

■メスバウワースペクトルの分析と日立400チャンネル分析装置の応用

1958年、R. L. Mössbauerによって発見されたメスバウワー効果は光の原子共鳴蛍光と同じように、原子核から出るエネルギー損失のない(recoilless)γ線が、同じ同位元素の束縛された原子核に当たると、それを励起してそれから再びγ線が放出されるという recoilless γ線の原子核共鳴吸収の現象で、この効果は原子核の超微細なエネルギー状態を調べる画期的な測定手段として核構造の研究のみならず相対性原理の実験、固体物理、化学、医学への応用と、広く利用されるようになった。

この原子核のエネルギー状態は核の電荷とそれを取りまく核外電子、核の電氣的四重極能率と核のまわりの不均一な電場、核の磁気能率と核外電子や分子によって生ずる磁場などの相互作用によってごく僅か(γ線のエネルギーに対し 10^{-12} 以下)な変化を生じ、その結果、エネルギー単位のshiftやsplittingとして現れてくる。以上の相互作用によって生ずる変化をそれぞれisomer shift, quadrupole splitting, magnetic splittingと呼び、メスバウワー効果によって初めて精密な測定が可能になった。この超微細構造スペクトルすなわち、メスバウワースペクトルの分析は複雑な化学構造や結晶構造を解析する上に非常に重要な役割をもっている。これまでに知られて

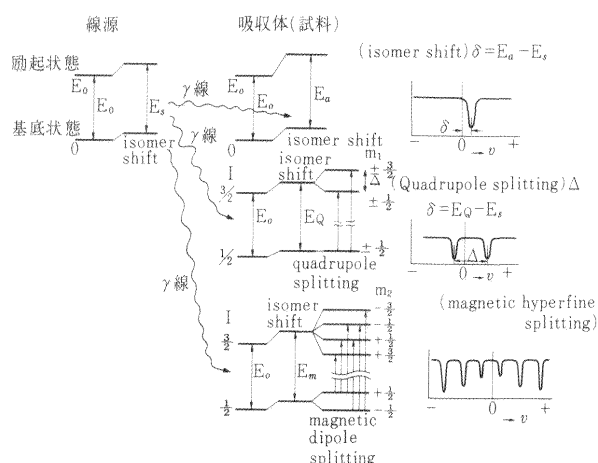


図1 3つのメスバウワースペクトルとその原子核エネルギー準位図

いるメスバウワー効果を起こす同位元素は Fe^{57} , Ni^{61} , Sn^{119} , W^{182} , Ir^{191} のほか稀土類の Sm^{149} , Eu^{151} , Gd^{155} など約30種類に及んでいるが、特に Fe^{57} は常温においても顕著な吸収効果を示し、測定し易い同位元素として最も広く使用されている。また、 Fe^{57} による重力場でのγ線のエネルギーシフトの測定¹⁾は地球上で初めてアインシュタインの相対

進藤勲夫,*
平郡和良,*

志村栄政,*
松下 甫*

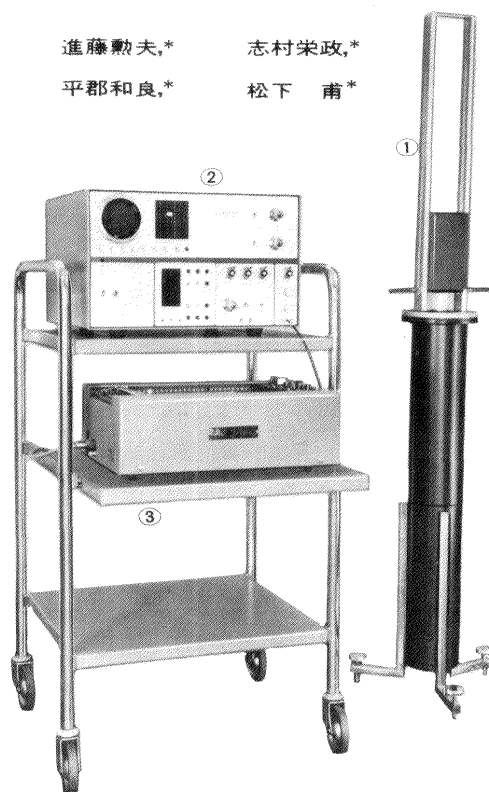


図2 メスバウワースペクトロメーターの外観
① メスバウワー分析器
② RAH-403形 400チャンネル分析装置
③ X-Yレコーダー

目次

■メスバウワースペクトルの分析と日立400チャンネル分析装置の応用

進藤勲夫, 志村栄政, 平郡和良, 松下 甫	1
■高速波長走査分光光度計の使用経験	亘 弘 3
■RSP-2形 日立ラピッドスキャン分光光度計による 5-アミノトロポロン類の、光反応中間体の追跡	平井崇子, 小林映章 4
■原子吸光分光分析法による血清カルシウムおよび 血清マグネシウムの測定	
特に基礎的な二、三の問題について	
村中日出夫, 一井 稔, 叶 好子, 須藤健吾	5
■101形 日立分光光度計による測定	福満 元 9
■115形 日立分子量測定装置の測定例	
混合溶媒, 緩衝溶液溶媒の使用例および 分子構造の解明(重合数, 解離度等)例	山田英雄 13

性理論「光の重力場による赤方偏位」を実証した。このほか、磁性体の内部磁場の測定²⁾や、 Fe^{+2} と Fe^{+3} のイオン価の違いによる血中ヘモグロビンのメスバウワースペクトル分析³⁾など多くの報告がある。

メスバウワースペクトロメーターは一般に結晶体に埋められた放射性同位元素（線源）を共鳴吸収をする薄い試料に対し等速度運動あるいは等加速度運動させ、線源から出るrecoilless γ 線にドブラー速度による運動エネルギー $\Delta E = E_s \cdot \frac{v}{c}$ 、(E_s : γ 線エネルギー)を加減しながら速度 v に対して試料を透過する γ 線強度の変化を測定する方法が用いられている。このようにして試料の共鳴エネルギー準位 E_a が

$$E_a = E_s \pm \Delta E = E_s (1 \pm \frac{v}{c})$$

のところで共鳴吸収が生じ試料を透過する γ 線強度が減少する。

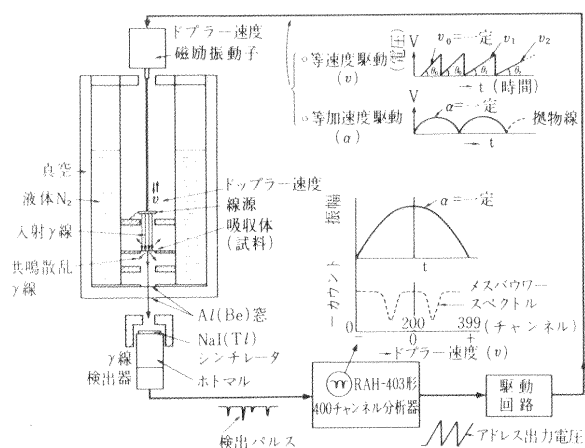


図3 メスバウワースペクトロメーターの原理図

図3は400チャンネル分析装置を用いたメスバウワースペクトロメーターの原理図を示している。この装置の動作は、先づ等速度駆動の場合には、400チャンネル分析装置のアドレスをある一定時間でゆっくり進め、アドレスのD-A変換出力を駆動回路によってその電圧の大きさに比例した時間でリニアスweepする鋸歯状波電圧に変換して磁励振動子を駆動させる。磁励振動子の先に取り付けられた線源はアドレスが止まっている間一定速度で運動する。一定時間間隔でアドレスが進むに従い線源の速度は少しずつ変化しそれぞれの時間間隔内に試料を透過した γ 線はシンチレーション検出器で検出され400チャンネルの各アドレス記憶コアに積算されて行く。次に等加速度駆動の場合には、400チャンネル分析装置のアドレスを高速で動かし繰り返ししながら、そのD-A変換の階段的リニア出力を積分回路により拋物線状電圧にして磁励振動子を駆動する。この場合、線源はアドレスが進むに従って速度が一定の大ききで変わるいわゆる等加速度運動をなし、刻々に検出される γ 線はその時のアドレスに計数記憶されこの一周期の動作が繰り返し行われる。

この装置の特長は線源と試料を共にクライオスタットで液体窒素の低温に冷却できるほか、試料温度を変えてスペクトルの温度に対する変化を調べることができること、400チャンネルに分析装置と連動して簡単に等速度と等加速度の駆動切り換えができる点である。等速度駆動は一部の速度範囲を短時間に精度よく測定するとき

便利であり、等加速度駆動は短寿命の線源を使用するときや、測定条件の変化を考慮しなければならないときに有効な方法である。この装置の主な性能仕様は次の通りである。

- ドブラー速度範囲 0 $\pm$ 3, $\pm$ 5, $\pm$ 10, $\pm$ 20mm/sec 4段切換
- 速度リニアリティー 各レンジフルスケールの1%以下
- 温度 可変範囲 $-180^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$

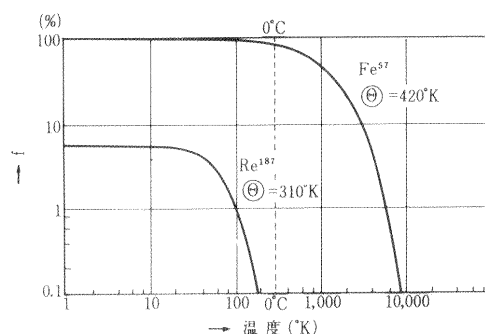


図4 Debye-Waller factor と温度の関係：
f: Debye-Waller factor ...メスバウワ一効果を起こす recoilless γ 線による遷移の割合を示す。
(H): Debye 温度

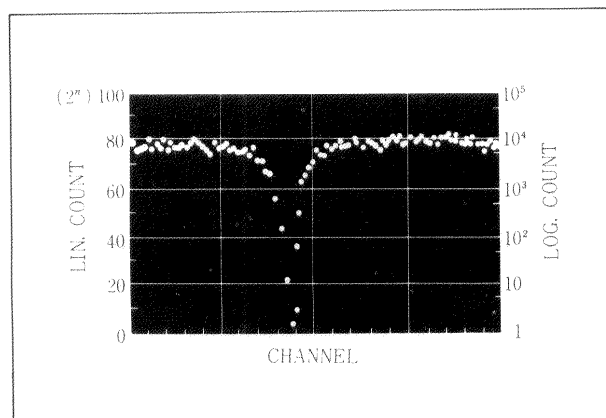


図5 Isomer shift の測定例
線源: $\text{Co}^{57}-\text{Cu}$
試料: $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5mg/cm²
Isomer shift $\delta = -0.4\text{mm/sec}$
分析条件: ドブラー速度 $\pm 3\text{mm/sec}$

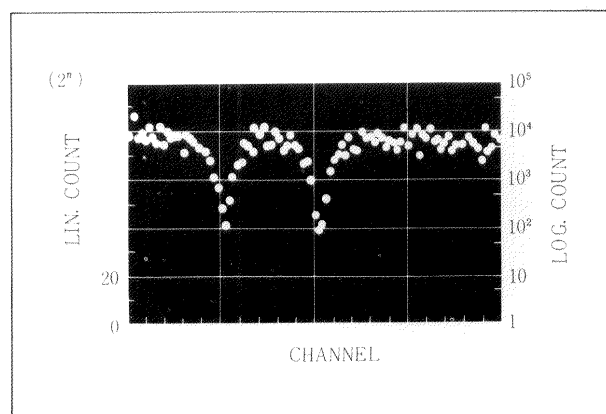


図6 Quadrupole splitting の測定例
線源: $\text{Co}^{57}-\text{Cu}$
試料: $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5mg/cm²
Quad. splitting $\Delta = 1.7\text{mm/sec}$
Isomer shift $\delta = 0.45\text{mm/sec}$
分析条件: ドブラー速度 $\pm 3\text{mm/sec}$

