

超高压電子顕微鏡の分解能について

白石香澄*

超高压電子顕微鏡の理論分解能は近似的に λ^2 (λ : 電子線の波長) に比例する。従って加速電圧が1,000kV ($\lambda = 8.7 \times 10^{-3} \text{ \AA}$) では加速電圧100kV ($\lambda = 37 \times 10^{-3} \text{ \AA}$) の分解能を $\frac{1}{16}$ 程度向上させうる筈である。しかし実用的には加速電圧の安定度等技術的に難しい問題が多く従来の装置については、透過能は向上するが分解能は商用の100kV電子顕微鏡に比し劣るというのが一般的な見方であった。その後加速電圧の安定度結像レンズ系の収差鏡体の操作性についての改善がすすみ現在の装置の性能は撮影例1に示す如く高性能100kV電子顕微鏡のそれと同等となっている。3.81Åの直交格子縞を撮影する場合対



図1 MoO₃ 結晶格子像(110)面の撮影例 d=3.81Å

物レンズの非点収差、試料微動機構の流れ等を極小としなければならないことは勿論であるが電源変動にもとずく色収差にも厳しい制限がある。その必要条件を算出してみると次のようになる。

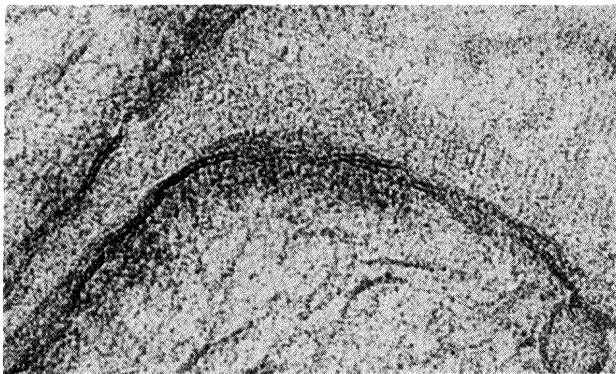


図2 鳥の平滑筋の撮影例 加速電圧: 750kV

今簡単のために色収差の原因がすべて加速電圧の変動によるものとする許容される電圧変動は

$$\frac{\Delta E}{E} \leq \frac{d^2}{4Cc \cdot \lambda} \text{ となり,}$$

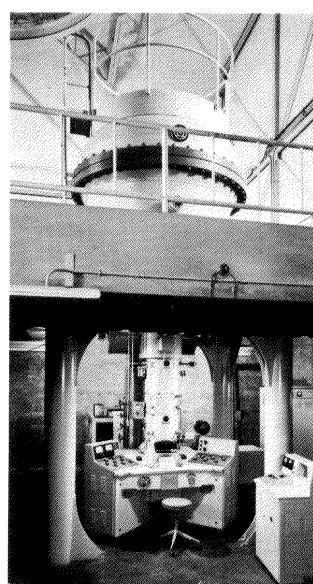
$$d=3.81 \text{ \AA}, Cc=5\text{mm},$$

$$\lambda=8.7 \times 10^{-3} \text{ \AA} \text{ を代入する}$$

$$\text{と} \frac{\Delta E}{E} \leq 8 \times 10^{-6} \text{ になる。}$$

このようにすべての性能仕様が標準の高性能電子顕微鏡と同等となったので加速電圧の増加にともなって向上する透過能、制限視野回折の精度試料損傷、色収差等の超高压電子顕微鏡の利点を利用した、新しい研究が各方面で進められている。

撮影例2は生物関係との応用の一例で生物関係で常用されている75kVの場合より容易に鮮明な像が得られるようである。これは色収差の減少という利点が寄与しているものと思われる。



日立超高压電子顕微鏡

目次

- 超高压電子顕微鏡の分解能について…………白石香澄…………1
- 日立ガスクロマトグラフ直結質量分析計を用いた
高級脂肪酸エステル分析…………平原義治…………2
- FIS-3形日立遠赤外分光光度計によるヨウ素と
ピリジン系化合物の分子化合物の測定
…………亘 文雄, 曾田高陽…………4
- MPF-2A形日立分光けい光光度計の分光感度
…………国分 決…………6
- RSP-2形日立ラピッドスキャン分光光度計による
乳酸酸素添加酵素のL-乳酸による還元過程の観察
…………武森重樹…………7
- 液体クロマトグラフィによる核酸関連物質の、迅速分析
清水照夫, 宇田文昭, 松宮弘幸, 宮内圭治, 鷹野重威…………8
- 昇圧ガスクロマトグラフィ…有川喜次郎, 秋森伯美…………12

日立ガスクロマトグラフ直結質量分析計を用いた高級脂肪酸エステルの分析

平 原 義 治*

緒言

脂肪酸のガスクロマトグラフィーは、その発生の当初から行なわれ現在では広く生化学方面や油脂化学方面で行なわれている。

今回ガスクロマトグラフ直結質量分析計（以下GC-MSと略す）を用いて市販試薬品のうち数種の脂肪酸エステルについて、不純物の同定も兼ねた測定を行なったので、その結果の概略について述べる。

装置及び測定条件

実験に使用した装置は日立K-53形ガスクロマトグラフと、日立RMU-6形質量分析計を、キャリアガス除去器として、Watson Biemann type *1のヘリウムセパレーターによって直結したGC-MS *2を使用した。

今回の測定に供した試料は下記の通りである。

表1 試料として用いた脂肪酸エステル

試 料	示 性 式	分子量
カプリル酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	158
カプリン酸エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	200
ラウリン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	214
ミリスチン酸エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	256
ステアリン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	298
オレイン酸エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$	310
リノール酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$	294
リノレン酸メチル	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOCH}_3$	292

表2 GC-MS測定条件

ガスクロマトグラフ条件	質量分析計条件
カラム Gelay 0.5φ45m	イオン加速電圧M/e600 1.8kV
液相 Butanediol Succinate Polymer	イオン化電圧 70eV
温度 150°~200°C 2.5°C/min	電子電流 60μA
キャリアー He 0.8kg/cm ²	イオン源温度 200°C
スプリット比 1/3	
連結部温度 220°C	
キャリアーガス除去器 220°C	
試料量 1μl	

測定条件

測定条件としては、表2に示す条件のもとで行なった。

ほぼ純品として用いられている市販試薬9種のそれぞれを混合して得られた分離溶出成分は、図1に示すように17種以上の分離ピークが出現した。この事から新たに含まれる不純物をも含めそれぞれについて知見を求めて

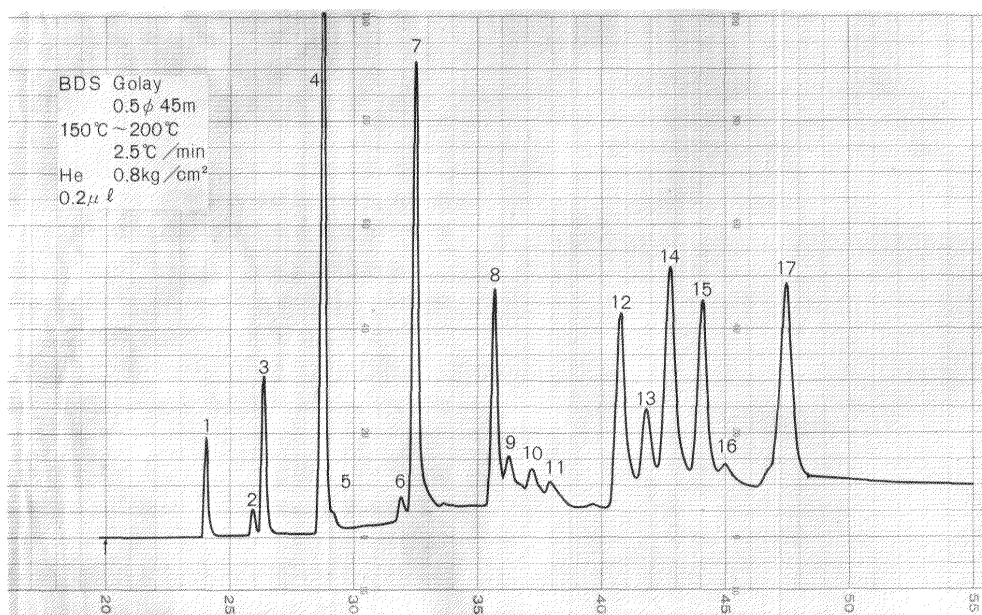
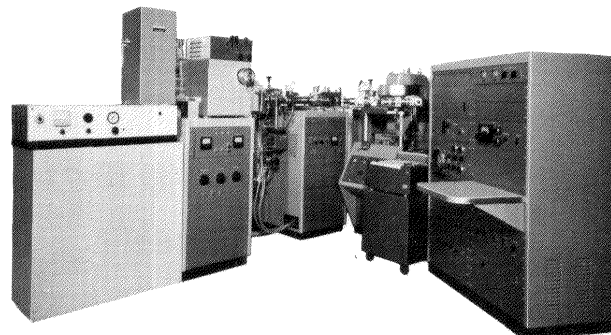


