン濃度を660mg Sr/0.02mg Caとし、標準液を用いて標準曲線を求めると、図5, 6, 7, 8, 9のようになった。
- E. D項に基づいて、任意に選んだ血清25~30を用い、デスパーザーを使用する場合と使用しない場合の血清100倍希釈液の電解質Na, K, Mg, Ca濃度を測定し、この場合の相関性回収率を検討すれば、図10, 11, 12, 13となりまとめてみると表2のようになった。
- (但し、デスパーザーを使用しない場合のSrイオン濃度は1320mg Sr/0.02mg Caとした)

表1 デスパーザー使用の測定条件

	Na	K	Mg	Ca
使用ランプ	ホロカソード	ホロカソード	Ca-Mg複合	
稀釈倍数(倍)	100	100	100	100
放電電流(mA)	25	25	10	10
安定までに要する時間(分)	50	50	10	10
波長(Å)	3302	7665	2852	4227 _p
スリット幅[Na]	1	2	1	1
A.S.	11	11	11	11
Sence	7	7	5	6
高さ(目盛)	1.	1.	1.	1.
バーナー光軸に対する角度	180°	180°	180°	180°
空気流量(ℓ/m)	15	18	15	15
C ₂ H ₂ 流量(ℓ/m)	3.5	3.8	3.8	3.8

A.S.=Absorption Sence.

表2

	Na	K	Mg	Ca
個数(n)	25	25	30	28
相関係数(r)	0.97	0.94	0.95	0.95
y = a + bx	20.3 + 0.86x	0.1 + 0.98x	0.4 + 0.78x	-0.4 + 1.09x
M.	x.	140	4.8	1.4
	y.	140	4.8	4.4
S.D.	x.	5.10	0.58	0.25
	y.	4.60	0.60	0.21
C.V.%	x.	±1.82	±6.05	±8.25
	y.	±1.64	±6.25	±7.05
回収率%	x.	98	99	96
	y.	98	99	100

但し x. デスパーザー使用なし
y. デスパーザー使用

伊藤賀祐* 酒井正衛* 児島和代*

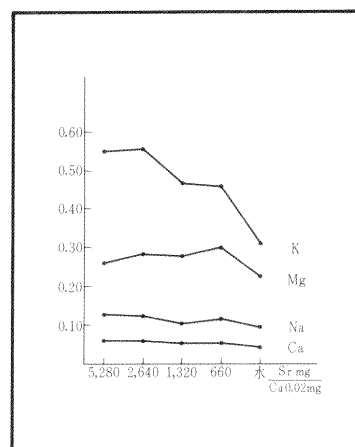
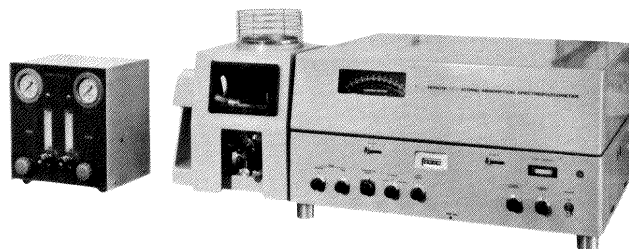


図1 207形Srイオンの影響
デスパーザー使用(×100)

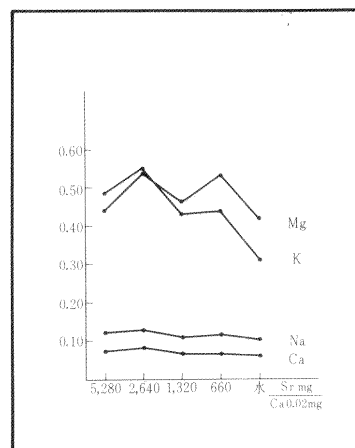


図2 207形Srイオンの影響
デスパーザー使用(血清×100)