図4は Fe^{57} , Re^{187} の温度とDebye-Waller factorの関係を示したもので Fe^{57} は常温でも十分にメスbauer効果を示しうることがわかる。また、図5～図7はそれぞれ Co^{57} ～Cu線源によるisomer shift, quadrupole splitting, magnetic hyperfine splittingの代表的なメスbauerスペクトルの分析例でいずれも常温で測定された結果である。

- 参考文献：1) R. V. Pound and G. A. Rebka, Jr., Phys. Rev. Letters 4, 337 (1960)
 2) R. Bauminger, S. G. Cohen, A. Marinov, and S. Ofer, Phys. Rev. vol 122 No3. 743 (1961)
 3) U. Gonser, R. W. Grant, J. Kregzde, Appl. Phys. Letters 3, 198 (1963); ibid. 4, 23 (1964)

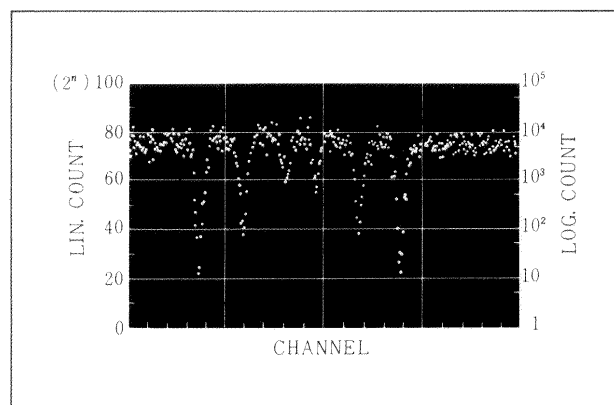
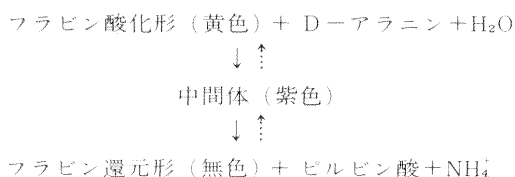


図7 Magnetic hyperfine splitting の測定例
 線源： Co^{57} -Cu
 試料：natural Fe 10mg/cm²
 ドブラー速度：±10mm/sec Full scale

■高速波長走査分光光度計の使用経験

10年前私共は、フラビン酵素の一つであるD-アミノ酸酸化酵素が基質で還元されると、中間体を経由することを見出した。¹⁾ この中間体は紫色で、D-アミノ酸酸化酵素の酸化形（黄色）が基質のD-アラニンで還元されると共に形成される。その後反応が進行して、還元形（無色）となる。



この中間体は上記のスキムのように酵素反応中に観察されるから、当時大阪市立大学医学部生理学教室にあったAmer. Opt. Co.のラピッドスキャン分光光度計を使用させていただいて、中間体のスペクトルを得た。ブラウン管上に出る透過率のスペクトルを、一定時間毎に写真に撮るという方法で記録した。しかし、スペクトルの線が非常に太いことと、フィルムの枚数が多いことのため、実験後のデータ処理に困り、この実験のみで精度のよい反応速度定数を決めることはできなかった。その後、中間体が酸化形及び還元形と共に平衡関係にあることがわかったので、通常の分光器を用いればよいと考えた。しかし、D-アミノ酸酸化酵素のフラビンは光還元性を持つので²⁾、速やかに吸収スペクトルを取ることが要求される。

最近日立RSP-2ラピッドスキャン分光光度計で、上述の実験を繰り返した。本機は西ドイツHowald社のRapid Spectroskop TB13と同じく吸収度スペクト

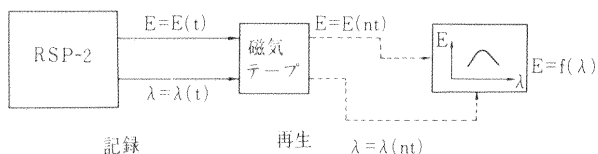


図1 ブロック図 nはテープ速度の変換比を示す。

* 大阪大学医学部 第一生理学教室

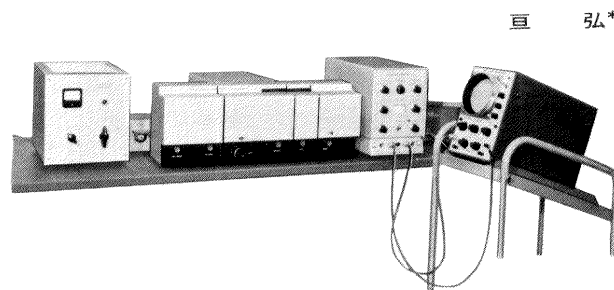


図2 RSP-2形 日立ラピッドスキャン分光光度計

ルをも得られる。ただ波長走査時間は、設定する波長範囲において、150msecであるので、生化学ないし生物物理学の領域で要求される波長走査時間に比べて決して速いものとはいえない。しかしcontinuous flow法を用いるときには、数msec程度以上の寿命を持つ物質又は状態のスペクトルを求めることができるから、Stopped flow法で得られる情報量よりもはるかに多いという利点を持つ。

本機などの高速波長走査分光計のスペクトルの記録法について考えなくてはならない。蓄積形オシロスコープを用いて、あらかじめ設定したいいくつかの時間におけるスペクトルを重ね合わせて残し、写真にとるという手法が普通だが、設定しない時間でのスペクトルは全部失われるという欠点がある。波長走引したスペクトルをブラウン管上にうつし、同期した映写装置により写真に残す方法も、電磁オシロを用いて感光紙に書かせる方法も、ほう大なアナログ信号をフィルム上もしくは感光紙上に記録してしまうので、実験後のデータ処理は困難をきわめる。

そこで実験を行うにあたって、RSP-2よりの吸収の信号時間変化 $E=E(t)$ と、波長信号 $\lambda=\lambda(t)$ の二つを別個に磁気テープに収録させるようにした。実験後再生して $E=f(\lambda)$ の曲線を求めることになる。図1にブロック図を示す。図3には実験結果を示すが、データコーダーの再生速度を4分の1におとし、蓄積形オシロスコープの上に10秒毎に（つまり実験では2.5秒毎に）スペクトルを書かせ重ね合わせたものである。450m μ に極大吸収を持つ酸化形が、基質添加後吸収が減少すると共に550m μ

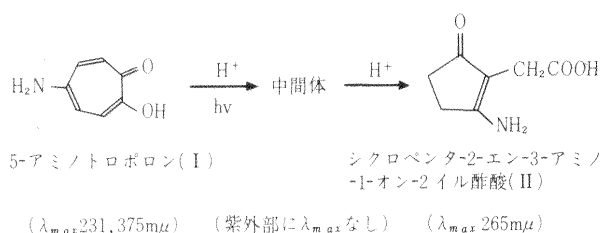
付近に幅広い吸収を持つ中間体が出現し、さらに時間の経過と共に全部の吸収が減少して還元形になることを示している。

このように、磁気テープなどを用いて電気的な量として記憶させておくと、必要な実験結果のみを自由に再生させることができ、実験の反復を必ずしも必要としないことがある。さらにデータ処理装置（デジタル記録装置）、電子計算機とを併用すれば、中間体のみのスペクトルや反応速度定数などを求めることができる。

- 1) H. Kubo, H. Watari and T. Shiga, Bull. Soc. Chin. Biol., 41 681 (1959)
- 2) H. Watari, K.-J. Hwang, K. Ashida and K. Kinoshita, Biochim. Biophys. Acta, 128 256 (1966)

■RSP-2形 日立ラピッドスキャン形分光光度計による5-アミノトロポロン類の光反応中間体の追跡

5-アミノトロポロン(Ⅰ)類に紫外線を照射すると容易に5員環化合物(Ⅱ)類となるが、この反応が観測し得る程度に安定な中間体を経て進行することを見出したので、日立ラピッドスキャン形分光光度計(RSP-2)によりその反応過程を追跡した。



これは紫外部に吸収をほとんど持たない反応中間体が光反応で生じ、さらに暗所で5員環化合物へと後反応が進行することを示すものである。

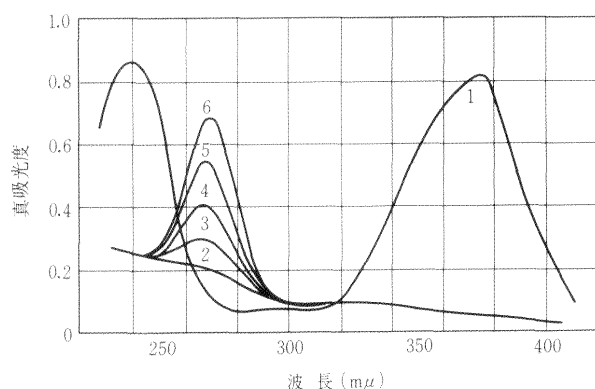


図1 照射5-アミノトロポロンの放置による吸収スペクトルの変化 0.005規定硫酸メタノール溶液)

1	照射前
2	照射直後
3	照射後 10s 放置
4	" 30s "
5	" 1min 放置
6	" 5min "

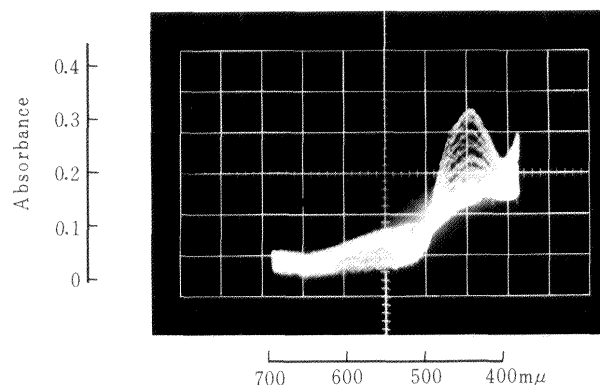
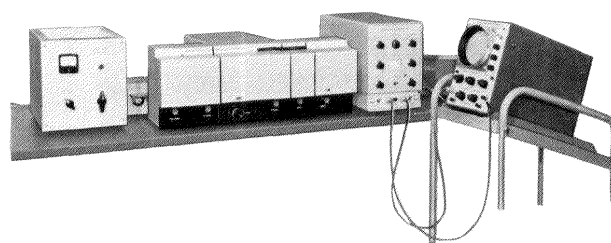


図3 D-アミノ酸酸化酵素の基質による環元
各々のスペクトルは、2.5秒毎のもの(酵素濃度
 $4 \times 10^{-5}\text{M}$, L-アラニン $5 \times 10^{-3}\text{M}$, 15℃)

平井崇子*小林映章*



RSP-2形 日立ラピッドスキャン形分光光度計

これら中間体は室温では不安定で通常の分光光度計ではその紫外吸収スペクトルを正確に測定することが困難である。ところが日立で製品化したRSP-2ではわずか0.15秒で紫外吸収曲線を測定することができるので、かくのごとき速い反応あるいは不安定な中間体の測定に偉力を発揮する。