図1 GC-MSの全イオンモニタにより得られたクロマトグラム



K-53・RMU-6 日立ガスクロマトグラフ直結質量分析計

各溶出成分のマススペクトル

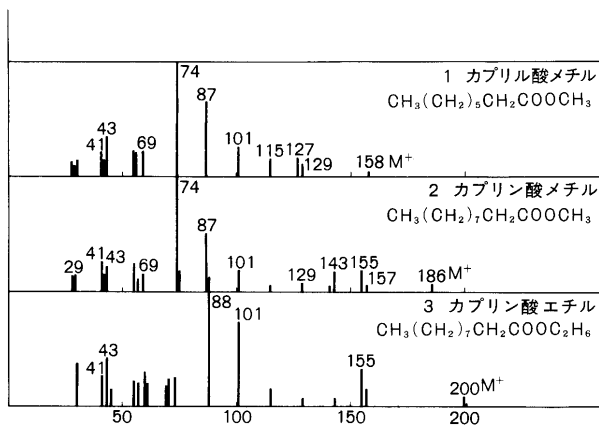


図 2

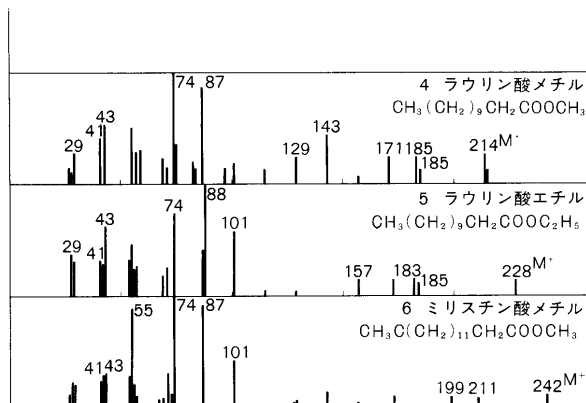


図 3

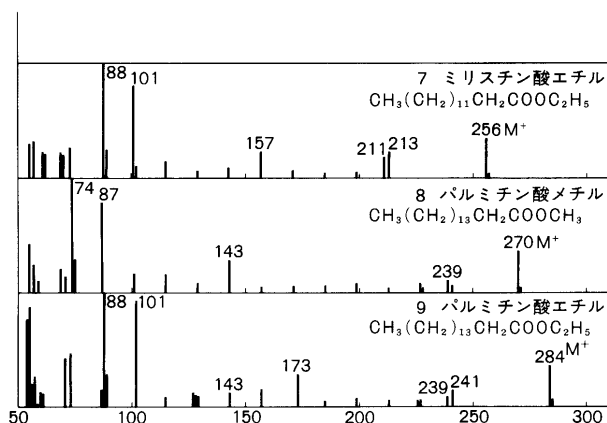


図 4

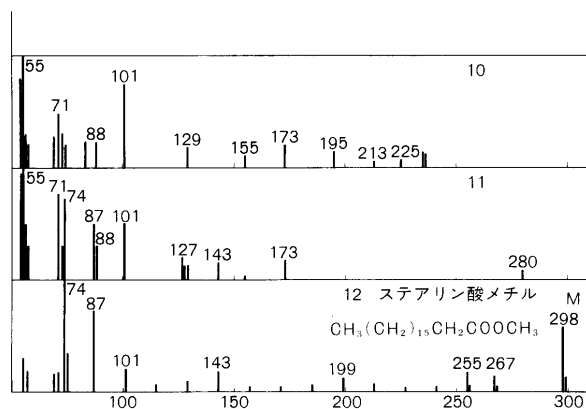


図 5

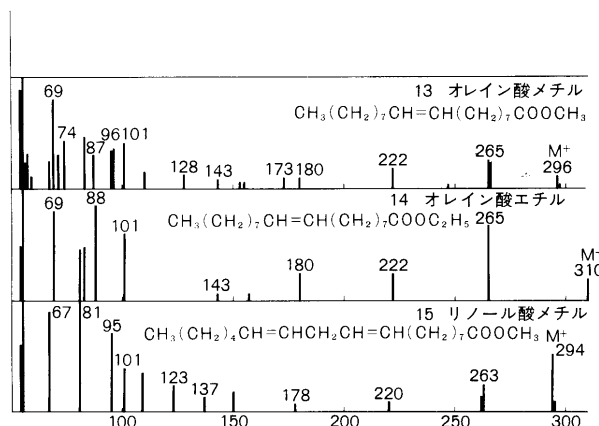


図 6

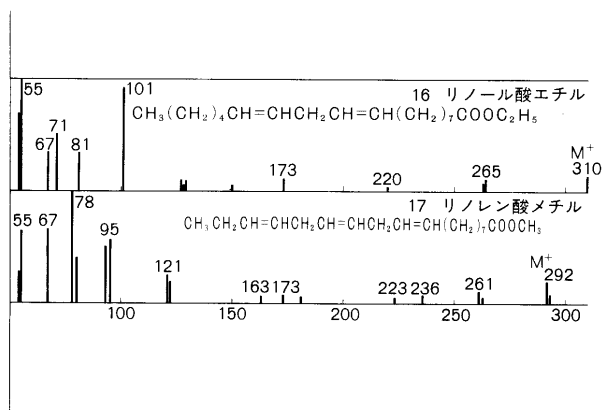
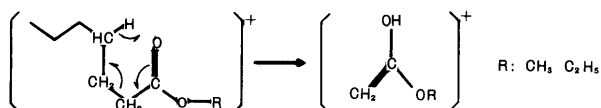


図 7

みた。

又、ガスクロマトグラフによる同一試料の、FID検知器とGC-MSにおける全イオンモニター検知器とのクロマトグラムの間には、極端な分離度、および保持時間の差はみられなかった。次に各分離ピークについての質量スペクトルを得た。それらについては、図2-7の如くフラグメンテーションを得る事ができた。これらのフラグメンテーションから直鎖脂肪酸エステルの開裂機構を考えた場合、単にアルキル炭素間が切れるほかに下記の六員環状遷移状態を経る開裂も認められた。



従ってメチルエステルの場合M/e 74に、エチルエステルの場合M/e 88に強いピークが現われる。又、メチルエステルはM-29, M-31, エチルエステルはM-43, M-45の各ピークが出現する事から末端基同定は容易である。

不飽和脂肪酸エステルの場合は、不飽和結合の影響によるM/e 67, 69, 81等が強く現われている。

脂肪酸エステル類は、炭素C₇~C₈程度のものからM⁺イオンが出現し分子量が大きくなるにつれてその強度は強くなる傾向がある。又、分離溶出成分のうち、10及び11については、その質量スペクトルからは、脂肪酸エステルではなく、はっきりした知見を得るに至らなかった。

以上のようにGC-MSにて得られた結果の解析については、GCからの分離成分のそれぞれの保持時間を考慮し、その質量スペクトルについては、試料の純品から

得た標準スペクトルのほか、その化合物特有の開裂様式をもとに、結果を求める事ができた。

各成分ピークの組成は表3に示す通りである

表3 GC-MSにより同定された各成分組成

ピークNo.	成 分 名	示 性 式	分子量
1	カプリル酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	158
2	カプリン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	186
3	" エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	200
4	ラウリン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	214
5	" エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	228
6	ミリスチン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	242
7	" エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	256
8	パルミチン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	270
9	" エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	284
10	?		
11	?		
12	ステアリン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	
13	オレイン酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$	298
14	" エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$	296
15	リノール酸メチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$	310
16	" エチル	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$	294
17	リノレン酸メチル	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$	292

結語

以上GC-MSによって市販の脂肪酸エステルの同定を行なったが得られたクロマトグラムから、不純物として含まれる微弱な成分についても、その質量スペクトルを容易に得る事ができた。

又、これから一連の脂肪酸の如き化合物については、

質量スペクトルのうち、特定のピークのみ注目し、それらの開裂様式をもとに解析へ結びつけられる事もわかった。

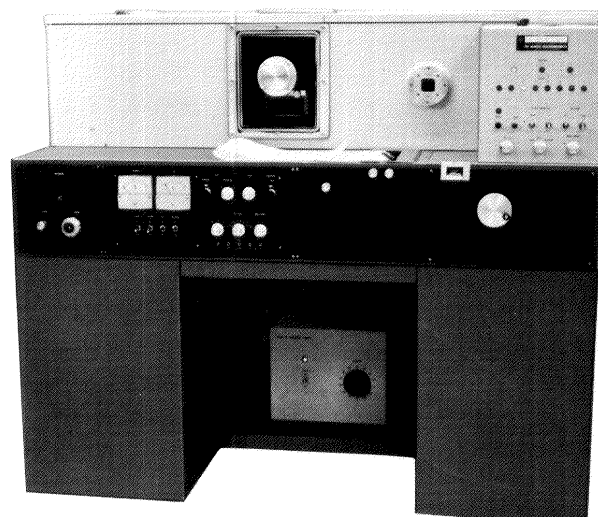
種々御指導を頂いた 東大医学部 山川教授 植田先生に厚くお礼申し上げます。

FIS-3形日立遠赤外分光光度計によるヨウ素とピリジン系化合物の分子化合物の測定

亘 文 雄* 会 田 高 陽*

ヨウ素が π 電子又は不対電子を持った種々の化合物と分子化合物を作るということはよく知られて居り、この分子化合物は理論的には π 電子又は不対電子がヨウ素の反結合 σ 軌道へ遷移した状態と、このような電子の遷移のない状態との共鳴によって安定化していると考えられている。

ヨウ素分子はhomonuclearな二原子分子であるため、その振動は赤外不活性で、赤外線吸収スペクトルとしては観測出来ないが、ラマンには活性で、クロロホルム溶液中で 207cm^{-1} にラマン線が観測されている¹⁾。分子化合物中のヨウ素の振動は分子化合物全体を考えれば、赤外にもラマンにも活性でなければならない。そして π 電子又は不対電子のヨウ素の反結合 σ 軌道への遷移はヨウ素分子の結合を弱めることにより、分子化合物中のヨウ素の振動は自由なヨウ素分子に比較して低波数側に shift することが当然予想される。その上、そのshiftの大きさ



FIS-3形 日立遠赤外分光光度計

は反結合 σ 軌道への π 電子又は不対電子の遷移の多少を示す尺度となると考えることが出来る。

これらの予想はヨウ素分子の結合距離を測定することによって確かめられたが、レーザーラマン分光器或は遠赤外分光器による振動スペクトルの測定によっても確かめられつゝある。しかし液体の遠赤外吸収スペクトルの測定には実験的に幾分むずかしい点があるため、指紋領域とは異なって、ラマンスペクトルによるデータの方が多いように思われる。こゝではポリエチレンマトリックス法によるヨウ素とピリジン誘導体の分子化合物の遠赤外吸収スペクトルについて述べることにする。

ポリエチレンマトリックス法は液体試料の遠赤外吸収スペクトルを測定するのに用いられる方法であるが、この場合分子化合物を予め作ってからサンプリングするのではなく、ポリエチレン中で分子化合物生成の反応を行なわせようというわけである。まず径20mmのガラスアンプル中に試料のピリジン化合物と40×20×1.5 mmのポリエチレン板を入れ、70～80℃の温水中に約1時間入れて試料をポリエチレン中に浸み込ませる。次いでアンプルを切ってポリエチレン板を取り出し、ヨウ素の四塩化炭素溶液中に浸してヨウ素をポリエチレン中に浸み込ませ、ピリジン化合物と反応させる。このような反応であるためポリエチレン中には、どちらか一方の試料が過剰になることは避けられない。ヨウ素を先に浸み込ませ、後からピリジン化合物を浸み込ませて反応させるという逆の順序でも同じであるが、ピリジン化合物は仲々ポリエチレン中に入り難いので上記の順序にした。測定は日立遠赤外分光光度計FIS-3形を用いて行なったが、ポリエチレンマトリックスから試料が少しは逃げ出すので、分光器と真空ポンプの間に液体空気のトラップを付けた方がい

い。

このようにして測定したスペクトルを図に示す。図1は単にポリエチレン板をヨウ素の四塩化炭素溶液中に漬けて測定したもので、300 cm^{-1} 附近に弱い吸収が見られる他に吸収はない。図2は β -ピコリンとそのヨウ素の分子化合物の吸収スペクトルで、破線で示したものが β -ピコリンそのもの、実線が分子化合物のものである。分子化合物のスペクトルには300 cm^{-1} 、180 cm^{-1} 、140 cm^{-1} 、90 cm^{-1} 附近に新しい吸収が現われることがわかる。300 cm^{-1} 附近の吸収はヨウ素の四塩化炭素溶液中に浸したポリエチレンについても同様に測定されていることから、四塩化炭素による吸収であることがわかる。残りの三つの吸収はヨウ素のスペクトルにも、 β -ピコリンのスペクトルにも観測されていないので、分子化合物を作ることに依って現われた吸収ということになる。その内で一番高波数側にある180 cm^{-1} 附近の吸収はヨウ素のI—I伸縮振動によるもので、ヨウ素が分子化合物を作ることによって、赤外活性になると共に、低波数側にshiftして現われたものである。この吸収の波数を纏めると次の表のようになる。