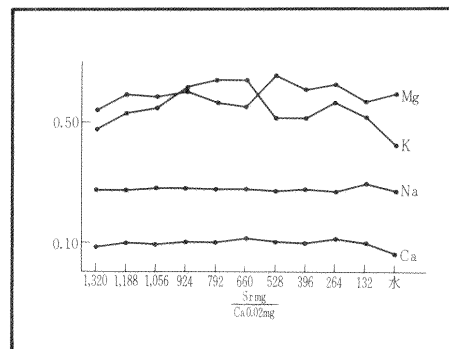


図3 207形Srイオンの影響デスパーザー使用(×100)

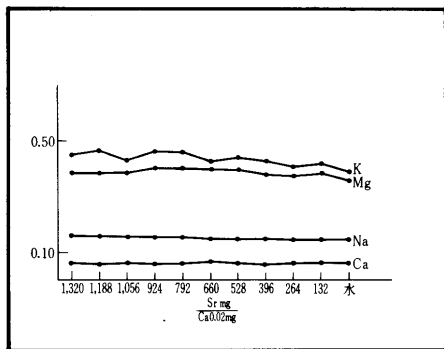


図4 207形Srイオンの影響
ディスペンサー使用(血清×100)

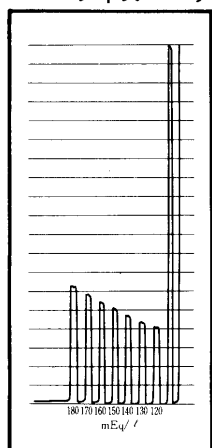


図5 Na標準液の吸収曲線

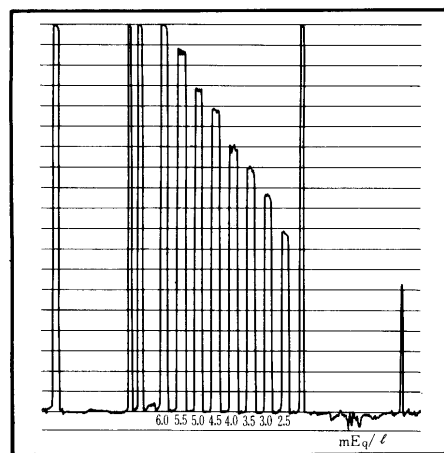


図6 K標準液の吸収曲線

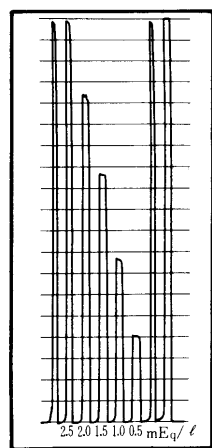


図7 Mg標準液の吸収曲線

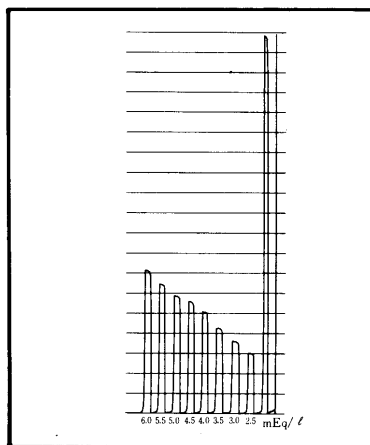


図8 Ca標準液の吸収曲線

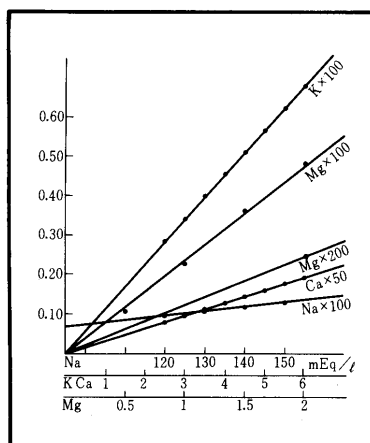


図9 207形標準曲線ディスペンサー
使用Sr660mg Sr/0.02mgCa