図1に5-アミノトロポロンの0.005規定硫酸メタノール溶液をウシオ製500W超高圧水銀灯(uv29フィルタ併用)で、30秒照射した後、室温で放置した際の吸収スペクトルの変化を示した。紫外線照射により5-アミノトロポロン特有な吸収(図1曲線1)は一度消失するが、光を遮断した後で265mμに吸収極大が生成してきている。

図2は5-メチルアミノトロポロンの0.2規定硫酸メタノール溶液を照射した結果であり、同図によれば5-メチルアミノトロポロンの場合も一度紫外部の吸収は消失し、さらに268mμに吸収極大のある5員環化合物へと後反応が進行することがうかがわれる。

反応速度を追求するためにはRSP-2を波長固定法で用いたほうが便利であり、図3に測定例を示した。これは後反応物の極大波長である265mμに波長を固定して、5-アミノトロポロンの硫酸メタノール溶液を照射した際の後反応の進行過程を吸光度の変化から追ったものである。図中1と2の曲線を比較すると、測定溶液の酸の規定度が高いほうが後反応速度が大きいことがわかる。

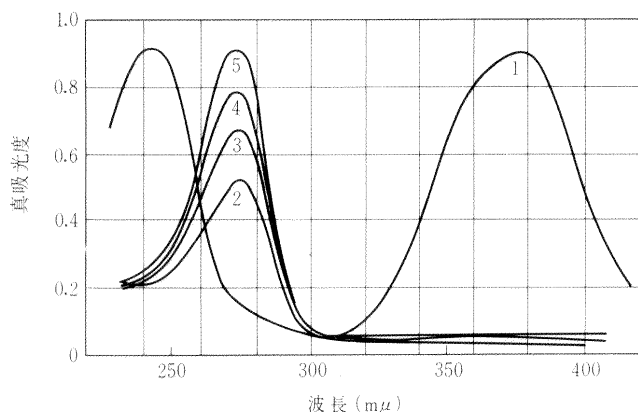


図2 照射 5-メチルアミノトロポロンの放置による吸収スペクトルの変化(0.2規定硫酸メタノール溶液)

- 1 照射前
- 2 照射直後
- 3 照射後 10s 放置
- 4 " 20 "
- 5 " 2 min "

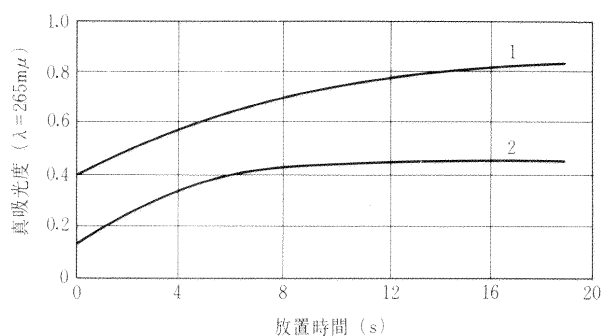


図3 波長固定法により測定した照射 5-アミノトロポロンの後反応

- 1 測定溶液の酸性度 0.2 規定
- 2 " 0.5 規定

■原子吸光分光分析法による血清カルシウム及び血清マグネシウムの測定、特に基礎的な二、三の問題について

村中日出夫* 一井 稔** 叶 妙子*** 須藤 健吾****

A. Walsh (1955)²⁾により開発された原子吸光分光分析法をJ. B. Willis (1960)^{4)~7)}が生体試料中の微量金属の測定に導入して以来、そのすぐれた特異性と感度、さらに測定操作の簡便という点から多くの臨床研究者の注目を浴び、いろいろの検討がなされてきた。特にマグネシウム、カルシウムについてはすでに臨床的に多く用いられている。^{8)~16)}しかし生体内金属はその含有量が微量でまた数多くの無機物、有機物と共存するため複雑な干渉が起こり、測定上いろいろの問題を提起する。なかんずく、血清カルシウムの測定は干渉が最も著明におこり、血清中の他の共有電解質(特に磷)や蛋白質による影響が大きく問題となる。この点について二、三の検討を加えた。

実験方法

〔分析機器〕

日立139-0420形原子吸光分光測定装置を使用し、バーナーは特に水冷とした。光源は日立Ca-Mg複合ネオン封入中空陰極ランプを用いた。

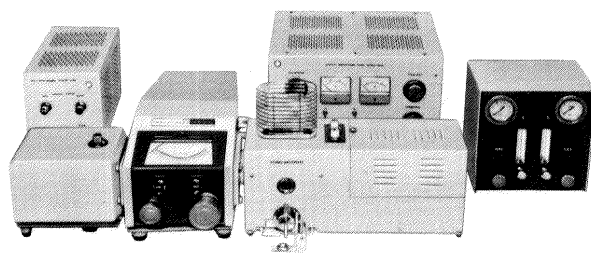
〔試薬〕

使用した水は脱イオン水を硝子製蒸留器で再蒸留したものである。

塩化ストロンチウム(SrCl_2)は試薬特級を、塩化ランタンは特級が入手困難で試薬一級を用いた。これらはメーカー、ロット差により夾雑するカルシウムの量にかなり差があり、時としていちじるしく多量のカルシウムを含有することがあるので注意を要する。

〔測定条件〕

いろいろ検討の結果¹⁷⁾、表1のごとくした。カルシウ



139-0420形 原子吸光付属装置を装着した139形日立分光光度計

ム測定の際はアセチレン流量を多くしてカルシウム原子の濃度が高くなる fuel Richな炎を用いて吸光を増大せしめた。空気-アセチレン炎では内炎のすぐ上がカルシウム原子濃度が高いといわれるが¹⁾、著者などの実験ではランプ光路がバーナー上約6mmの所を通る時がカルシウム吸光が最も大きいという結果を得た¹⁷⁾。

実験成績ならびに考察

原子吸光分析法でおこる干渉は大きく次の三つ、すなわち分光的、化学的及び物理的干渉に分けられる。血清中カルシウム、マグネシウムの測定の際におこる電解質や蛋白質の影響では前者が化学的、後者が物理的であるといえる。

表1 装置及び測定条件

Instrument and Condition		
Hitachi 139-0420, Cooling Burner		
Burner height at mark I, Light pass 6 mm. above the burner top		
	Ca	Mg
HCL (Ne)	422.8 mμ	285.2 mμ
I	7-10mA	7-10mA
Slit	0.15 mm.	0.2 mm.
Acetylen	1.7 L/min.	1.5 L/min.
Air	7.0 L/min.	7.0 L/min.

* 日本専売公社京都病院検査科・内科医長、京都大学内科第二講座 非常勤講師
 ** 日本専売公社京都病院検査科 技師
 *** 日本専売公社京都病院検査科 主任技師
 **** 日立製作所 那珂工場

〔リンの影響〕

カルシウム、マグネシウムの原子吸光分析でおこる干渉中最大のはリンによるものであって、このことについてはすべての研究者が認めている所である。^{1)~8)} そしてこのリンの干渉を除去するためにSrやLaのごとき重金属や、EDTAのごときキレート剤を用いることが有効であると報告されている。^{7)~16)} 図1に示した著者などの成績でもリンはかなりの低濃度でもカルシウムの原子吸光を減少せしめる。SrやLaの添加はリンのこの作用を抑制するが、SrよりもLaの方がその抑制作用が強いようである。マグネシウムに関してはこの程度のリン濃度ではほとんど影響を受けない。

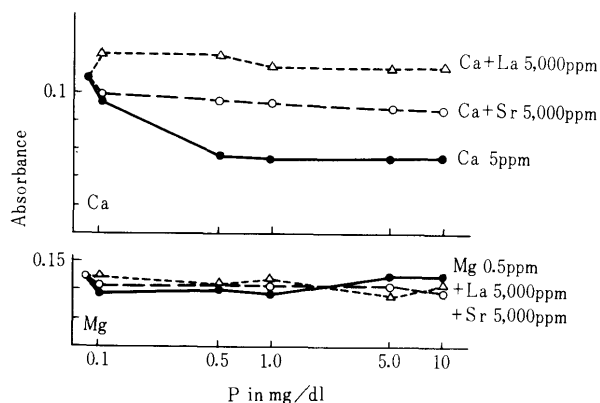


図1 カルシウム及びマグネシウムに対するリンの影響

〔血清中共存電解質の影響〕

図2に示したごとく、カルシウムに対してはカリウムが、マグネシウムに対してはナトリウム、カリウムが共に軽度の吸光減少をきたす。このことは他の報告者の成績^{4)~8)}と必ずしも一致しない。これはそれぞれの研究者が使用したバーナーの形、性能、また使用燃料ガスの種類により差が生じたものであろう。

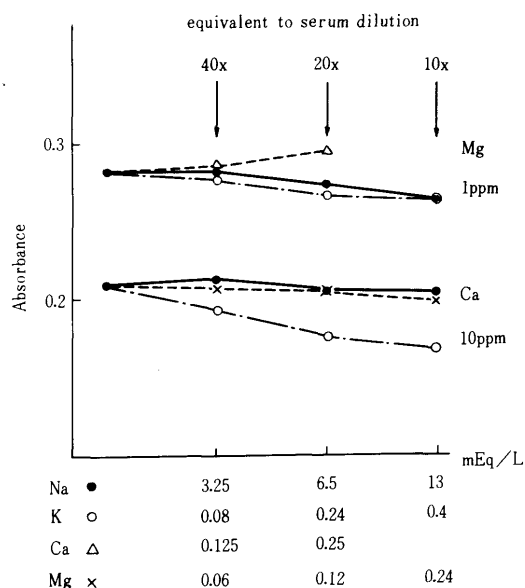


図2 カルシウム及びマグネシウムの原子吸収に対する血清中電解質の影響

〔糖、蛋白質の影響〕

血清中に含有される有機成分として大なる部分を占めるものは糖と蛋白質である。糖のカルシウム吸光に及ぼ

す影響は図3のごとく高濃度ではカルシウム吸光を増大せしめるが、正常血清中に存在する程度の糖濃度では著明な影響は認めない。これに反して蛋白質は低濃度でもカルシウム原子吸光を増大せしめる(図4)。このことはZettnerなど⁸⁾も述べている所で、彼等は蛋白のFoaming actionによる吸光増大と考えている。血清カルシウム測定の際20倍程度の稀釈では蛋白のこの干渉はかなりあるものと考えてよい。マグネシウムの測定に際しては蛋白質の影響はほとんどなく、考慮しなくてよい。