表1 ヨウ素及びそのピリジン分子化合物のI—I伸縮振動

	I—I振動(cm^{-1})	溶媒
I_2	214 ²⁾	気体
	207 ¹⁾	クロロホルム
	205 ³⁾	ベンゼン
	201 ¹⁾	ベンゼン
$\text{C}_5\text{H}_5\text{N} \cdot \text{I}_2$	167 ^{1,3,4,5)}	ピリジン
	171 ^{4,5)}	ベンゼン
	180 ^{4,5)}	n-ヘプタン
	183 ⁶⁾	ピリジン

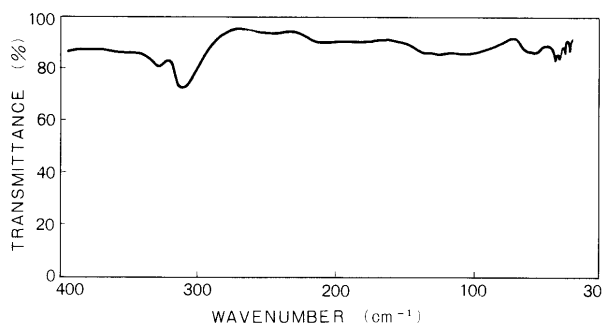


図1 ポリエチレンマトリックス法によるヨウ素遠赤外吸収スペクトル

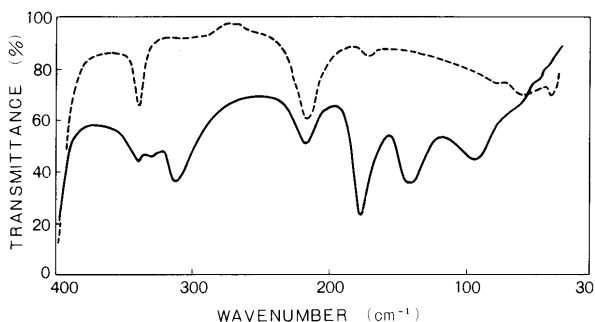


図2 ポリエチレンマトリックス法による β -ピコリン(---)とヨウ素- β -ピコリン分子化合物(—)の遠赤外吸収スペクトル

表1はヨウ素とそのピリジンの分子化合物のI—I伸縮振動についてのこれまでに報告されたデータである。I—I振動は気体では214 cm^{-1} であるが、クロロホルム中で207 cm^{-1} 、ベンゼン中では205 cm^{-1} にShiftする。ピリジンとの分子化合物では更に低波数にShiftする。ピリジンとの分子化合物でも溶媒が異なると大きい差が出て来るので、分子化合物ばかりでなく、その他の一般の分子間相互作用を持った系のデータを比較する時、その測定条件に注意する必要がある。表2はポリエチレンマトリックス法

表2 ヨウ素とピリジン誘導体の分子化合物のI—I伸縮振動

	I—I振動(cm^{-1})	pKa ⁸⁾
ピリジン	182 183 ⁶⁾	5.2
α -ピコリン	178 182 ⁶⁾	5.96
β -ピコリン	177 181 ⁶⁾	5.6
γ -ピコリン	181 ⁶⁾ , 169 ⁷⁾ , 162 ⁷⁾	6.0
2, 3-エールチジン	177	6.57
2, 4-エールチジン	175 180 ⁶⁾	6.63
2, 5-エールチジン	176	6.40
2, 6-エールチジン	176 183 ⁶⁾	6.7
3, 5-エールチジン	173	6.23
2-クロロピリジン	192 194 ⁶⁾	0.72
3-クロロピリジン	185 188.5 ⁶⁾	2.82
2-ブロムピリジン	192 193.5 ⁶⁾	0.71
3-ブロムピリジン	185 188.5 ⁶⁾	2.84
4-ミノピリジン	174	

で測定したビリジン誘導体とヨウ素の分子化合物のI—I伸縮振動で、LakeとThompson及びHaqueとWoodが溶液中で測定した振動数も同時に示した。メチル誘導体ではその差は余り大きくはないが、ビリジンより更に低波数側にshiftしているがハロゲン誘導体ではビリジンよりshiftは小さい。表2にはpkaの値も示したが、塩基性が増せばI—I振動はより低波数側にshiftする傾向を示す。

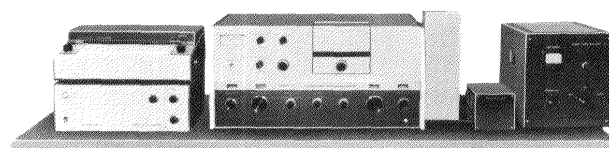
何分にもこの種のデータは少なく、今後の研究を待たねばならないが、遠赤外分光器の普及によって分子化合物をも含めて分子間相互作用に関する知識が積み重ねられていくものと思う。

- (1) H. Stammreich, R. Forneris and Y. Tavares, *Spectrochim. Acta.* **17**, 1173 (1961).
- (2) G. Herzberg, "Molecular Spectra and Molecular Structure", Vol. 1, Van Nostrand (1967).
- (3) P. Klaboe, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3667 (1967).
- (4) I. Haque and J. L. Wood, *Spectrochim. Acta*, **23A**, 959 (1967).
- (5) S. G. W. Ginn and J. L. Wood, *Trans. Faraday Soc.*, **62**, 777 (1966).
- (6) R. F. Lake and H. W. Thompson, *Proc. Roy. Soc.*, **297**, 440 (1967).
- (7) K. Schofield, "Hetero-Aromatic Nitrogen Compounds, Pyrroles and Pyridines", Butterworths (1967).

MPF-2A形 日立分光けい光光度計の分光感度

国 分 決*

分光けい光光度計を用いてけい光スペクトルを測定しても、そのまゝでは正しいけい光スペクトルは得られない。モノクロメーターの透過率、光電子増倍管の感度は波長依存性を示すからである。このような因子を補正する方法はいくつかあるが¹⁾標準けい光溶液²⁾を使用するのが最も簡単なようである。この方法自体についてはすでにEPU形のプリズムモノクロメーターを使用したけい光光度計に適用した例で解説してある³⁾から、ここではMPF-2A形について得られた結果だけを述べる。使用した光電子増倍管は浜松テレビのR-106である。図1



MPF-2A形 日立分光けい光光度計

が得られた結果である。この補正係数を用いると単位波数あたりの相対的な光量子数であらわされるスペクトルが得られる。

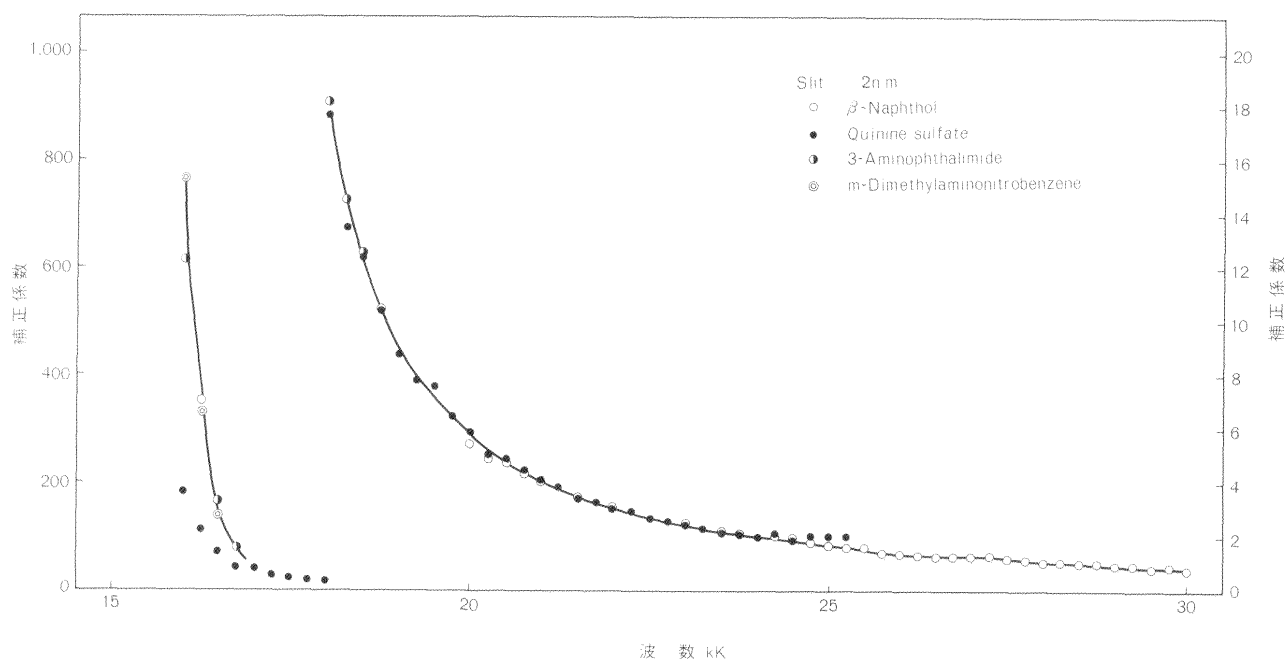


図1 MPF-2A形 日立分光けい光光度計の補正係数

* 東北大学理学部

低波数になるにつれ徐々に補正係数は増大する。これはモノクロメーターの透過率がブレイズ波長を境にして減少すること、光電子増倍管の感度が漸次低下すること、一定有効波長幅で測定するため低波数になるにつれ波数幅が減少することなどに起因している。18 kK 付近からの補正係数の急激な増大は主として光電子増倍管の感度の低下による。低波数側の補正可能な領域は光電子増倍

管としてR-136を使用すればかなり広げられる。S-20の分光感度特性をもつものを使用すればさらに良い。

Table 1 にここで用いた標準溶液の見かけのけい光極大と正しいけい光極大の位置をあげる。なお参考のためにモノクロメーターとしてEPU形を用いた場合のデータも記載しておく。なお図1の結果は有効波長幅2nmの場合であってスリットを開いたときには若干変ってくる。

表 1

けい光物質	正しい極大(kK)	見かけの極大(kK)	
		M P F	E P U
β -Naphthol	24.0, 28.25	24.5, 28.3	24.0, 28.3
Quinine sulfate	21.5	22.2	21.5
3-Aminophthalimide	19.5	20.3	19.9
m-Dimethylaminonitrobenzene	18.5	19.4	19.3

特に低波数側では注意する必要がある。

このようにスペクトル形や位置の詳しい議論を行うときには補正を必ず行なわなければならない。溶媒効果によるけい光帯の移動などの問題に生のデータを使うことは避けるべきである。モノクロメーターの透過率、光電子増倍管の分光感度特性などは一つ一つ違うので個々の装置について独立に補正係数を求めねばならない。こゝで用いた標準溶液はもともと前面励起、前面観測のけい光光度計に用いられたものでMPF-2Aによる通常の測定法である側面観測の場合には溶液の濃度を文献値の1/5以下にしてやるほうが測定し易い。結果はもちろん実験誤差の範囲内で一致する。