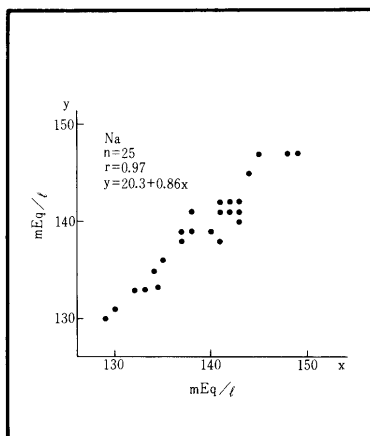


図10 Na 相関図

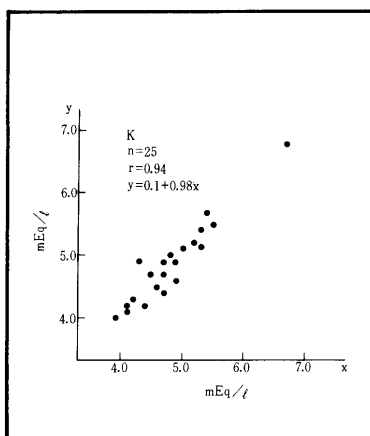


図11 K 相関図

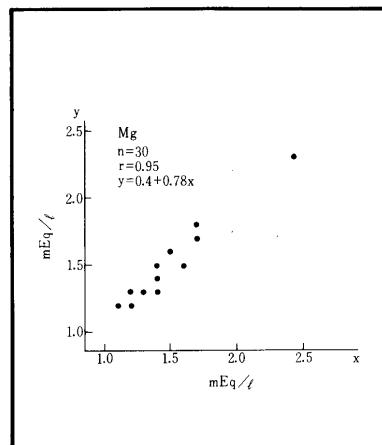


図12 Mg相関図

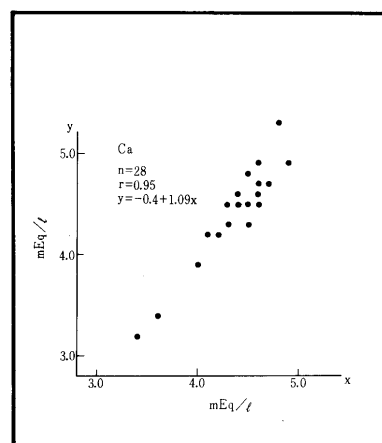


図13 Ca 相関図

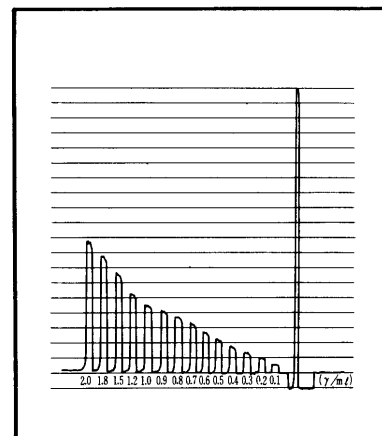


図14 Fe標準液の吸収曲線

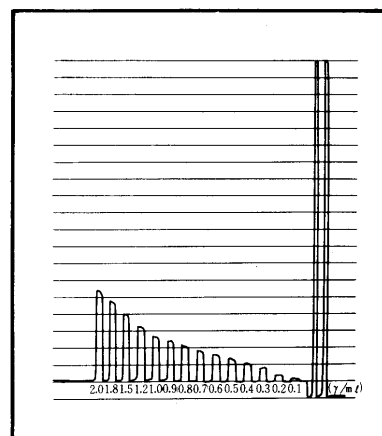


図15 Cu標準液の吸収曲線

まとめ

以上の実験から日立 207 形原子吸光分光光度計にディスペルザーを使用する場合、血清電解質 Na, K, Mg, Ca の測定にあたっては、 $660\text{mg Sr}/0.02\text{mg Ca}$ になるよう血清を 100 倍に希釈すれば、同一希釈液で 4 つの金属濃度の測定が可能であることが判明した。