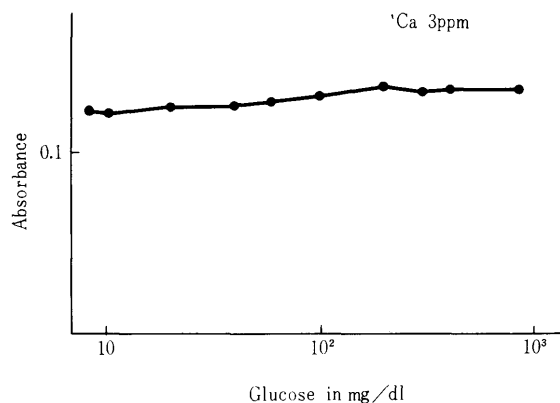


図3 カルシウムの原子吸収に対するブドウ糖の影響

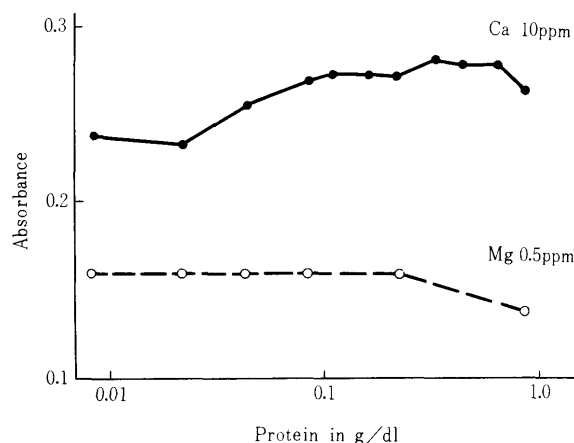


図4 カルシウム及びマグネシウムの原子吸収に対する蛋白の影響

〔Sr, La添加の可否〕

血清カルシウムの測定に際し、リンの干渉除去のためSrまたはLaを添加することが必要であると多くの報告者は述べている。Willis⁴⁾はトリクロール醋酸による除蛋白を用いているが、また一方で単なる水稀釈または1% EDTA液による稀釈が測定条件の調整を細心の注意をもって行えばよい結果をあたえると報告している。著者らは単なる水稀釈、標準添加法、Sr1000ppm添加法の三法で血清カルシウム値を測定した所、図5に見るごとく、リンの干渉を除去し最も高値を得るであろうと予想したSr添加法が、逆に三法中最低値を示した。すなわち、Sr添加のカルシウム標準直線は単なるカルシウム水溶液標準直線より吸光が大きく、血清ではSr添加例の方が吸光が低いのかかる結果を得たと考えられる。図に示しては無いが水溶液であるカルシウム5mEq/Lを含むと記載さ

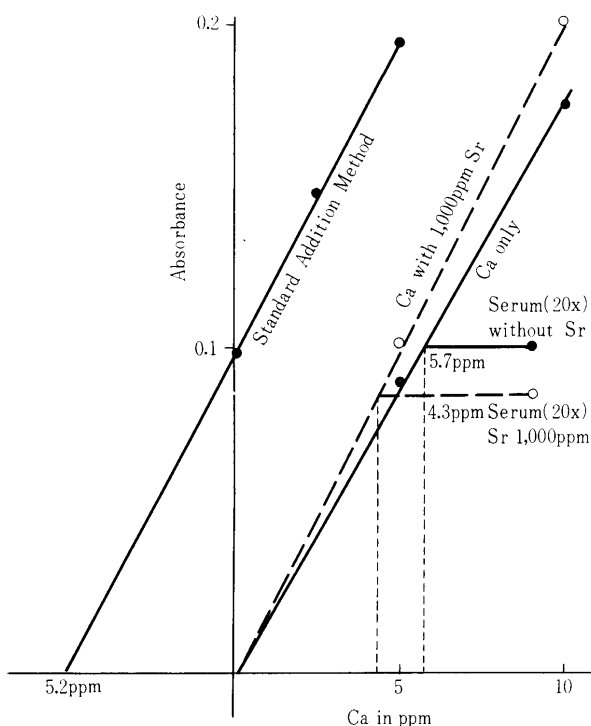


図5 様々な原子吸光分析方法による血清カルシウム値

れた焰光用標準液(Ca以外にNa, K, Mgを含む)をSr非添加, Sr添加の二法で測定した所それぞれ, 5.45mEg/L, 5.40mEg/Lとほとんど同じ値を得た。このことはSrなどの添加が血清の有機成分(主に蛋白質)に何等かの変化をあたえるためでないかということが予測される。次に図6, 図7に示す検討を行った。すなわちカルシウム, マグネシウムの標準及び血清稀釈液にそれぞれSr, Laをいろいろの濃度に添加した。カルシウム標準液にSrまたはLaを添加した時, Parkerなど²⁾の報告に見られるごとく, 低濃度(500~2500ppm)ではカルシウムの吸光は増加し, 高濃度になるとSr添加ではWillis⁷⁾の云うごとくカルシウムの吸光は減少する。La添加ではこの高濃度における吸光の減少は認められていない。血清にSrまたはLaを添加すると逆に500ppmで既に吸光は減少する。SrとLaとを比較するとLaの方が吸光減少におよぼす影響は少ないようである。マグネシウムの場合はカルシウムと大体似た傾向を示すが, 吸光の変化はほとんどなく影響はないとみなしてよい。

カルシウムについてさらに詳細に検討したものが図8であるが, 脱塩蛋白加Ca標準液にSrを添加すると, 血清の場合と同様のPatternを示した。燐を添加した脱塩蛋白加Ca標準液では燐非添加の時より吸光は減少するが, さらにこれにSrを添加していくとより一層低い吸光を示す。Srが高濃度になるとそれぞれの吸光の差は余り認められなくなる。血清を20倍以上, 40倍に稀釈した場合はSr添加により吸光の変化は少く, 同稀釈液中のカルシウム量に相当する標準水溶液の場合との差が小さくなる。図には示していないが100倍稀釈ではさらにこの差は減じ, 血清, 水溶液共ほとんど同じPatternを示した。以上のことからSrなど重金属を添加した血清稀釈液におけるカルシウムの吸光減少はこれら重金属と血清蛋白質との関連に起因すると考えられる。Zettnerなどもこのことを記載し, 重金属添加により起こる蛋白の部分的変性と粘度の増加

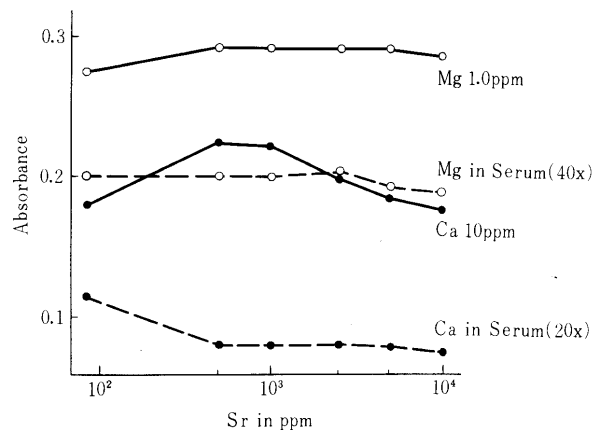


図6 カルシウム及びマグネシウムの原子吸収に対するストロンチウム添加の影響

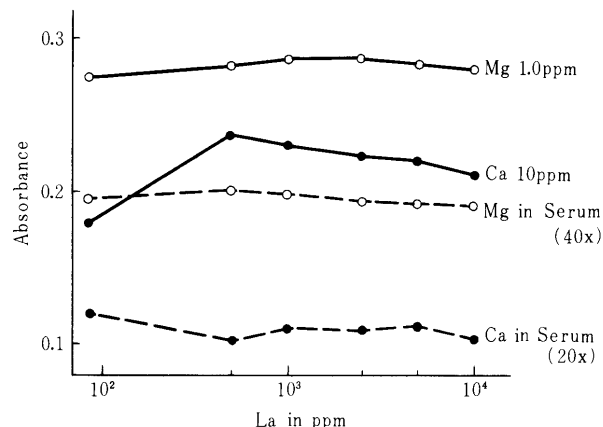


図7 カルシウム及びマグネシウムの原子吸収に対するランタン添加の影響

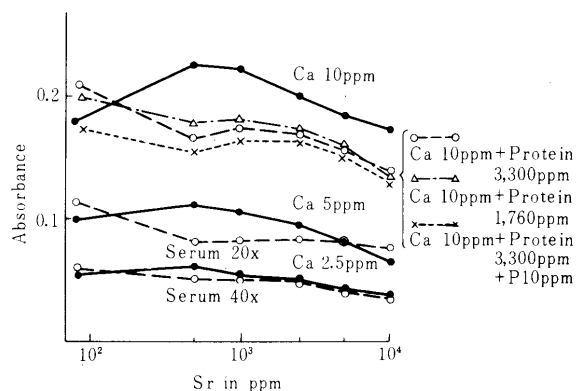


図8 カルシウムの原子吸収に対する蛋白とストロンチウムの影響

によるものと推測している。蛋白の部分的変性によりこのFoaming actionが低下し, 燐などの負の干渉因子が前景に出てくることも一つの原因ではなかろうか。現在臨床検査中膠質反応の一つとして用いられているコバルト反応, カドミウム反応は, ゴバルトないしカドミウムを血清に添加しその熱凝固に対する動きからアルブミン・グロブリン比の異常を知らんとするものであり, これをそのまま上述の事実にあてはめることは無理であろうが, 原子吸光分光分析法が高温の炎の中に試料を噴霧するものであるのでSrなどの添加が炎中で試料蛋白質の変性に何らかの影響をあたえるであろうことと関連づけられるように思える。このことはなお今後充分な検討を要する問題と考える。

血清をトリクロール醋酸で除蛋白し、Srなどを添加した場合は図9のごとき結果であった。マグネシウムでは標準水溶液、血清稀釈液共に同じ傾向を示し問題はないが、カルシウムではトリクロール醋酸除蛋白で血清の吸光は著減し、これにSrなどを添加するとカルシウム標準液にそれぞれを加えたと同じPatternを示す。一方カルシウム標準水溶液ではトリクロール醋酸添加でその吸光は増加することが見られた。

以上のことから血清マグネシウムの原子吸光分光分析法による測定にはほとんど問題点はなく容易に行えるが、血清カルシウム測定には複雑な因子がからみあっていることがわかる。血清カルシウム測定の際従来より述べられているSr, Laなどの添加は余り効果がなく、かえって干渉の問題を複雑にするようであり、むしろ単なる水稀釈の方が正負の干渉が相殺してよい結果をあたえるのではないと思われる。もしSr, Laを使用する時には、低濃度ではこのましくなく5000ppm以上を用いるべきであり、トリクロール醋酸除蛋白法を行うときはSr, Laなどを添加すべきである。SrとLaを比較すると、Srの方が容易に純度の高い製品を入手し得る利点があるが、上述の検討成績よりすればLaの方がこのましい。

実際測定上標準液として何を用いるかはまたむずかしい問題であり、理想的には最も血清と相似た諸種の成分を有する溶媒に一定のCaを溶解したものをを用いるべきであるが、これは実際上なかなか困難で、かつまた各血清によりカルシウム以外の成分もかなり変動を示すことがあるためこれらを完全に補正することはできない。いままで述べてきたように血清カルシウムの測定には複雑な

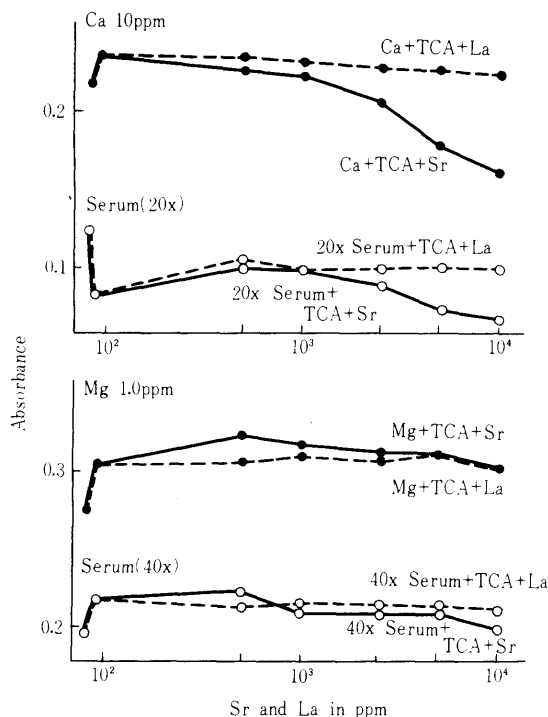


図9 トリクロール醋酸による除蛋白の際のカルシウム、及びマグネシウムの原子吸収に対するストロンチウム、ランタンの添加の影響

正、負の干渉がからみあっているので臨床的に用いる場合には標準液としてはカルシウム水溶液でよいのではないかと考える。標準添加法(三点法)が色々な意味から原子吸光分光分析法では最も正確な値をあたえるとされるが、試料使用量が多くなるためこのましくない。