波数表示のスペクトルについての補正係数を求めたのは、けい光スペクトルの表示としてこれ以外のものは合理的ではないという理由による。いわゆる吸収、けい光スペクトルの鏡像関係は波長表示では大きくくずれてし

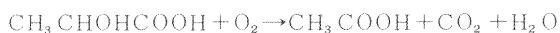
まう。波数表示にしておけば鏡像関係の確認のみならず、Stokes shiftの大きさ、半値幅の比較、振動構造の間隔など一目でわかる。これらのことは得られたスペクトルを解釈するのに重要な因子である。波数表示についての国際的な提案もなされている⁴¹

- 1) 国分 決, 「けい光スペクトル」, 実験化学講座(続) 11, P.61
- 2) E. Lippert et al., Z. Anal. Chem. **170**, 1 (1959)
- 3) 国分 決, 小林美佐子, 本誌(S.I. News Vol. 9. No. 6 P.10)
- 4) J. H. Chapman et al., Z. Anal. Chem., **197**, 431 (1963); Appl. Spectry. **17**, 171 (1963), 国分, 分析機器 **6**, 73 (1968) に紹介されている。

RSP-2形 日立ラピッドスキャン分光光度計による
乳酸酸素添加酵素のL-乳酸による還元過程の観察

武 森 重 樹*

*Mycobacterium phlei*より得られる乳酸酸素添加酵素はフラビンモノノクトレオチド (FMN) を補欠分子族とする一原子酸素添加酵素で好気条件下では次の反応を触媒する。



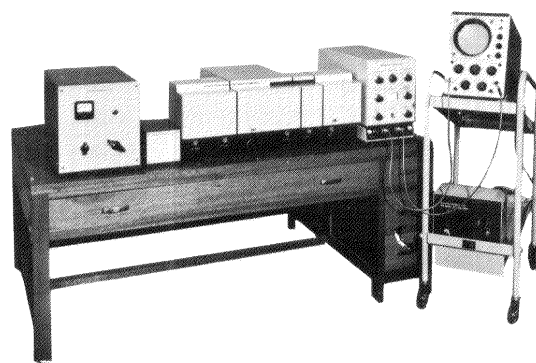
L—乳 酸 西乍 西尤

しかし無酸素状態では脱水素反応のみを触媒し生成物としてビルビン酸を生ずる。



L-乳酸 ビルビン酸

但し FMN: 酵素に結合したフラビン



RSP-2形 日立ラピッドスキャン分光光度計

* 金沢大学理学部

そこで日立RSP-2形ラピッドスキャン分光光度計を使用して乳酸によるフラビン部分の還元過程の変化を追跡した。実験に用いた乳酸酸素添加酵素は *Mycobacterium phlei* から抽出し再結晶を繰返して精製したものである。測定に際しては結晶酵素を0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶かして同じ緩衝液に対して透析し混在している硫酸アンモニウムを完全に除いた酵素溶液を用いた。

L-乳酸を添加後0.3, 1秒間においては、顕著なスペクトル変化は観察されないが、これは好気条件下で酸素添加反応がおこなわれている間は、フラビン部分は殆んど酸化形に近い状態で反応が進行しているためであり、酸素が消費されるとフラビン部分が徐々に還元形に移行することがわかる。更にその際550m μ 付近の長波長測において極めてわずかであるが吸収が酸化形より増大していることが観察される。

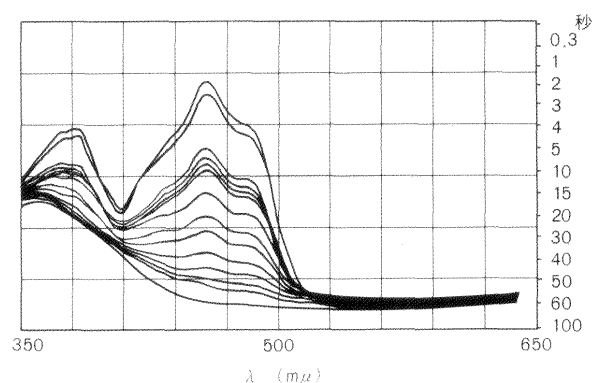


図1 乳酸酸素添加酵素のL-乳酸による還元過程の測定例
酵素176m μ moles. L-乳酸25 μ moles.
K-リン酸緩衝液 (pH7.0) 250 μ moles.
全容量3.5ml. 温度4℃
波長域: 350~650m μ , 吸光度: フルスケール1.0

液体クロマトグラフィによる核酸関連物質の迅速分析

清水 照夫* 宇田 文昭* 松宮 弘幸*

宮内 圭治** 鴈野 重威**

緒言

核酸関連物質の分析法としてイオン交換クロマトグラフィが広く用いられ、それぞれの目的に適合した方法が試みられてきたが、いずれも分析時間の長いことが欠点とされてきた。われわれは、034形日立液体クロマトグラフを用いて、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基の迅速分析を試みたので、その概要について報告する。

I. 迅速化の基本

A. 流速

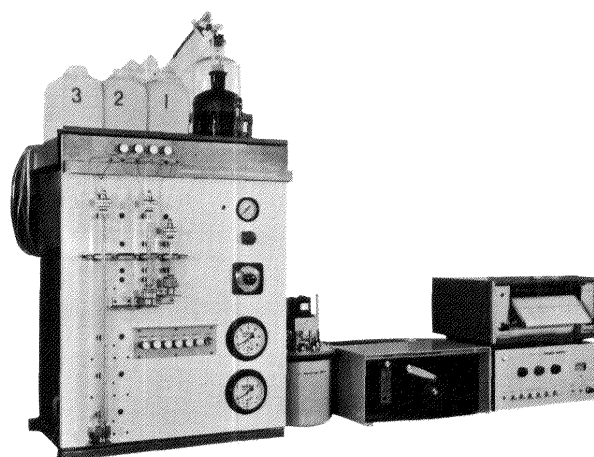
Hamiltonら¹⁾はカラム効率に及ぼす諸因子を検討した結果、612cm/hrの高流速でアミノ酸の迅速分析を、また Horvathら²⁾は薄皮樹脂をつめたキャピラリカラムを用い、溶離液を280気圧に加圧する方法でヌクレオチドの分析を迅速化した。一般には高流速で分離、溶出する迅速法が考えられる。われわれは400~2,440cm/hrの高流速で、迅速化を試みた。

B. グループ別分析

Andersonら³⁾はDowex 1 酢酸形のカラムで、リボヌクレオチド、リボヌクレオシド、および塩基の分離を行なったが、塩基とその塩基をもったヌクレオシドの分離がよくなかった。Hori⁴⁾は溶離液の濃度勾配を検討してこの点を改良した。しかしカラムサイズが大きく、分析に長時間を要する欠点は避けられない。そこで、われわれは単一カラムによらず、リボヌクレオチド、リボヌクレオシド、および塩基をそれぞれその性質によってグループ別に分離し、さらにそれらの相互分離を行なった。

C. 溶離条件

分析対象の成分数や組成に応じて、各種の塩や酸による濃度勾配溶出法が考案されてきたが、分離を目的とす



034形 日立液体クロマトグラフ

る場合には溶出液の処理などを考慮して、ギ酸系または酢酸系の溶離液が多く用いられる。しかしヌクレオチド三リン酸を含むような試料の分離には、ギ酸や酢酸系溶離液はそれ自体に紫外部の吸収をもっていて、ベースラインがドリフトするので好ましくない。従ってわれわれは塩酸-食塩系溶離液を用いることによってこの問題を解決することができた。濃度勾配は、6チェンバーのグラディエント装置で、表1に示したように、3または6チェンバー方式を用い、ヌクレオチドの分析には、Con-

cave形に水素イオン及び塩素イオン濃度をあげる方法をとった。

表1 グラディエントの条件

Gradient No.	Volume mℓ	Chamber No.						Pump*
		1	2	3	4	5	6	
G-4	50×3	B	B	E				H ₂ O
G-5	40×6	A	C	D	A	E	E	H ₂ O
G-6	10×6	C	C	B	E	E	E	B

A: 10⁻³ N HCl
 B: 1.0×10⁻² M NaCl in 10⁻³ N HCl
 C: 2.5×10⁻² M NaCl in 10⁻³ N HCl
 D: 5.0×10⁻² M NaCl in 10⁻³ N HCl
 E: 3.0×10⁻¹ M NaCl in 10⁻² N HCl

*: カラムを平衡化した条件

II. ヌクレオチドの迅速分析

A. 分析条件

樹脂はDowex 1×4 (AG 1×4, -400mesh)を用いた。×2では、溶離液の組成変化に伴う容積変化が大きく、また×8では高流速で分析するとテーリングをおこした。粒度の大きいものでもカラム温度を上げることによって、ピーク幅を小さくすることはできるが、-400メッシュを用いると20℃～30℃でもピーク幅が小さくなり、またそれはほとんど一定となった。このことは、常温付近ではカラム温度にあまり留意しなくともよいという利点を与える。

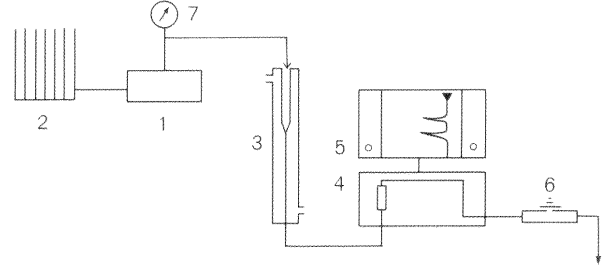
カラムは6φ×50mm, 2.5φ×250mm, 1φ×450mmの3種類のものを用い、溶出液をそのまま、流動光度計に送渡し、250, 260, 280mμの3波長で測定記録した。これら

の流路系流図を図1に示した。

溶離液は表1に示したような勾配溶出法を用いたが、流量はマイクロカラムによる分析の微量化を試みた場合のみ30mℓ/hrでそれ以外は120mℓ/hrを用いた。この流量で2.5φ×250mmカラムで分析した場合のカラムの圧力は20kg/cm²であった。

B. 分析結果

図2は6φ×50mmカラムを用い、表1の濃度勾配G-



- 1 Pump
- 2 Gradient device
- 3 Column
- 4 Detector (250, 260, 280mμ)
- 5 Recorder
- 6 Back pressure valve
- 7 Pressure gauge

図1 ヌクレオチド迅速分析のフローダイアグラム

4で分析した例で、また樹脂量をほとんど同じにして、2.5φ×270mmのカラムを用いて同じ条件で分析した例を図3に示した。これらから各成分の溶出のされかたには大差のないことが明らかとなった。