付 記

血清鉄・銅の測定について

予備実験の段階ではあるが、日立 207 形原子吸光分光光度計にディスペルザーを使用し、血清鉄・銅の測定を試みた。

標準液はスポンジ鉄、ガッターマン銅を硝酸に溶かし、純水でそれぞれ $100\text{ }\mu\text{g/dl}$ の液を調製して使用した。標準液の吸収は図 14, 15 のように測定条件は表 3 とした。別に chemtrol (日商) を用いて回収率を求めると、ほぼ 95～103% の範囲に入ることが判明した。このことから血清と 2～5 倍に希釈測定すれば血清鉄・銅 $\mu\text{g/dl}$ が算出できるようなのである。

比較的高い viscosity のものでも噴霧されて大粒の霧が除去されるため、焰の中にはいつでも温度変化を最小限に止めることができ、金属イオンを良く原子化し、ために共鳴線の吸収がよくなるものと解される。

表 3 日立 207 形原子吸光分光分析器ディスペルザー使用時の測定条件

	Fe	Cu
mA	10mA	10mA
波長	2487Å	3248Å
A. S.	11	11
S.	10	10
slit	1	1
air	15 ℓ/min.	15 ℓ/min.
fuel	3.8 ℓ/min.	3.8 ℓ/min.

参考文献

- 1) 酒井正衛：HITACHI, Sci, Inst, NEWS, Vol. 8, 355 (1965)
- 2) 酒井正衛：丹野恵永子：第 13 回日本臨床病理学会総会発表（於徳島大学）1966
- 3) 酒井正衛，児島和代：臨床化学分析談話会東海支部 10 月例会（於岐阜大学）1967
- 4) 同：第 5 回臨床化学分析研究会（於大磯）1968，第 7 回日本臨床病理学会東海支部総会発表
- 5) J. B. Willis：Anal. chem. 33, 556 (1961)
- 6) 武内次夫，鈴木正己共著：原子吸光分光分析法（昭 29，2 月発行）南江堂
- 7) 田村正平：「医学のあゆみ」51, 375 (1964)

■ 115 形 日立分子量測定装置による混合溶媒を用いた分子量測定例

山田英雄*

未知物質の分子量を求めるには、未知物質の推定分子量の大きさにより種々使い分けられている。通常低分子量領域の物質（いわゆるオリゴマー）の測定に用いられる沸点上昇法、氷点降下法、蒸気圧平衡法は、被測定物質を溶解する溶媒の純度が測定精度に大きな影響を与えるため試薬特級品を使用するか、または精製して使用するかであった。

今回、蒸気圧平衡法である 115 形日立分子量測定装置を用い混合溶媒による既知物質の分子量を測定することを試みた結果、混合溶媒でも純粋なる溶媒と同様の精度で標準物質を簡単に測定することが、できたので測定結果を述べる。

1. 溶質と溶媒

溶質として検量線 (Ks) を求めるのにベンジル（試薬特級品 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$ MW210.22）を、測定用標準物質にはコレステロール（試薬特級品 $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{OH}$ MW386.67）を用いた。

溶媒としてベンゼンとエチルアルコールの混合液、アセトンとクロロホルムの混合液を用いた。すべて試薬特級品を用いた。

2. 測定結果と考察

2-1. 検量線及び Ks

ベンゼンとエチルアルコールの混合液、及びアセトンとクロロホルムの混合液共に、それぞれの混合割合（容積比）を変へて、一定温度における検量線及び Ks を求め、純粋なる溶媒と比較した。