〔実際の測定例について〕

いろいろの血清を水稀釈HCl添加、水稀釈La添加、及びトリクロール醋酸除蛋白La添加の三法で血清カルシウム値を測定してみると表2のごとくである。水稀釈La添加法とトリクロール醋酸La添加法はほぼ相似た値を示し、水稀釈HCl添加法が最も高い値であった。コントロール血清三種を用いた測定例では水稀釈HCl添加法で記載値に最も近い、良好な測定値を得た。

同一コントロール血清を用いての多重測定を行なった結果は表3に示すごとく、血清カルシウム、マグネシウム共変動係数が小さく、再現性は良好といえる。血清カルシウム測定の際HClをN/10になるごとく添加すると、しからざるものに比し再現性が良いようである。またLa添加の際にリンが高濃度であると混濁をきたすが、これはHCl添加によりこれを消失せしめ得ることを付記する。

表2 いろいろな方法による血清カルシウムの原子吸光法定量値

	Water Dilution		TCA deprot,
	with HCl	La5000ppm	La5000ppm
1	5.5mEq/L	4.1mEq/L	4.2mEq/L
2 *	4.8	4.8	4.7
3	4.7	4.1	4.4
4	4.0	3.9	4.0
5	4.7	4.6	4.5
6	5.4	5.1	5.1
7	5.3	4.4	5.1
8	5.6	4.5	4.5
9	5.1	4.5	4.5
10	4.8	4.6	4.3
11	4.8	4.4	4.4
12	4.3	4.3	4.6
13..	4.3	4.3	4.1
$\bar{X}$	4.88	4.47	4.49

* Metrix(Lot.517) 5.0 mEq/L
 † Versatol(301G323) 5.2 "
 .. Hyland(369C14) 4.45 "

表3 原子吸光法による血清カルシウム、マグネシウムの繰返し定量値

	Ca A A S (20X)		Ma A A S
	with HCl(N/10)	without HCl	(40X)
N	10	10	10
$\bar{X}$ mEq/L *	4.25	4.39	1.88
S.D.	0.052	0.100	0.052
C.V. %	1.2	2.3	2.8

* Hyland Control Serum 4.3mEq/L(4.2-4.4)
 ** Metrix " 1.8mEq/L

総 括

血清カルシウム、血清マグネシウムの原子吸光分光分析法による測定に関して二、三の基礎的な検討を加えた。血清マグネシウムの測定については干涉その他問題点はほとんどなく、感度も良好で充分臨床的に利用し得る。血清カルシウムについては多くの問題点がある。すなわち諸種共存物質による干涉、殊にリン、蛋白質によるものが大である。リンの干涉を除去する目的で水稀釈試料にSr, Laなどの重金属を添加することはこのましくなく、逆に低い測定値を得るが、トリクロール醋酸除蛋白法を行なう時にはSr又はLaを添加すべきである。Sr, Laを使用する時は低濃度でなく5000ppm以上の濃度で用いる方がよい。この干涉の問題は使用するバーナー、燃料ガスの種類によりかなり差を生ずるので、今後なお検討すべき点が多い。

このように血清カルシウムの本法による測定は血清マグネシウムに比し、なかなか難しいが、水稀釈HCl添加法で標準液としてHCl加カルシウム水溶液を用いた時が再現性もよく、良好な測定成績を示し、臨床的に応用できると考える。

今回の検討では血清カルシウムは20倍稀釈による測定を行なったが、上述したごとく稀釈倍数を40倍ないし100倍とある程度大きくした方が共存物質による干涉の問題も一見少なくなるように思われ、また使用血清量も微量ですむので、臨床的には望ましい。しかし共存物質個々の干涉が稀釈倍数の増加と共に必ずしも同率に減少すると断言できず、分析機器の感度増強もその方法により干涉の問題が変わってくるので血清カルシウム原子吸光分析法における血清稀釈倍数や感度増強については慎重に考えなければならない。これらの点に関して今後さらに検討を加えたい。

参 考 文 献

- 1) 武内次夫・鈴木正己：原子吸光分光分析法 第1版 昭和39年 南江堂
- 2) A. Walsh: Spectrochim. Acta, 7, 108, (1955)
- 3) A. Walsh: Spectrochim. Acta, 8, 317, (1957)
- 4) J. B. Willis: Spectrochim. Acta, 16, 259, (1960)
- 5) J. B. Willis: Spectrochim. Acta, 16, 273, (1960)
- 6) J. B. Willis: Spectrochim. Acta, 16, 551, (1960)
- 7) J. B. Willis: Anal. Chem, 33, 556, (1961)
- 8) A. Zettner et al: Clin. Chem, 10, 878, (1964)
- 9) H. E. Parker: Atomic Absorption News letter, No13, 1, (1963)
- 10) E. G. Gimblet et al: Clin. Chem, 13(3), 204, (1967)
- 11) W. K. Stewart et al: J. Lab & Clin. Med, 61(5), 858, (1963)
- 12) E. L. Pruden et al: Clin. Chem, 12(9), 613, (1966)
- 13) D. L. Trudeau et al: Clin. Chem, 13(2), 101, (1967)
- 14) E. W. Sunderman et al: Am. J. Clin. Path., 43(4), 302, (1965)
- 15) 酒井正衛: Hitachi S. I. News, 8(5), 355, (1965)
- 16) 宮崎好信他: Hitachi S. I. News, 10(2), 476, (1967)
- 17) 村中日出夫他: 未発表

■ 101形 日立分光光度計による測定

福満 元*

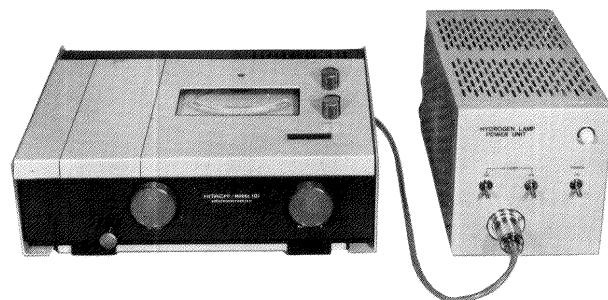
はじめに

現代分析化学における機器分析は産業界の発展、医、薬学、さらに農業化学分野などの進歩に伴ない、ますます拡大する傾向にあり、この中でも吸光分析法は主要な位置を占めている。

分光光度計は手動形と自記形に大別されるが、吸光法による品質管理、特定試料の同定、臨床検査、教育実験などでは一般に波長は固定的であり、吸収スペクトルも比較的単純なものが多く、分光器は手動形で充分である。我々は、信頼性、操作性が良好で、コンパクトな101形分光光度計を製作しているので、それによる測定例を報告する。

1) 高濃度領域での直線性(クロム酸カリウムの測定)

紫外、可視域における $K_2Cr_2O_7$ 溶液のスペクトルを図1に示す。図1において—○—○—線はN.B.S.設定値、—△—



101形 日立分光光度計

*日立製作所那珂工場 応用開発課

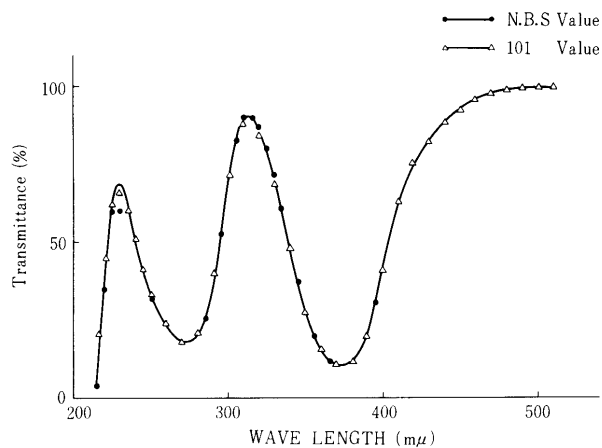


図1 クロム酸カリウム溶液のスペクトル

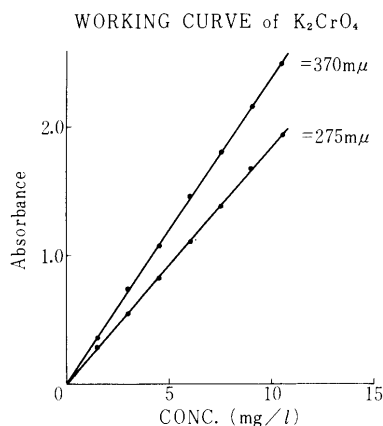


図2 K_2CrO_4 溶液の検量線

△-線は実測値で、よく合致した。さらに、370m μ 、275m μ で作成した検量線を図2に示す。それぞれ吸光度2.5、2.0まで直線性を示し、高濃度試料でも、精度よく測定できた。

2) 混濁試料の測定

クロレラ混濁液(クロロフィル・ピーク670m μ)のスペクトルを図3に示す。混濁液の吸収スペクトルは光散乱のため、従来、オパール・ガラス法、または積分球法で測ることを常としている。

101形は図4に示す光学系統図の中で、光電管室窓板に拡散板を使用しており、これがオパール・ガラスの作用を兼ね、さらに光電管と試料の距離も近く、光電面が広

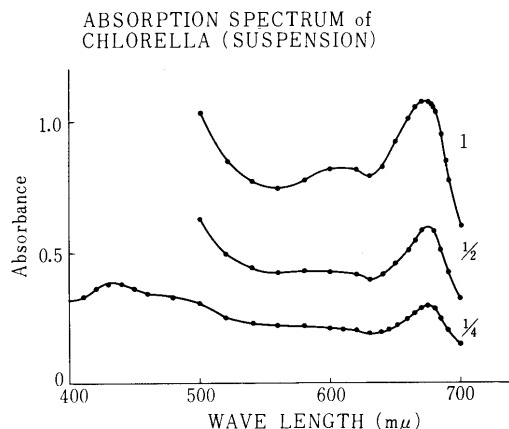


図3 クロレラ混濁液のスペクトル

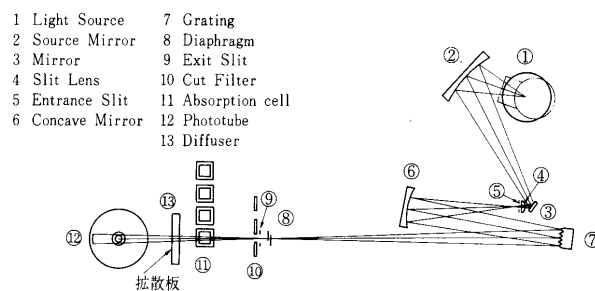


図4 101形 分光光度計光学系統図

表1 測定試料の調製

	ウラシル試薬	牛乳稀釈液	蒸留水	線量		100%合せ
透明	A	1 ml	9	10	○-○	蒸留水
	B	2	8	10	△-△	蒸留水
混濁	A'	1	2.5	6.5	○-○	C'
	B'	2	2.5	5.5	△-△	C'
	C'		2.5	7.5	●-●	