なお1φ×450mmのマイクロカラムを用い、濃度勾配G-6で30mℓ/hrの流量で、図3と同じ試料を用いて分析したところ、高感度のクロマトグラムを得ることができた。その分析例を図4に示したが、各成分のピーク巾が少しひろがるために、分析時間は少し長くなることは避けられなかった。

G-4およびG-5の濃度勾配溶出法を用いた場合の塩素イオン濃度、pH、と溶出液量と各成分の溶出位置を図5に示した。

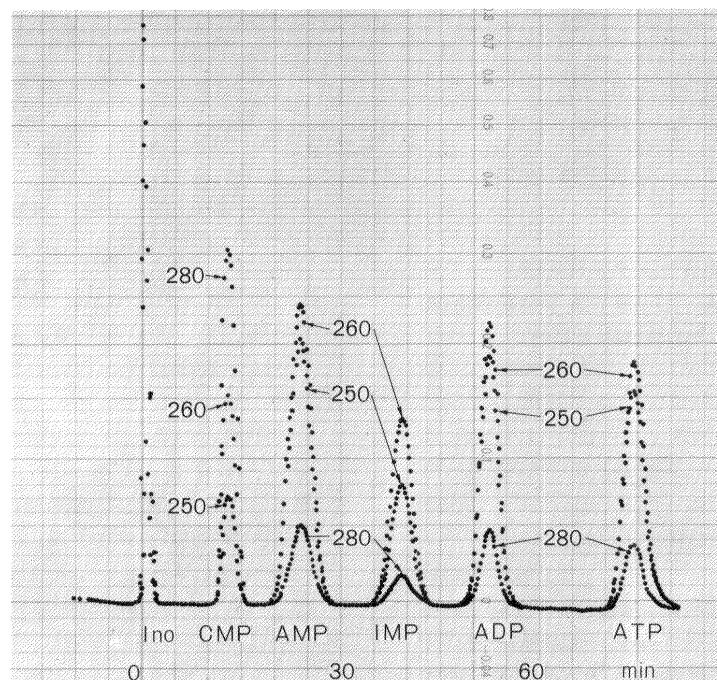


図2 ヌクレオチドのクロマトグラム-(1) AG1×4(Cl⁻)
 6×50mmカラム、G-4による勾配溶出法25℃、
 120 mℓ/hr、250, 260, 260, 280mμで測定

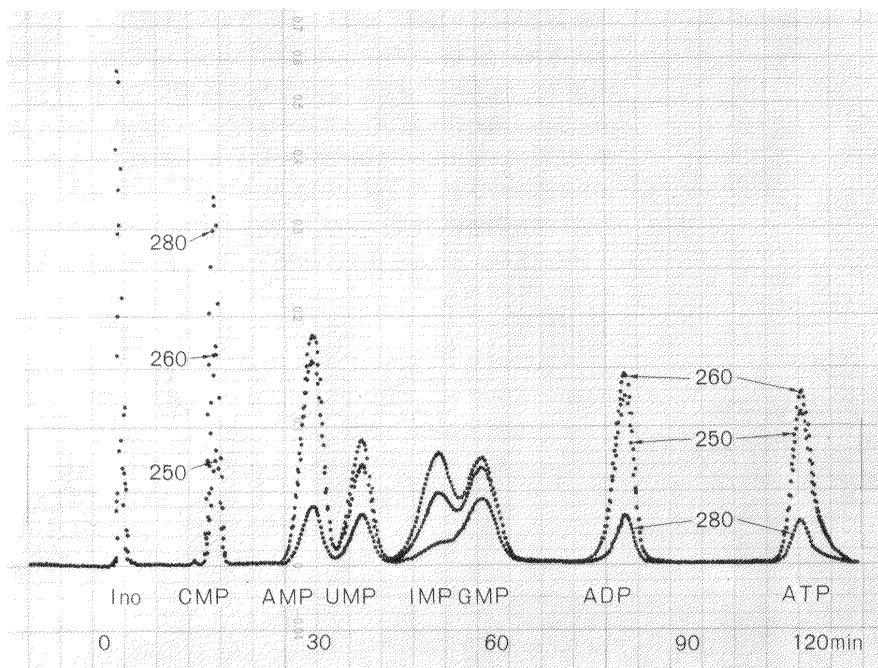


図3 ヌクレオチドのクロマトグラム(3)
2.5×270mmカラム、G-5による勾配溶出法
その他は図2と同じ

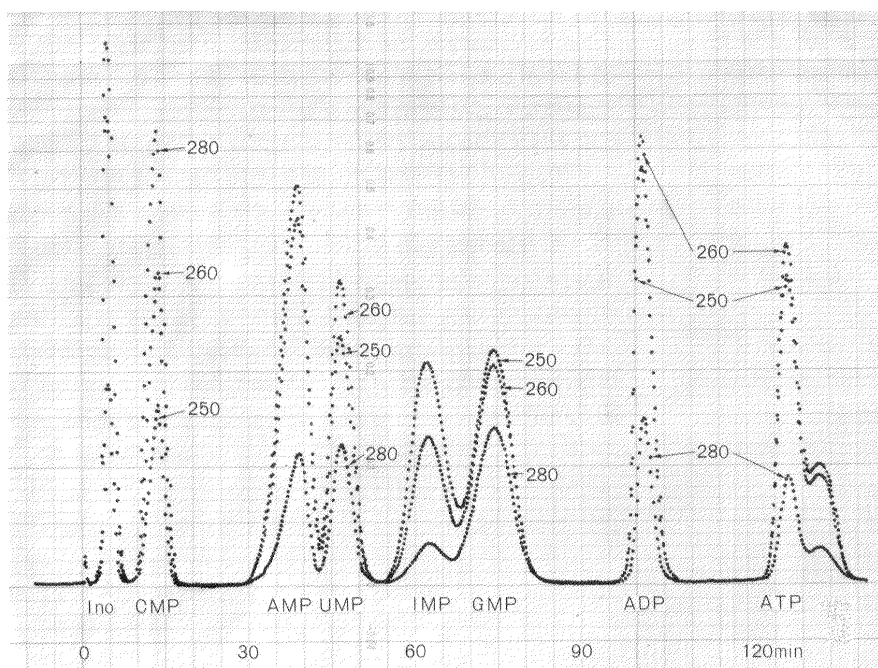


図4 ヌクレオチドのクロマトグラム(3)
1×450mmカラム、G-6による勾配溶出法、
40℃、30ml/hr、その他は図2と同じ

III. グループ分画

A. 分析条件

ヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基の混合物を単一カラムで分析するよりも、各グループに分画してから、それぞれのグループを更に相互分離を行えば、溶離液の制御も簡単である。

ヌクレオチドは酸性でアニオン交換樹脂に吸着されるが、ヌクレオシドと塩基は吸着されずにそのまま、溶出される。この溶出液をそのまま、試料として次の分析を行なうことができる。ホウ酸存在下でpH 9.5では、リボヌクレオシドはホウ酸と複合体をつくるので、ゲルろ過ク

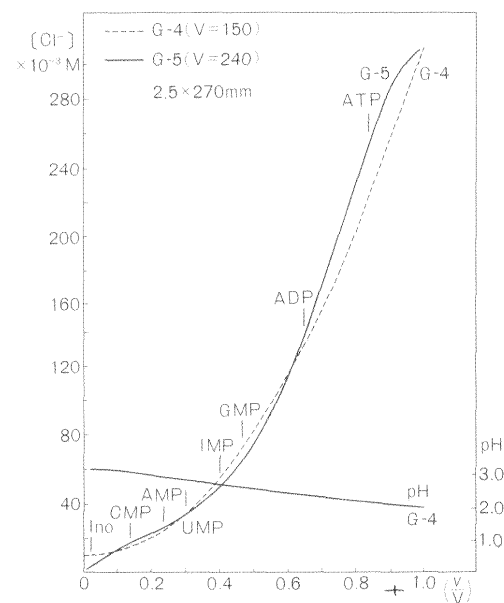


図5 グラディエント溶出法による塩素イオン濃度、pH、溶出液量とヌクレオチドの溶出位置

ロマトグラフィ (Bio-Gel P-2) で塩基と分け、ヌクレオシドはDowex1に吸着させ、酢酸ソーダの勾配溶出法で分析することができる。また塩基はゲルろ過剤と多少の吸着性をもっているので分離することができる⁽¹¹⁾。

注1. 溶出順序は、分子量の順ではないので、各成分のろ過剤との吸着の差によって分離するものと考えられる。

B. 分析操作

これらの方法によるフローダイアグラムを図6に示した。分析の初めは図のように連結して、試料をC₁カラムにつけゲルろ過クロマトグラフィーを行なう。リボヌクレオシドが溶出された後、C₂カラムを切りはなして溶出を続け、更に塩基の分析終了後連結をR-M-P-C₂-SとしてC₂カラムでヌクレオシドの分析を行なう。測定波長は250, 260, 295m μ を選んだが、ゲルろ過法による塩基の分析においてアデニンとグアニンは分離されないで溶出されるが、この際アデニンの吸収は295m μ ではほとんどないので、重なったピークの同定と確認に利用することができた。

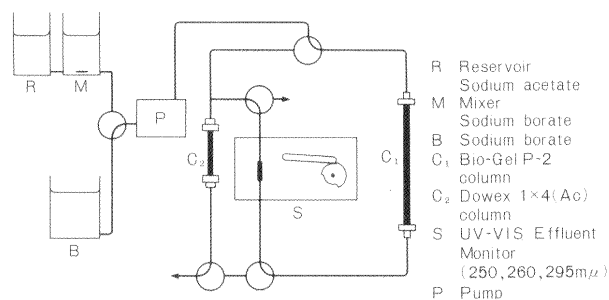


図6 グループ分画法のフローダイアグラム

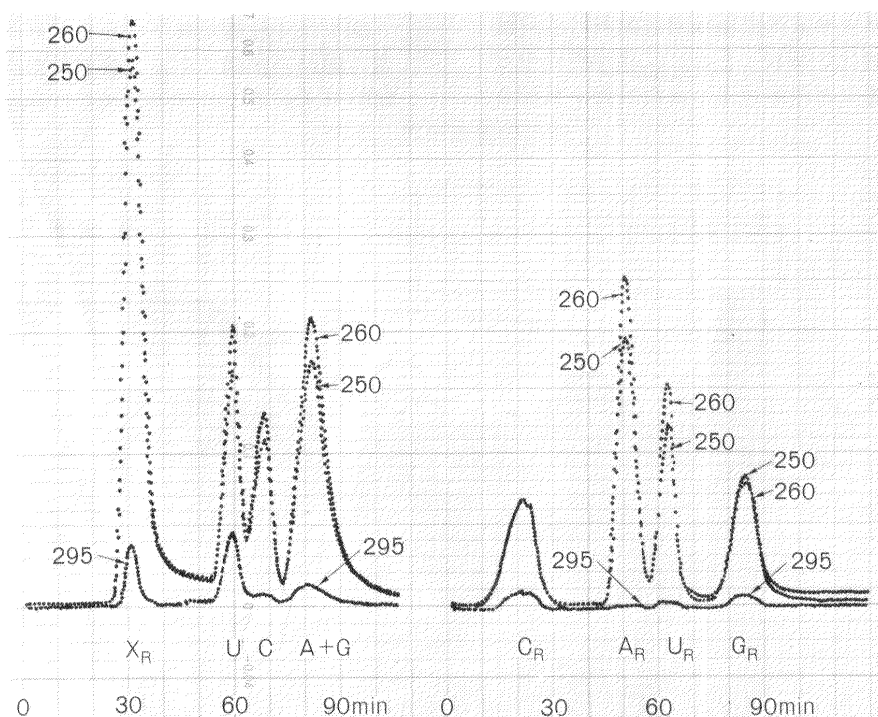


図7 ヌクレオシド、塩基のクロマトグラム

[A] Bio-Gel P-2, 9×500mmカラム, 30ml/hr,
250, 260, 295m μ で測定

[B] A G 1×4 (Ac) 2.5×150mm, 30ml/hr,
250, 260, 295m μ で測定

C. 分析結果

図7の左側がゲルろ過クロマトグラフィによる溶出液のクロマトグラムであり、最初のXrがヌクレオシドの混合物で、矢印の所でC₂カラムを切りはなしたが、続いて塩基が三つのピークになって溶出される。最後のピークにはアデニンとグアニンが重なって溶出されるが、吸光度の比や、295m μ の吸光度の記録から、これら両者の混合比を計算することができる。