（注 検量線は各混合液の感度が比較でき易いように示したもので、標準物質の分子量測定には Ks を用いた）

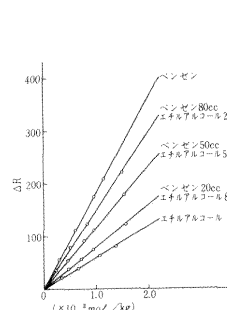
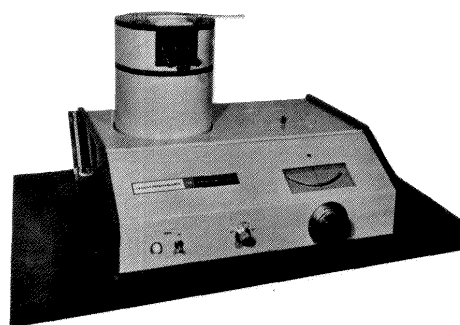


図 1 ベンゼン・エチルアルコール混合液の検量線 (41℃)

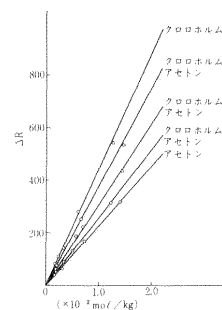


図 2 クロロホルム・アセトン混合液の検量線 (32.4℃)

図 1, 2 には、ベンゼンとエチルアルコール混合液、アセトンとクロロホルム混合液の検量線を純粋なる溶媒と比較した例を示す。これらの図から各混合液共に検量線は純粋なる溶媒の検量線の間にあることがわかる。しかも混合した割合に関連して感度が変わっている。

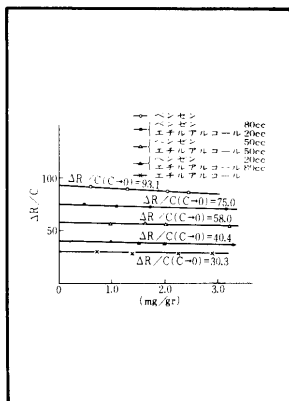


図3 ベンゼン、エチルアルコール混合液の(Ks) (41℃)

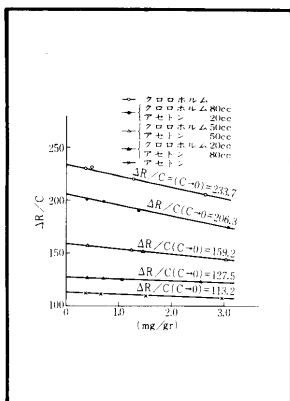


図4 クロロホルム、アセトン混合液の(Ks) (32.4℃)

図3, 4にはKsの $\Delta R/C$ 対Cプロットの例を示す。プロットは直線でもすべる。溶液の濃度によって依存性があるためにKsは、濃度の異なる4種の溶液についてそれぞれの $\Delta R/C$ を求め濃度ゼロにおける値($\Delta R/C(c \rightarrow 0)$)を外挿法により求めた。混合割合に関連して変化することがわかる。

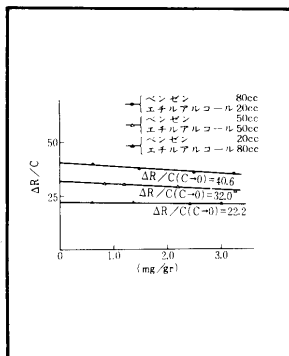


図5 ベンゼン、アルコール混合液によるコレステロールの測定(41℃) $\Delta R/C$ 対プロット

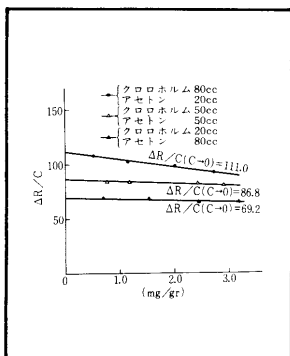


図6 クロロホルム、アセトン混合液によるコレステロールの測定(32.4℃) $\Delta R/C$ 対プロット

図5, 6, 表1, 2には、標準物質であるコレステロールを測定した例を示す。濃度による依存性があるために、 $\Delta R/C$ 対CをプロットしC $\rightarrow$ 0における分子量を求めた。各混合液共に精度2%以内である。これらから混合溶媒を使用しても、純粋なる溶媒と同等の精度で測定が可能であることがわかる。