1) ウラシル試薬は 7mg/dl

2) 牛乳稀釈液は 1%牛乳水溶液

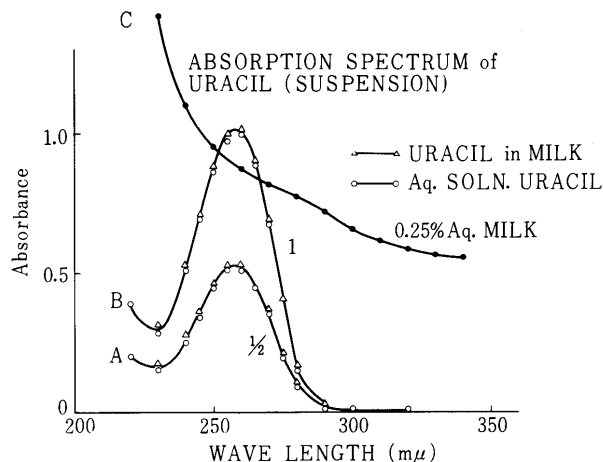


図5 ウラシル試薬の吸収スペクトル

いことなどから、101形では混濁試料の測定ができる。また、生化学分野では濁った試料が比較的多いが、例としてウラシル試薬の透明液と、牛乳添加液とを表1に示すように調製し、それぞれスペクトルを測ると図5に示す結果で、両方ともよく合致したデータが得られた。

3) 臨床検査(ジアグノグリーンの吸収測定)

肝、腎機能及び循環機能検査として血液中ジアグノグリーンの状態を吸光分析法で調べる方法が知られている。ジアグノグリーンは図6、7に示すように水溶液と血漿液の場合とでは、吸収ピークがそれぞれ780m μ 、805m μ と異なるが、101形は220~900m μ 間をカバーするので、臨床検査関係でも精度よく測れた。図8にジアグノグリーンの定量用検量線(波長805m μ)を示した。

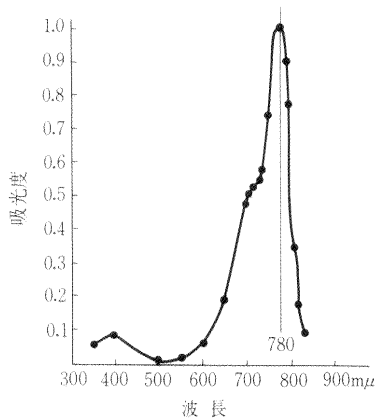


図6 水溶液の吸収曲線²⁾

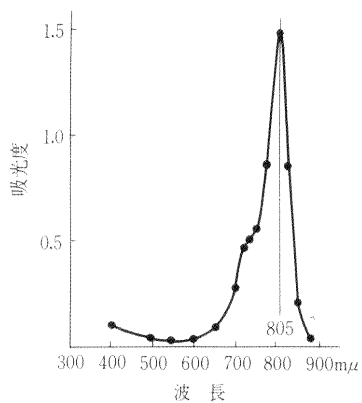


図7 血漿液の吸収曲線²⁾

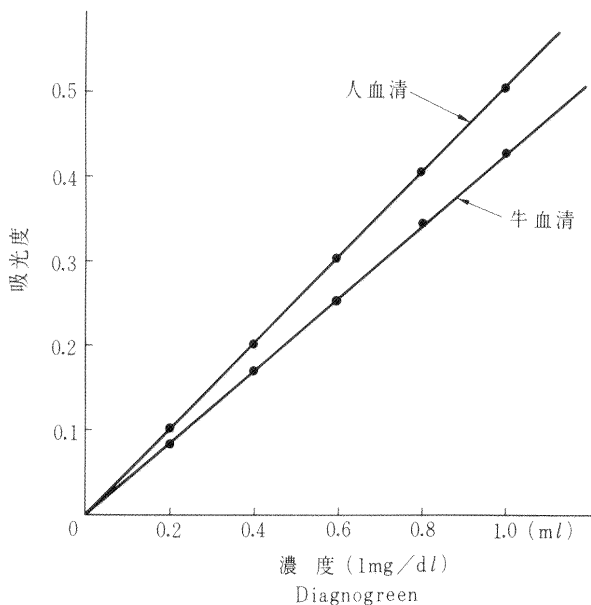


図8 ジャグノグリーンの検量線

4) 付属品による応用測定例

(A) スイクエンシャルサンプラー付属装置による測定
多種、大量試料の吸光度を測る場合、その試料をセルに移す操作だけで多くの時間を必要とするが、図9に示す付属装置を用いると、図中ロートへ検体を流し込むだけで、その透光度（または吸光度）の測定ができる。記録計を併用した測定例を図10に、それによる検量線を図11に示した。前試料の影響はほとんどみとめられなかった。

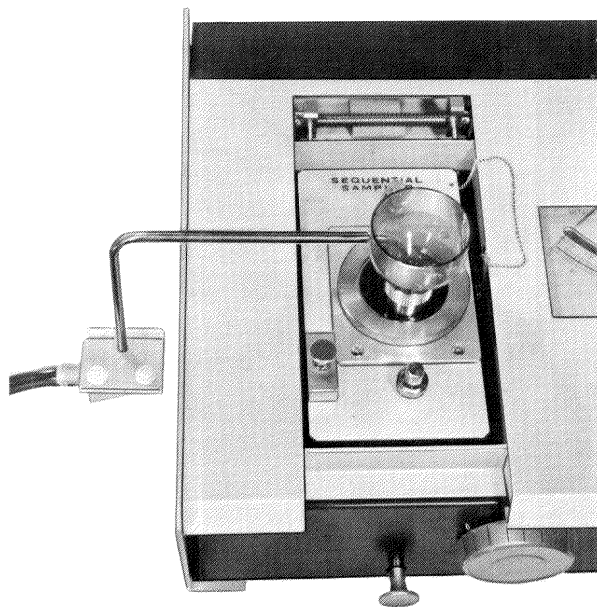


図9 スイクエンシャルサンプラー付属装置

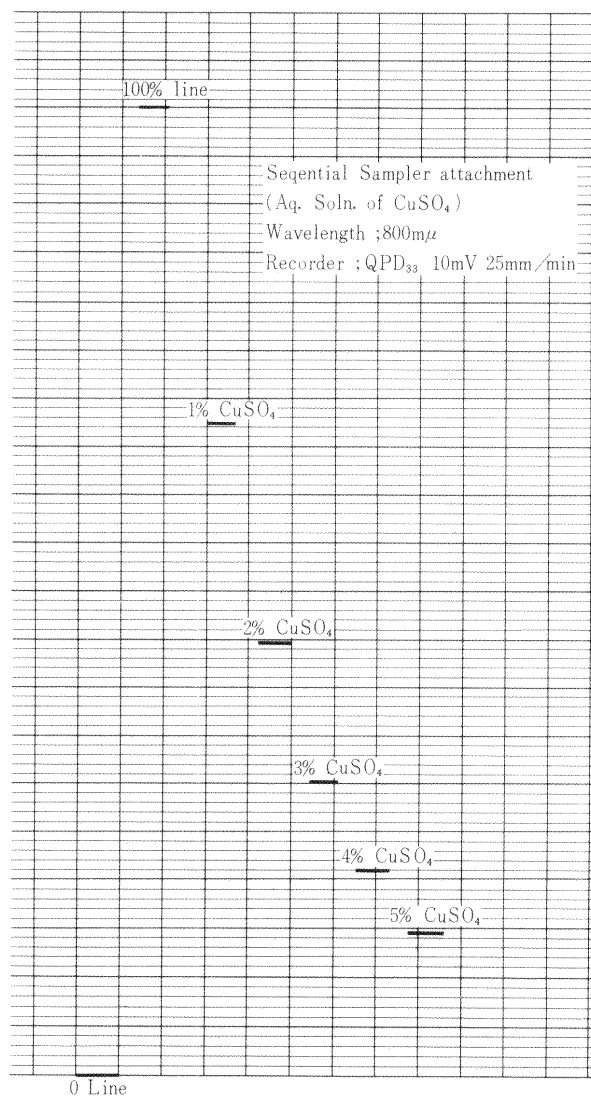


図10 スイクエンシャル・サンプラーによる硫酸銅の測定記録

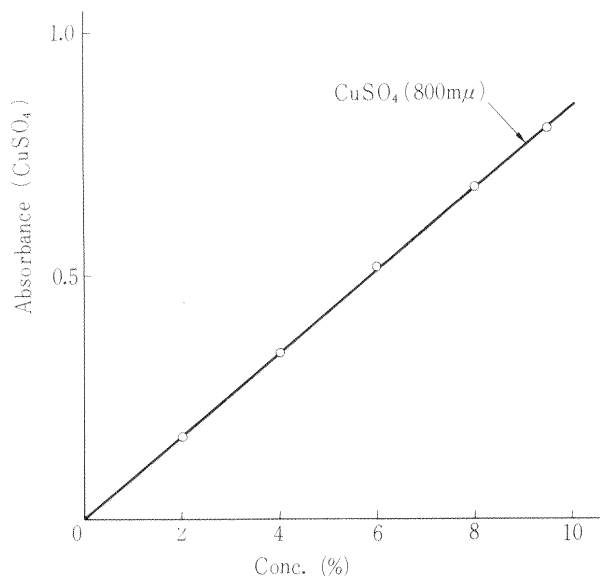


図11 スィクショナルサンプラーによる検量線

(B) オート・サンプルチェンジャー付属装置による測定
図12に示すように市販フラクションコレクタ、記録計を組み合わせ併用し、多数試料の透光度（吸光度）を連続的に測定するものである。図13、14に測定例、図15にそれらによる検量線を示したが、前試料の影響も比較的少なく測定できた。