図7の右側のクロマトグラムは、上にのべたXrの画分の分析である。これはDowex 1×4 酢酸形カラムによるイオン交換クロマトグラフィであるので、今後更に改良する余地はあるが、流速を変えることなく、約90分で分析を終了することができた。

IV. 総括

カラムおよびその組合せ、切換弁などを試作考案して、以上のべたような結果を得ることができた。また、この

ような方法に従えば、通常のRNA加水分解物についても、ヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基の分析を、5時間程度で分析することができると考えられる。しかし定量性や感度の点で、まだいくつか改良の余地はあるが、分析対象が限定されているような場合には、これらの方法を組み合わせて、また濃度勾配の制御によって、より簡便で、迅速な分析が可能となるであろう。

文献

- 1) P.B. Hamilton, *et al.*, *Anal. Chem.*, **32**, 1782, 1799 (1960)
- 2) C.G. Horvath, *et al.*, *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967)
- 3) N.G. Anderson, *et al.*, *Anal. Biochem.*, **6**, 153 (1963)
- 4) M. Hori, *Methods in Enzymology*, **12**, 381 (1967) Academic Press

昇圧ガスクロマトグラフィ

有 川 喜次郎* 秋 森 伯 美**

1. まえがき

分離カラム中における試料成分の保持時間の差を利用して分離するガスクロマトグラフ法では、原理的には連続分析は不可能であり沸点範囲の広い複雑な組成の試料では分析に長時間を要することになる。そのため、分析を迅速化する種々の方法が検討されてきた。たとえばシングルカラムを用いる等温(isothermal)、等圧(isobaric)法に対して昇温(programmed temperature)法、マルチカラム(multi-column)法あるいはバックフラッシュ(Back-flush)法などがある。特に一定の流速でカラム温度を連続的に上昇させる昇温法は沸点範囲の広い試料に対して分析を迅速化させるとともに、後溶出成分ピークの非対称性の改善など非常にすぐれた性能が実証さ

れ広く実用化されている。しかしカラム恒温槽の温度制御には複雑な装置を、また繰返し分析には昇温開始温度までの冷却と時間を必要とし、さらにベースラインドリフトが大きいなどの問題がある。

カラム入口圧を制御してキャリア・ガス流速をプログラミングする昇圧ガスクロマト法について検討し、Golay column に適用した結果、簡単な装置で昇温法と同様の効果が得られることが明らかとなったのでその特色と適用性について述べる。

2. 装置の説明

図1は3段階に昇圧できるフロープログラミング装置の流路系統図である。装置はキャリア・ガスボンベと試料導入装置との間に接続される。キャリア・ガスはソ

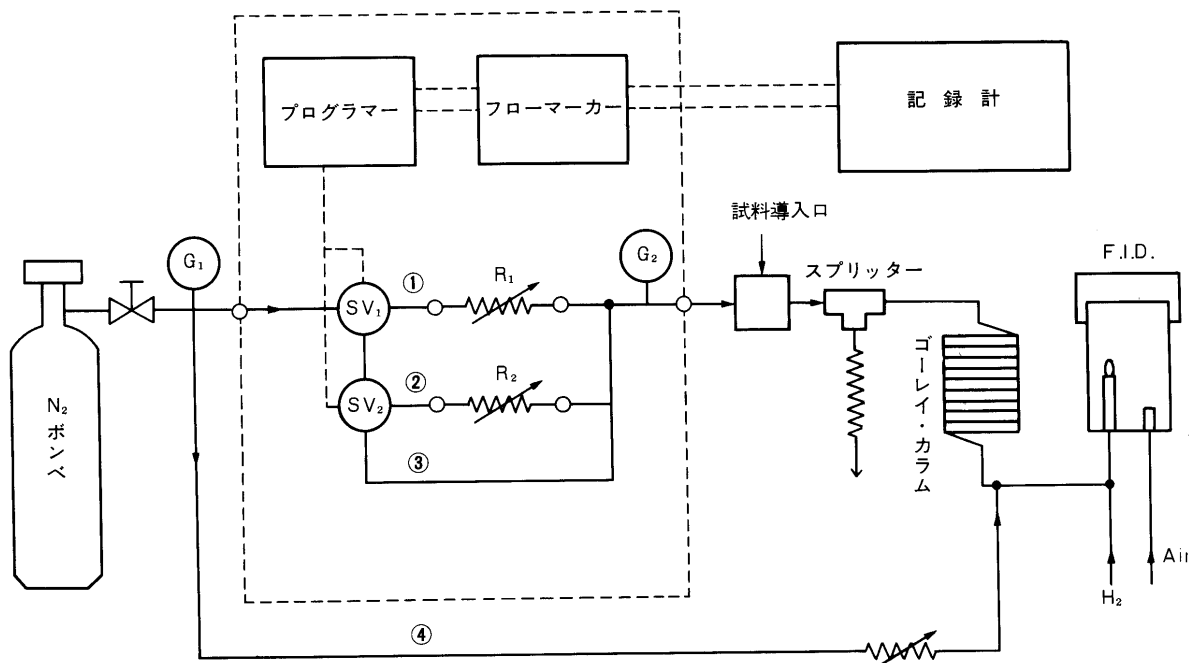


図1 昇圧装置の流路系統図

レノイドバルブSV₁、およびSV₂によって流路①、②および③に切換えられる。流路①および②にはキャリア・ガスに対する適当な抵抗(ニードルバルブを使用)R₁およびR₂が接続されており、流路の切換えによってカラム入口圧が変化することになる。二つのソレノイド・バルブの切換時間の設定には二つのタイマーを用いたが、各段の最大設定時間は30分である。最大設定圧力は5 kg/cm²であり、カラム入口圧の変化は圧力計G₂によって指示される。切換時間は切換えと同時にフロー・マーカによってチャート紙上に記録される(記録例図6を参照)ので、流速切換時間がこれによって正確に求めることができる。流路④はFIDの感度変化を小さくするための補助的なN₂流路で、ガスクロ本体に取付けられているreference側のニードル・バルブを使用する。

昇圧装置の外観および内部を示したものが、図2および3である。図4はK53形日立ガスクロマトグラフに

昇圧装置を取付けたもので、ビルディング・ブロックシステムの特長を発揮している。

3. 適用条件

カラム入口圧を制御して、一回の分析操作中に広範囲に流速を変化させる昇圧ガスクロマト法では、流速とカラム効率あるいは装置の耐圧性からカラム内の圧力降下などの点で、Golay column+FIDを使うことが条件となる。

3.1 流速とカラム効率

カラム効率を表わす理論段数(N)あるいはHETP(=L/N)と流速($\bar{u}$)との関係は、理論的にもよく検討されていることでありVan Deemterの式で示される。HETP~ $\bar{u}$ は双曲線関係にあり、最小のHETP(HETP_{min})を与える最適流速($\bar{u}_{opt}$)があることがわかる。 $\bar{u}_{opt}$ より大きい流速までを用いるフロー・プログラミング法では物質移動への抵抗によるカラム効率の低下が問題となる。