表1 ベンゼン-エチルアルコール混合液によるコレステロールの測定 (41℃)

ベンゼン80ml: エチルアルコール20ml

溶液濃度 C (mg/gr)	0.680	1.478	2.497	3.243
平均 ΔR	27.1	55.7	89.3	114.1
$\Delta R/C$	39.9	37.7	35.8	35.2

$$K_s = 1.577 \times 10^4$$

$$\text{分子量} = K_s / \Delta R / C(C \rightarrow 0) = 1.577 \times 10^4 / 40.6 = 389 (+0.6\%)$$

ベンゼン50ml: エチルアルコール50ml

溶液濃度 C (mg/gr)	0.831	1.196	2.194	3.261
平均 ΔR	25.5	36.4	63.8	88.0
$\Delta R/C$	30.8	30.5	29.1	27.0

$$K_s = 1.220 \times 10^4$$

$$\text{分子量} = K_s / \Delta R / C(C \rightarrow 0) = 1.220 \times 10^4 / 32.0 = 383 (-0.8\%)$$

ベンゼン20ml: エチルアルコール80ml

溶液濃度 C (mg/gr)	0.603	1.367	2.420	2.995
平均 ΔR	13.2	29.9	51.0	63.4
$\Delta R/C$	22.0	21.9	21.1	21.2

$$K_s = 0.850 \times 10^4$$

$$\text{分子量} = K_s / \Delta R / C(C \rightarrow 0) = 0.850 \times 10^4 / 22.2 = 384 (-0.6\%)$$

表2 クロロホルム-アセトン混合液によるコレステロールの測定 (32.4℃)

クロロホルム80ml: アセトン20ml

溶液濃度 C (mg/gr)	0.517	1.158	2.013	2.732
平均 ΔR	55.8	118.5	197.5	251.4
$\Delta R/C$	107.7	102.4	98.1	92.0

$$K_s = 4.337 \times 10^4$$

$$\text{分子量} = K_s / \Delta R / C(C \rightarrow 0) = 4.337 \times 10^4 / 111.0 = 390 (+0.9\%)$$

クロロホルム50ml: アセトン50ml

溶液濃度 C (mg/gr)	0.759	1.374	2.434	2.909
平均 ΔR	64.5	114.0	200.3	234.3
$\Delta R/C$	85.0	83.0	82.3	80.6

$$K_s = 3.347 \times 10^4$$

$$\text{分子量} = K_s / \Delta R / C(C \rightarrow 0) = 3.347 \times 10^4 / 86.8 = 385 (-0.4\%)$$

クロロホルム20ml: アセトン80ml

溶液濃度 C (mg/gr)	0.691	1.529	2.453	3.181
平均 ΔR	47.7	104.7	160.7	207.1
$\Delta R/C$	69.0	68.5	65.5	65.1

$$K_s = 2.681 \times 10^4$$

$$\text{分子量} = K_s / \Delta R / C(C \rightarrow 0) = 2.681 \times 10^4 / 69.2 = 388 (+0.4\%)$$

以上の結果から

1. この様に混合比と感度(Ks値)に法則性が見出せることから混合溶媒の熱力学的な特性(気化熱, 蒸気圧)等の研究にも本装置は有用と思われる。
2. 感度の低い溶媒にしか溶解しない未知物質を測定する場合感度の高い溶媒を混合させることによって ΔR 値を大きくし測定精度を上げることも可能と考えられる。

※Ksとは溶液1mol/kgの ΔR 値であって、($\Delta R / C_s \times$ 既知分子量)の計算式によって求まる。溶媒の種類及び温度によって異なるので、各溶媒について求める必要がある。