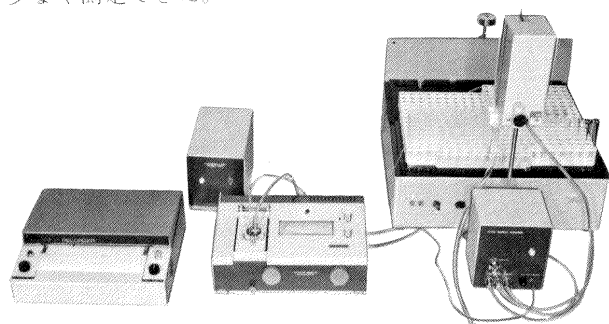


図12 オート・サンプルチェンジャー付属装置を装着した101形日分光光度計

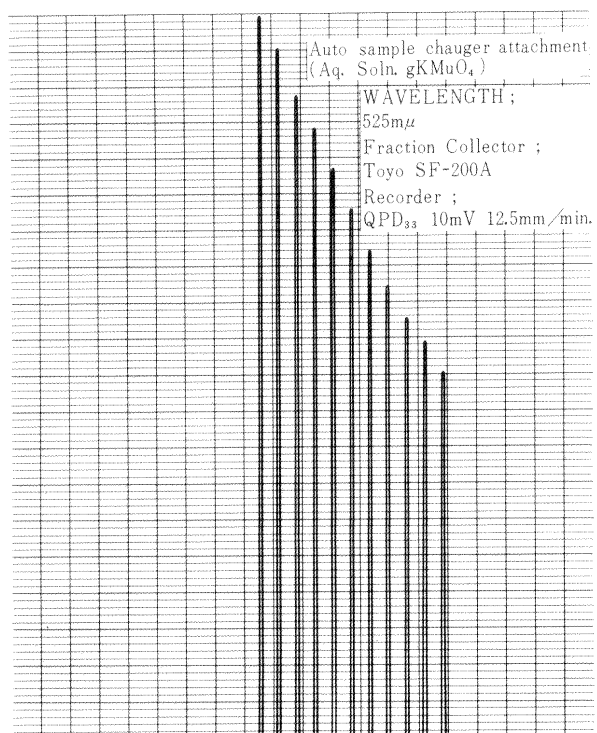


図13 オート・サンプルチェンジャーによる過マンガン酸カリウムの測定記録

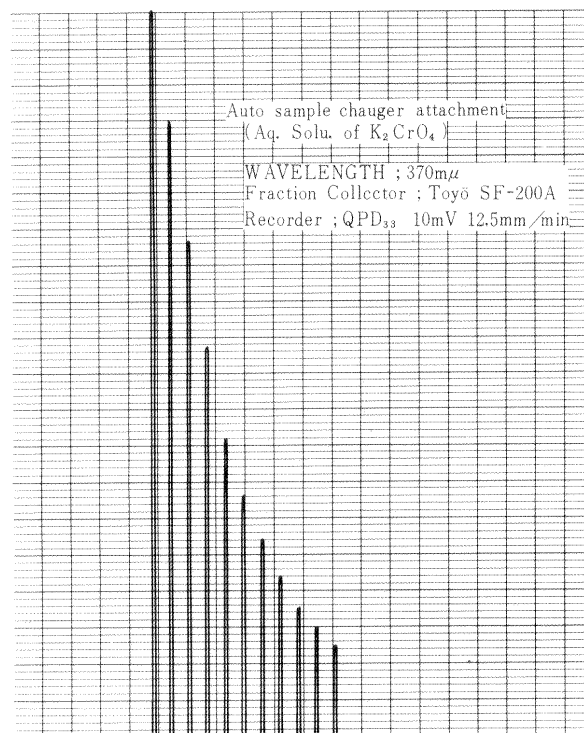


図14 オート・サンプルチェンジャーによるクロム酸カリウムの測定記録

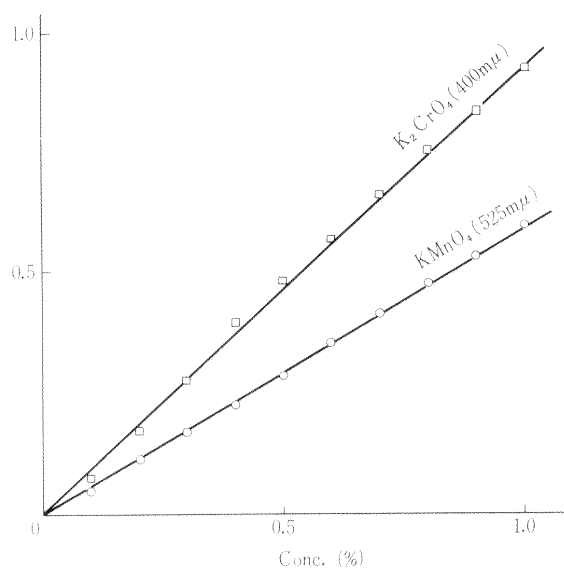


図15 各試料の検量線

まとめ

101形は安定性、操作性が良好なので、他の臨床検査はもちろん、鉄鋼化学分析、食品農学分析などへの活用が期待できる。また、付属装置による応用分野也相当広いと思う。今後、実試料による応用測定を進めていく考えである。

■115形 日立分子量測定装置の測定

—混合溶媒、緩衝溶液溶媒の使用例および分子構造の解明(重合数、解離度等)例—

1 緒言

山田英雄*

薬品、塗料、染料などの有機合成化学をはじめ、石油化学、油脂工業などの分野で物質の分子量を精度よく測定することは、物質の同定、及び品質管理などに重要であり、古くから種々の測定法が研究され用いられてきた。しかし、これらの測定法は装置が複雑な上に、測定に長時間かかり精度がよくなかったために、実験的に使用されほとんど実用化されていない。

115形日立分子量測定装置は、蒸気圧平衡法の原理を用いたもので、1930年Hillによって提起されたが熱探知器の感度不足などの難点があったため、実用化されずにいたものを、近年になって高感度のサーミスタの開発により実用化されたものである。この方式は高分子物質と低分子物質の中間物質であるいわゆる、オリゴマー領域で威力を発揮し測定値は数平均分子量を示す。

今後、各分野での基礎研究、品質管理などで、分子量測定をはじめその他の応用にきわめて幅広い利用が期待されている。

本報では、現在までに本器によって測定したいくつかの応用例を紹介する。

2 測定例

K_s 値について

蒸気圧平衡法にて未知物質の分子量を求めるためには、既知物質で測定に用いる溶媒について 1mol/kg の濃度の時の ΔT (サーミスターで ΔR に変換) を測定しておく必要がある。これが K_s 値であり装置的要因以外に溶媒、温度によって変化する。 $K_s = \Delta R / C_s (C_s \rightarrow 0) \times \text{既知分子量}$

(1) 尿素の測定例

水溶媒にて、尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)を測定した例を図1に示す。測定結果は分子量60.06とよく一致している。低分子量でも高精度で測定できる一例を示した。

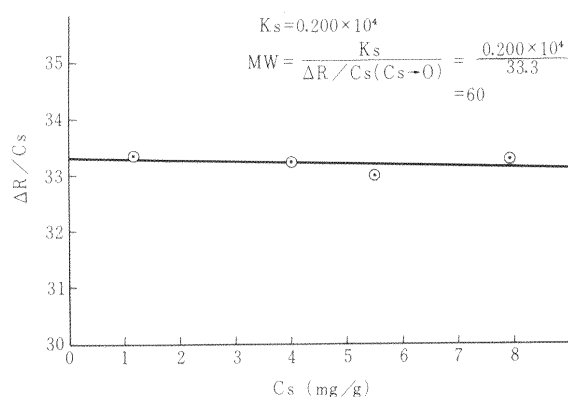


図1 水溶媒による尿素の測定例



115形 日立分子量測定装置

(2) 2種混合試料の測定例

蒸気圧平衡法による分子量測定は、数平均を示すことは原理的に知られている。

即ち、分子量を M_i 、分子数を N_i とした場合

$$\bar{M}_n = \frac{\sum M_i \cdot N_i}{\sum N_i}$$

で表わされる。図2に既知物質(コレステロール、トリステアリン)を適宜に混合したときの測定値と計算値の一例を示した。

多種混合系についても検討した結果は同様一致しており、本器は数平均分子量を測定していることが明らかである。

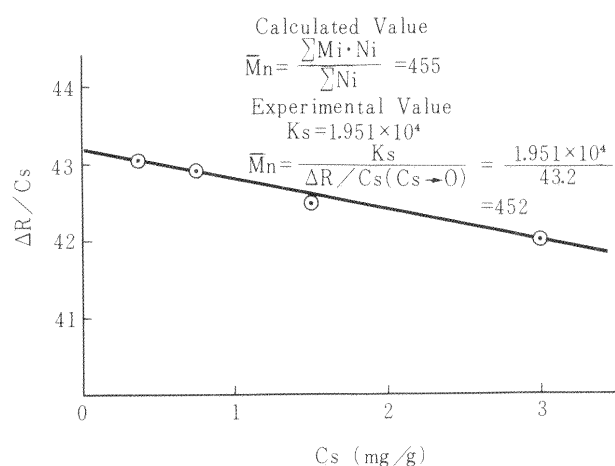


図2 コレステロールとトリステアリン2種混合試料の測定例

次に図3(a)(b)にその応用例を示した。既知物質が2つあってその混合比を、または薬品などの精製過程における純度を知りたい場合があり、計算によって数平均分子量—混合比曲線を作成しておけば測定値から混合比を、ただちに知ることができる。2量体混合比などの測定に応用できると考える。

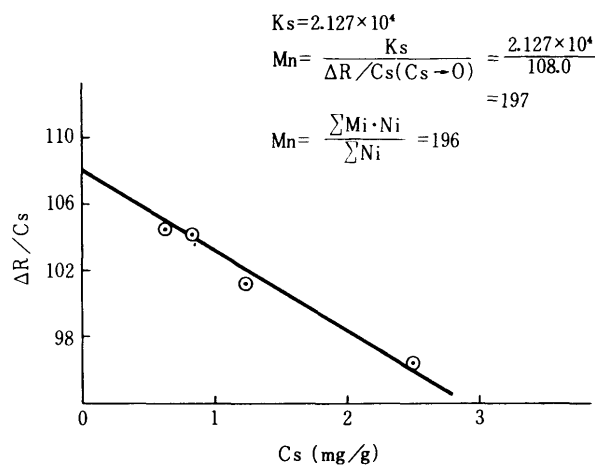


図3 (a) 2種混合物質の数平均分子量の測定例

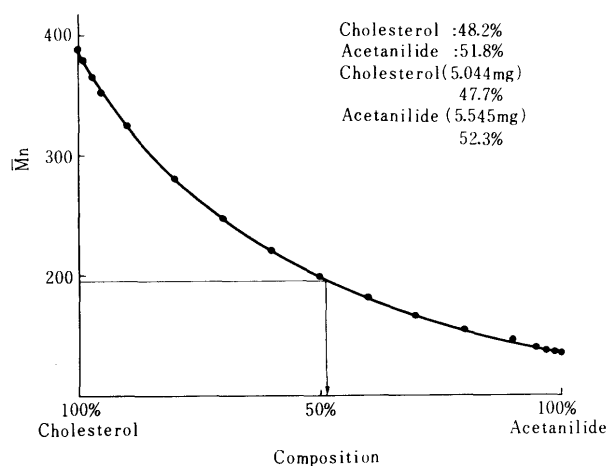


図3 (b) 混合物質の数平均分子量からの混合の測定例

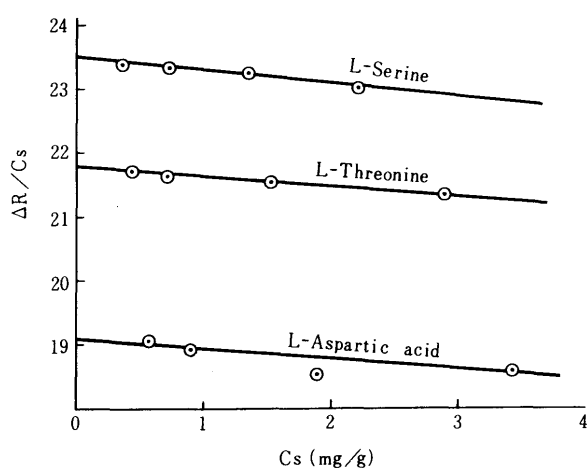


図4 重合度の測定例

(3) 重合数の測定例

元素分析計により実験式が $(C_{10}H_9N_3)_n$ であることが判明した物質を測定し重合数を測定した例を図4に示す。

実測された分子量から $n=2$ が決まる。RMU-6E 形日立質量分析計で分子量を測定した結果とよく一致している。このように、元素分析によって求めた実験式から重合数を求め分子式が本器により知ることができる。また本器は、質量分析計と比較しても測定結果が高精度であることが明らかである。