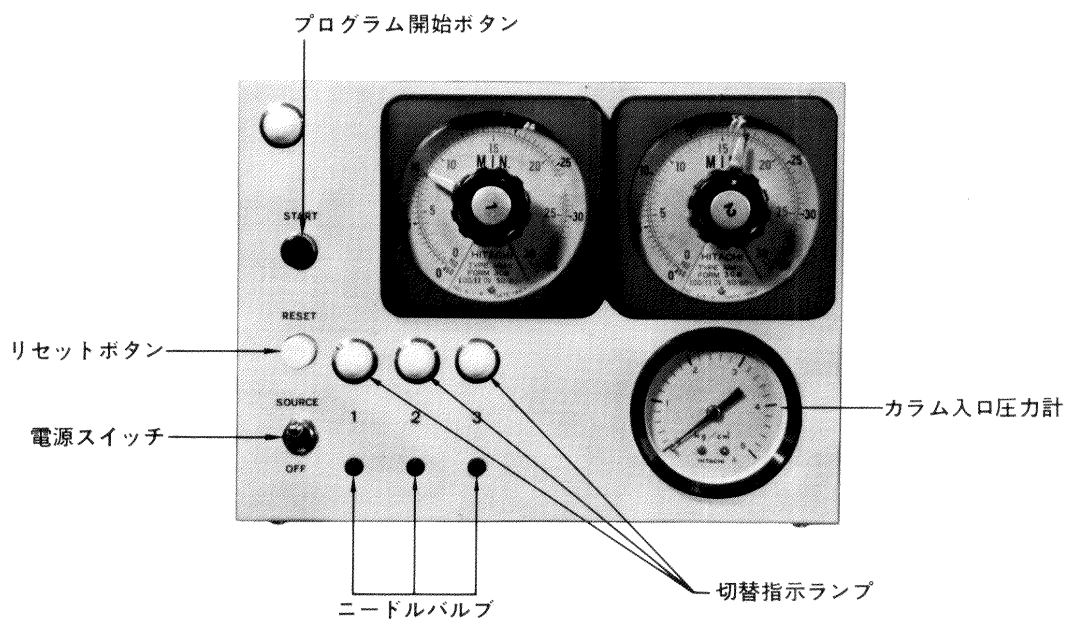


図2 昇圧装置の外観

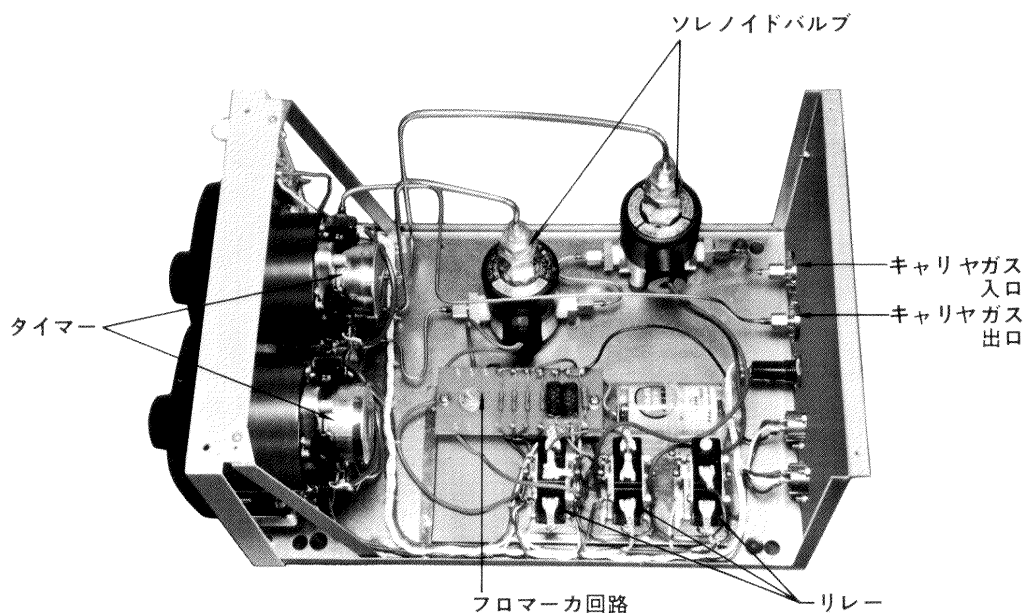


図3 昇圧装置の内部

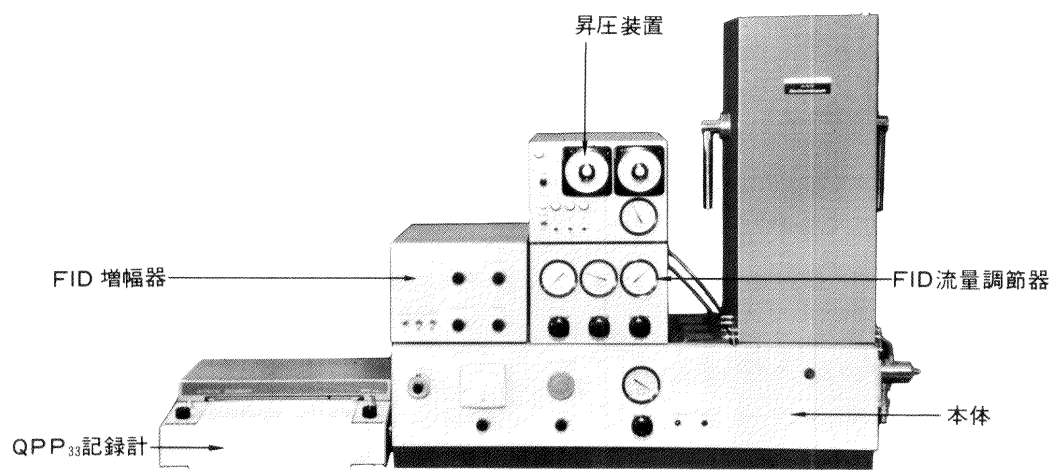


図4 昇圧装置を取付けたK23形日立ガスクロマトグラフ

したがって HETP $\sim\bar{u}$ の関係曲線が $\bar{u}_{opt}$ 以上の流速においてもフラットな特性をもったカラムが望ましく、Golay が適している。図5は液相の厚さ(df)がHETP $\sim\bar{u}$ 関係に対する影響を示したもので、dfが小さいほど特性はフラットとなりカラム効率の低下が小さい。Golay column の液相の厚さは1 μ 以下で、効率を低下させず

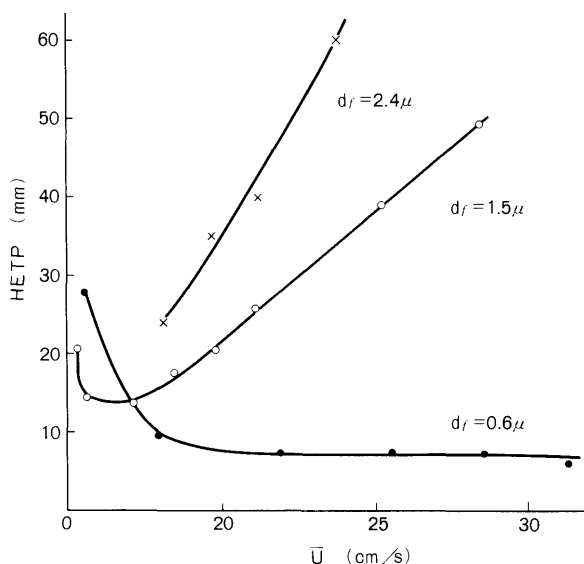


図5 HETP $\sim V$ に対するdfの影響

次式^{1), 2)} で与えられる。

$$\Delta P = \frac{\eta}{B_0} L \bar{u} \quad \dots\dots\dots (1)$$

η : キャリヤ・ガス粘度 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) ΔP : $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$
 B_0 は比透過率 (Specific Permeability, cm^2) で、充てんカラムについては次の Kozeny-Carman の式で示される。

$$B_0 = \left(\frac{dp^2}{180}\right) \left(\frac{\epsilon^3}{(1-\epsilon)^2}\right) = 2\eta \epsilon L \frac{P_0}{P_i^2 - P_0^2} \cdot u_0 \quad \dots\dots\dots (2)$$

dp : 担体の有効径 (cm), ϵ : 空けき率

P_0, P_i : カラム入口, 出口圧 ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$)

u_0 : 出口流速 ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)

Bohemien氏³⁾ らによれば充てんカラムについて ϵ はほぼ一定で、 $\epsilon \approx 0.4$ であるとしている。この値を用いると比透過率は近似的に

$$B_0 \approx \frac{dp^2}{1012} \quad \dots\dots\dots (3)$$

Golay column においては、カラム出口流速 u_0 について次の Hagen-Poiseuille の式が成立する。

$$U_0 = \frac{d^2}{64\eta L} \cdot \frac{P_i^2 - P_0^2}{P_0} \quad \dots\dots\dots (4)$$

d : カラム内径

Golay column では $\epsilon = 1$ であるから (2), (4) 式より、

$$B_0 = \frac{d^2}{32} \quad \dots\dots\dots (5)$$

B_0 は (5) 式より簡単に計算できる。通常用いられる充てんおよび、Golay column における B_0 の値を表1に示す。Golay column の B_0 は充てんカラムに比較して約 100 倍

大きく、したがって同じ長さでは (1) 式より圧力降下が 100 で著しく小さいことになる。圧力降下が小さいためカラムを長くすることができ、その結果高い理論段数が得られることは Golay column の実用的に重要な特性である。このように比透過率の大きいカラムは昇圧法に最も適当である。

表1 各種カラムの透過率

カラム	担体	粒径 (メッシュ)	カラム径 I.D. mm	比透過率 $\times 10^{-7} \text{ cm}^2$
充てん形	Chromosorb 9	250~177(60/80) 420~340(40/50)	—	3.45 9.54
毛細管	—	—	0.25 0.50	195 781

3.3 検知器

マス・レスポンス形の検知器である FID を用いれば、ピーク高さ感度が増し微量成分の分析が可能となる。

4. 測定結果

4.1 保持時間の再現性

U-90 Golay column (スクアラン, 内径 0.25mm $\times$ 90m) を用い、n-ペンタン、2-メチルペンタン、3-メチルペンタン、n-ヘキサン、3-3ジメチルペンタン、n-ヘプタンおよび n-オクタンの混合試料の分離に 3 段昇圧法を適用し保持時間の再現性を検討した。

図6(A)はカラム温度 70°C で定圧法により分析した例である。本試料のプログラミング法において問題となるのは 2-メチルペンタンと 3-メチルペンタンの分離である。

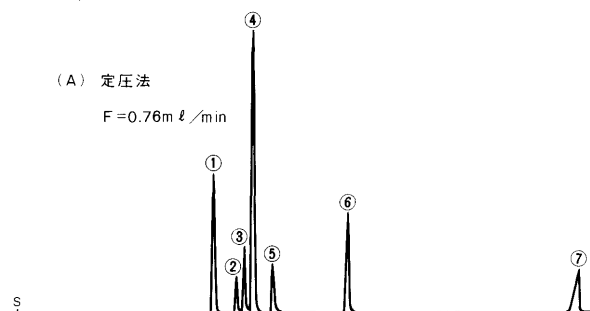


図6(A) 定圧法によるクロマトグラム

これらの成分がカラムより溶出するまでは $\bar{u}_{opt}$ 付近の流速を用いる必要がある。はじめに定圧法の場合と同じ $P_1 = 1.3\text{kg/cm}^2$, $F_1 = 0.76\text{ml/min}$ を用い、3,3-ジメチルペンタン溶出後は $P_2 = 4.1\text{kg/cm}^2$, $F_2 = 4.80\text{ml/min}$ を、n-ヘプタン溶出後は $P_3 = 4.8\text{kg/cm}^2$, $F_3 = 7.15\text{ml/min}$ に 3 段昇圧した結果が図6(B)である。分離を低下させることなく分析時間を $\frac{1}{2}$ 以下にすることは容易である。n-ヘプタンは 2 段昇圧、n-オクトンは 3 段昇圧を受けることになるが、このようなフロー・プログラミング条件下

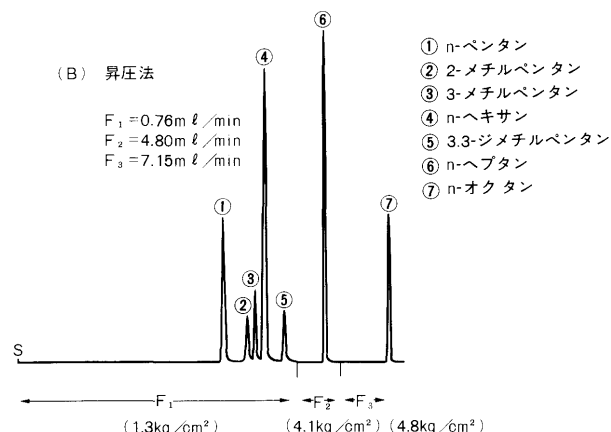


図6(B) 昇圧法によるクロマトグラム

における各成分ピークの保持時間(mm単位)の再現性を求めた結果が表2であり、十分な再現性をもっていることがわかる。

表2 保持時間の再現性

No.	tdr (mm)			
	n-C ₅	n-C ₆	n-C ₇	n-C ₈
1	60.0	71.5	91.5	110.5
2	60.0	71.5	91.5	110.5
3	60.5	72.0	91.0	110.5
4	59.5	71.5	92.0	111.5
5	60.0	72.0	91.5	111.5
Av	60.0	71.7	91.5	110.9
σ	0.35	0.25	0.35	0.55