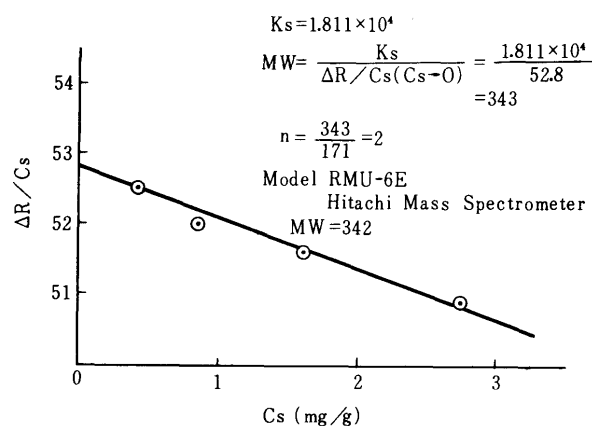


図5 過マンガン酸カリウム、塩化ナトリウムの水溶液中での解離度の測定例

(4) 解離度の測定例

過マンガン酸カリウムと塩化ナトリウムを水溶媒によって、水溶液中における分子量を測定した例を図5に示す。

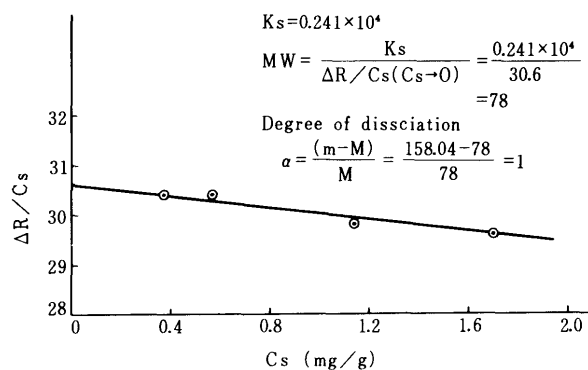
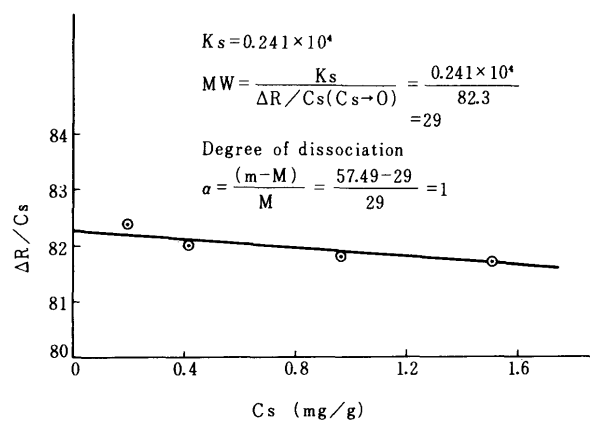


図6 ベンゼン・メチルアルコール混合液の K_s 値

す。測定された分子量は $\frac{1}{2}$ であり、これらから解離度(α)は、両者共に約1となる。このことは、希薄水溶液中では、ほとんど解離し、塩化ナトリウムは、 $\text{NaCl} \rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ 、過マンガン酸カリウムは $\text{KMnO}_4 \rightleftharpoons \text{K}^+ + \text{MnO}_4^-$ の平衡状態になっていることがわかる。このために、求められた分子量は、陽イオンと陰イオンの数平均分子量であるので $\frac{1}{2}$ となる。

このように本器は、有機化合物ばかりでなく、無機化合物における解離状態の測定などの研究にも応用できる一例を示した。

(5) 混合溶媒の応用

ベンゼンとメチルアルコールを任意に混合し、それぞれの混合液の K_s 値を図6に示す。混合割合に関連して K_s 値が定まることがわかる。このように溶媒効果が無視できる場合には混合を変えて K_s 値を上げて測定することができ、また溶媒の熱力学的な定数の測定も可能であると考える。

(6) 緩衝溶液を溶媒としての測定例

測定領域の拡大として、緩衝溶液(Na-クエン酸緩衝溶液、アミノ酸分析計用、PH4.26)を溶媒として、アミノ酸を測定した例を図7に示した。

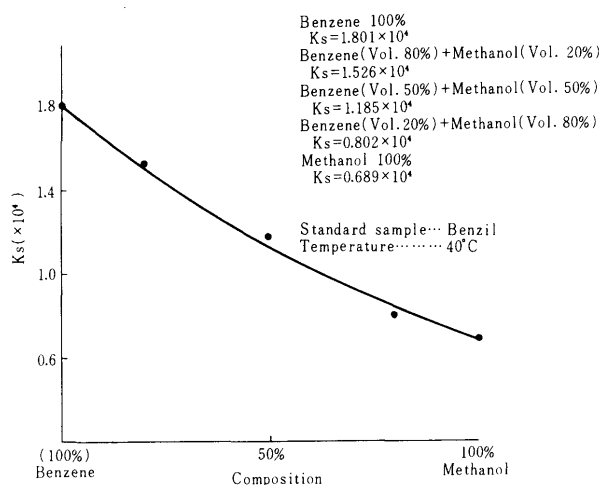


図7 緩衝溶液を溶媒としてのアミノ酸の測定例

一般に蒸気圧平衡法では、純度の高い溶媒を用いることが、必要であるという概念があり、溶媒には慎重な配慮を要求されてきている。

しかし、先にも述べたように混合溶媒でも安定な測定が可能であることが実験的に確かめられている。

緩衝溶液中でのアミノ酸分子量測定ができることから、本器は差分子量(吸光分析法における差スペクトル法と同義)が求められるのが判る。すなわち標準側に(水+Na-Citrate)試料側に(水+Na-Citrate+アミノ酸)を滴下すれば Buffer component は補償されて、アミノ酸のみの分子量が計測される。

難溶なサンプルを測定する場合、溶媒に溶解促進剤を加わえて使用することもできる。

また生理的食塩水を溶媒として、ブドウ糖を測定した例を図8に示した。注射液中の物質の同定もできよう。

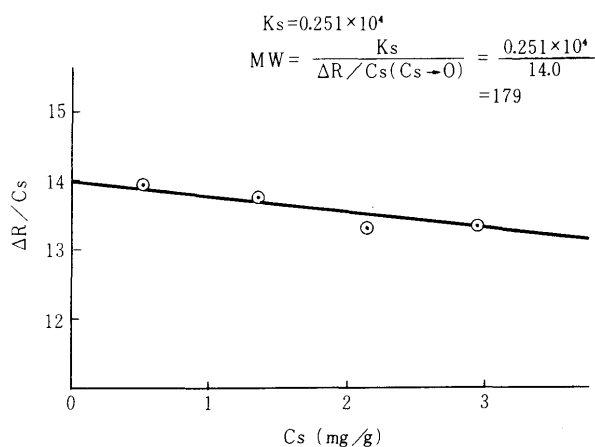


図8 生理的食塩水によるブドウ糖の測定例

(7) 溶媒の検討例

安息香酸をベンゼンとアセトンの溶媒で測定した例を図9に示す。これらから安息香酸はベンゼン溶液中では2分子会合、アセトン溶液中では単分子であることがわかる。このように物質に対する溶媒の性質を検討する一手段として使用することが可能である。

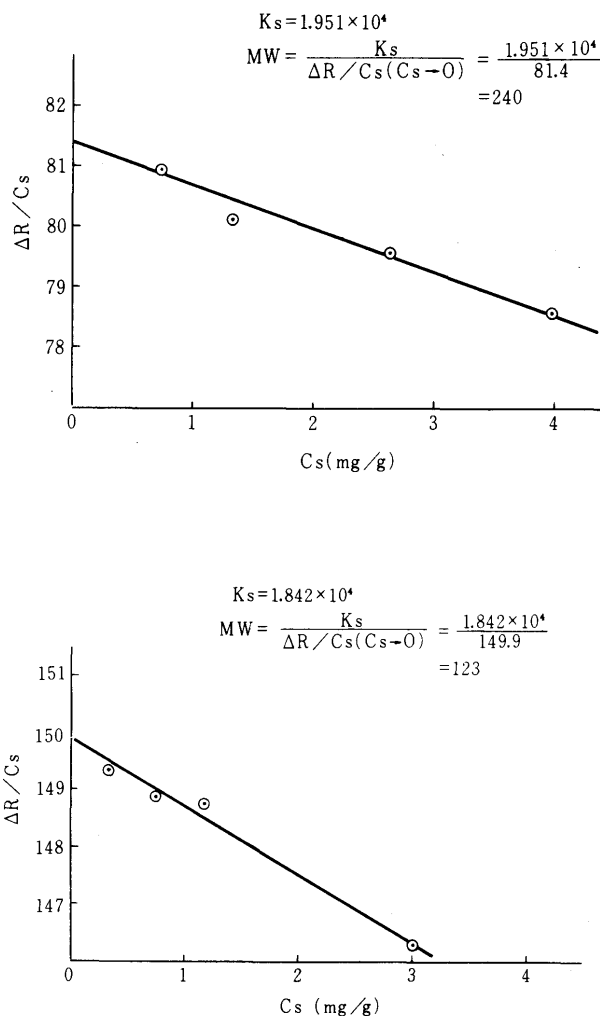


図9 安息香酸に対するベンゼンとアセトンの性質の検討例

(8) 金属キレート化合物の溶液中の分子量測定例

トルエンを溶媒として、金属アセチルアセトネートを測定した例を図10に示す。従来この種のサンプルは、溶液中では測定されたことはなかったが、本器を使用することにより精度よく測定することができた。

$$K_s = 1.248 \times 10^4$$

$$\text{Al}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_3$$

$$\text{MW} = \frac{K_s}{\Delta R / C_s (C_s \rightarrow 0)}$$

$$= \frac{1.248 \times 10^4}{38.1} = 327$$

$$\text{Be}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_2$$

$$\text{MW} = \frac{K_s}{\Delta R / C_s (C_s \rightarrow 0)}$$

$$= \frac{1.248 \times 10^4}{60.0} = 208$$

$$\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_3$$

$$\text{MW} = \frac{K_s}{\Delta R / C_s (C_s \rightarrow 0)}$$

$$= \frac{1.248 \times 10^4}{35.9} = 348$$

$$\text{Co}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_3$$

$$\text{MW} = \frac{K_s}{\Delta R / C_s (C_s \rightarrow 0)}$$

$$= \frac{1.248 \times 10^4}{34.9} = 358$$

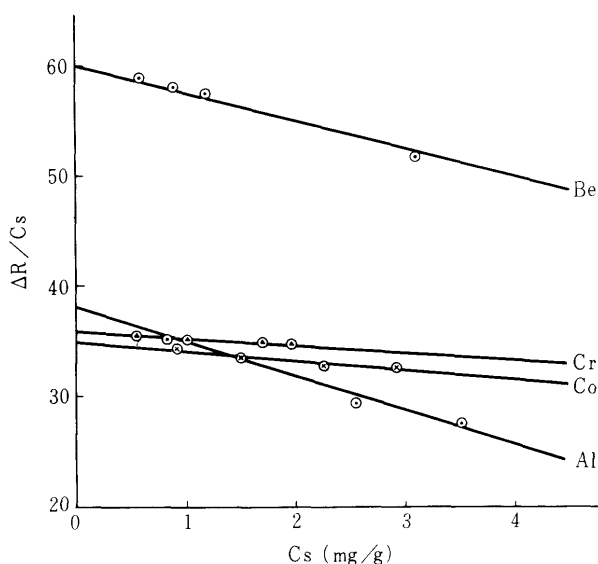


図10 トルエン溶液中における金属キレート化合物の測定例

3 まとめ

本器は他の測定法に比較して純溶媒に限らず、混合溶媒、緩衝溶液などを溶媒として、精度よく測定することが可能である。

また、重合数、解離度、溶媒の熱力学などの測定にも応用できるものと考ええる。

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 11 No. 4

昭和43年7月20日印刷

昭和43年8月1日発行

非売品

年6回毎偶数月発行

編集人 藤 森 慶

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