4.2 ピーク高さ

図6(B)の測定結果よりプログラミングを受けないn-ヘキサンピークを標準としてピーク高さ比を求め等圧法の場合と比較した結果が表3である。上述した昇圧条件に

表3 昇圧法におけるピーク高さ

プログラム	ピーク高さ比 (n-C ₆ =1.00)	
	n-C ₇	n-C ₈
3段昇圧法	1.21	0.54
	1.21	0.53
	1.22	0.55
	1.22	0.54
	Av. 1.22	0.54
等圧法	0.38	0.10

においてn-ヘプタンは約3倍、n-オクタンは約3.5倍ピーク高さ感度が増加した。これはFIDと昇圧法を併用する場合の特色である。通常の等温、等圧法では保持時間の異なる成分ほどピークが幅広く高さ感度は低い。したがって昇圧法は後溶出成分の微量分析に有効な方法であることがわかる。また(A)(B)両クロマトグラムの比較より明らかに、昇圧によって後溶出成分のピークは非常に対称性のよいものとなる。

4.3 芳香族炭化水素の分析例

U-90 Golay column を用いベンゼンよりi-ブチルベンゼンまでの芳香族炭化水素13成分の分離に昇圧法を適用した結果が図7である。クロマトグラム(B)はカラム温

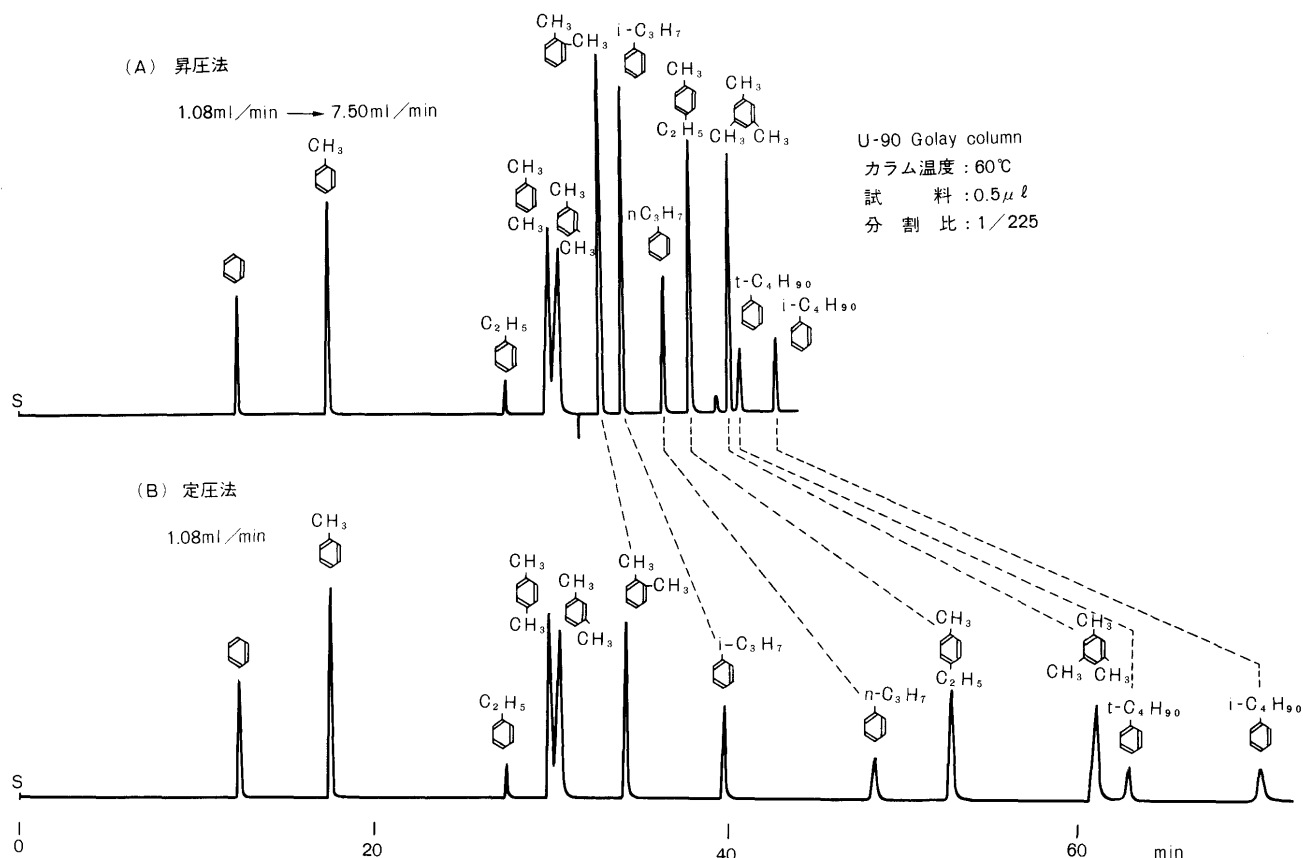


図7 アルキルベンゼンの分析例

度60°C、流速1.08ml/minの定温定流速で得られた結果である。混合試料中で最も分離が困難であるp-キシレン、m-キシレンの2成分が溶出するまで最適に近い流速1.08ml/minで溶出し、その後昇圧して流速を7.5ml/min

とした2段昇圧法の結果がクロマトグラム(A)である。分離性を少しも低下させることなくi-ブチルベンゼン迄の分析時間を70分から40分に迅速化することができる。

4.4 市販ガソリンの分析

同一カラムで市販ガソリンを分析した結果を図8に示した。(B)は定圧法での測定結果で80分までのクロマトグラムである。(A)は同じ試料をフロー・マーカで示したようにn-ヘプタンおよびp-キシレン溶出後に3段昇圧した結果でありo-キシレンまでの分析所要時間は約半に短縮

され、同一分析時間内に(B)に比較してo-キシレン以後約8成分溶出している。

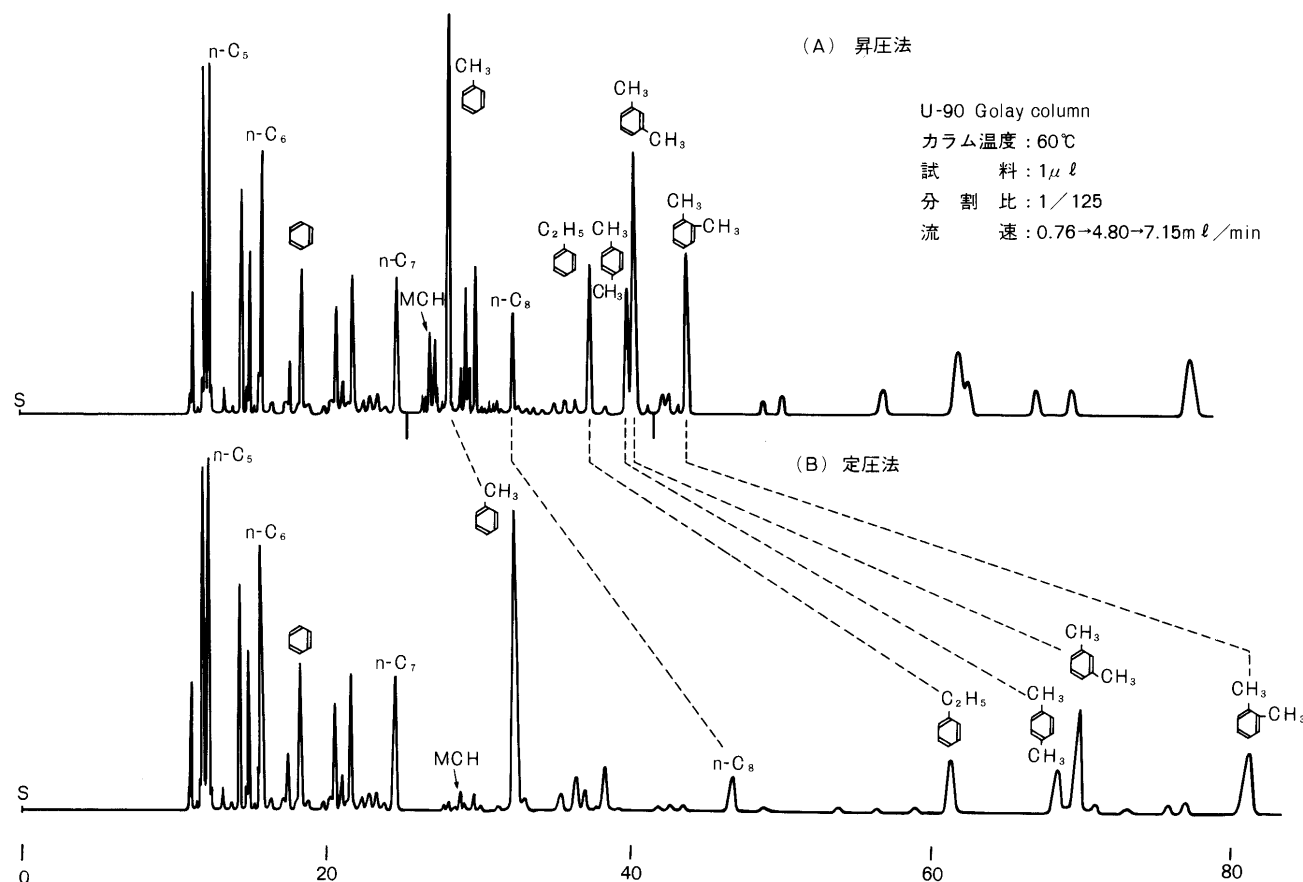


図8 市販ハイオクタンガソリンの分析例

5. むすび

昇圧法の特徴を要約すると、次のとおりである。

- (1) HETP- $\bar{u}$ 曲線の特性がフラットで比透過率の大きいカラムが適している。この条件を最もよく満足するものはGolay columnである。
- (2) 後溶出成分ピークの非対称性が改善され、マス・レスポンス形の検知器ではピーク高さ感度が増し微量成分の分析を可能とする。
- (3) 分析時間を一定とした場合、定圧法に比較して分離性を低下させずに低カラム温度での測定ができる。

- (4) 昇温法に比較してベースラインドリフトが小さく、また冷却時間は不要であり、すぐ再測定ができる。

参 考 文 献

- (1) Ettre, L.S.: "Open Tubular Column in Gas Chromatography" (1965)
- (2) Nogare, S.D., Junet, R.S.: "Gas-Liquid Chromatography" (1962)
- (3) Bohemen J. and J.H. Purnell.: J. Chem. Soc., (1961)

THE HITACHI Scientific Instrument News Vol. 11 No.6

昭和43年11月20日印刷

昭和43年12月1日発行

非 売 品

年6回毎偶数月発行

編集人 藤 森 慶 一

発行人 白 川 義 雄

発行所 株式会社 日立製作所

印刷所 株式会社 日立印刷所