

XMA-5 形日立微少部 X 線分析装置による 酸化被膜構造の解明

—— 希土類元素を添加した Fe-Al 合金の高温酸化被膜の構造について ——

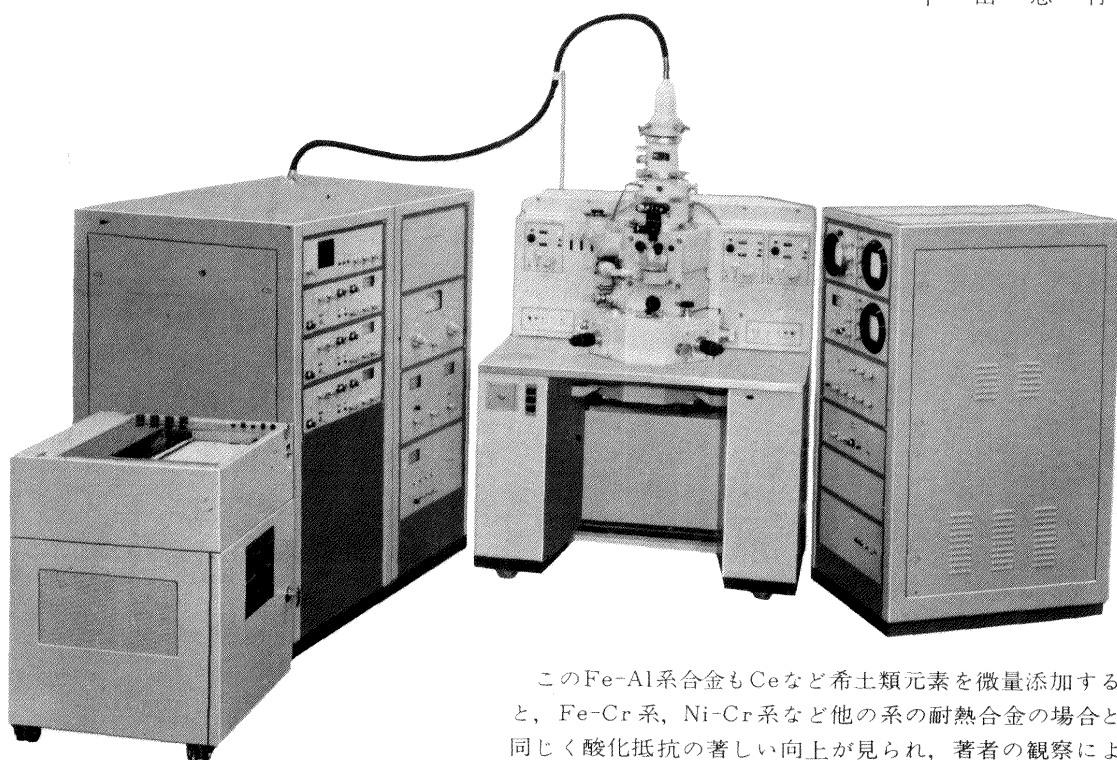
中 山 忠 行*

1. 緒 言

Ni-Cr 系, Fe-Cr 系あるいは Fe-Cr-Al 系などの耐熱合金に Ce などの希土類元素を添加すると高温寿命が顕著に改善されることはすでによく知られた事実である。¹⁾ 著者らは^{2) 3)} さきに微量の Si を含んだ 18Cr-Fe 合金に Ce 強化ミッシュメタルを添加すると同じく耐高温酸化性の向上する事実を認め、さらにこれら表面に生成した酸化被膜

の X 線マイクロアナライザによる検討を試みたところ、希土類元素添加により、 Cr_2O_3 からなる外層被膜の内層の合金表面に接して層状のち密な Si の蓄積がなされる事実が判明し、X 線回折的には検出され得ない非晶質シリカ被膜の生成が暗示された。すなわち、このち密なシリカ被膜が酸化抵抗の改善に寄与していることが推論されるわけである。しかし、この場合には、Felten⁴⁾ あるいは Francis ら^{5) 6)} が Y または La, Ga など希土類元素を添加した高 Cr-Fe 合金もしくは Cr-Ni-Nb-Fe 合金の高温酸化被膜中に X 線回折的に見出した R_2O_3 (R: Y あるいは希土類元素) または RCrO_3 なる複酸化物の生成を、X 線回折的にも X 線マイクロアナライザによっても明らかにすることはできなかった。

Fe に Al が添加されるとその耐高温酸化性が増大することはこれもすでに知られた事実である。しかもこれら Fe-Al 合金の酸化面には酸化初期にすでに α -あるいは γ - Al_2O_3 などから成る被膜の生成を見ることは著者によってもすでに電子回折的に明らかにされている。^{7) 8) 9) 10)}



この Fe-Al 系合金も Ce など希土類元素を微量添加すると、Fe-Cr 系, Ni-Cr 系など他の系の耐熱合金の場合と同じく酸化抵抗の著しい向上が見られ、著者の観察によれば、表面生成酸化被膜と素地合金との固着性の顕著な改善も認められたのである。したがって、本報告ではこれら酸化被膜の組成分布と固着性に着目して、主として XMA-5 形日立微少部 X 線分析装置による究明を試み、二三の知見を得たのでここにご紹介する。

目 次

■ XMA-5 形日立微少部 X 線分析装置による 酸化被膜構造の解明……………	中山忠行…………… 1
■ 原子吸光分析法におけるディスペーザの利用に ついて……………	村中日出夫, 井上 博, 須藤健吾…………… 6
—— 液体クロマトグラフ特集 ——	
■ 034 形日立液体クロマトグラフによる TCA サイクル・ α -ケト酸の分析……………	清水照夫, 村上宏規, 松宮弘幸, 藤原喜延, 宮内圭治, 鷹野重威…………… 10
■ KLA-3 B 形日立アミノ酸分析計による リガンド分析法……………	鷹野重威…………… 13
■ 034 形日立液体クロマトグラフによる糖類の分離 有川喜次郎, 武内静士……………	16
■ KLA-3 B 形日立アミノ酸分析計用オートサンプラ 鷹野重威, 大沼定文, 伊藤三男……………	18

2. 供試試料および実験

供試合金はCe強化ミッシュメタル [金希土類元素 (T.R.E.): 95wt%, Ce/T.R.E.: 92.86wt%] を添加した9.80%Al-0.73%T.R.E.-Fe合金ならびに比較のために9.97%Al-Fe合金の2種類である。いずれの合金も真空溶解により作成し、熱間圧延した板状のもので、900℃で1時間真空焼鈍後10×15×4mmの大きさの試片を採取し、エメリ紙(0番)で研摩後脱脂洗浄し酸化に供した。酸化は大気中、それぞれ1,000℃あるいは1,200℃に24時間加熱することにより行なった。これら酸化試料表面はCo-K_α特性X線による反射回折を試みた後、酸化被膜から素地にいたる断面にわたってのO、Fe、AlおよびCeの分布状態と濃度および素地との関係をX線マイクロアナライザにより観察した。

3. 実験結果とその考察

両合金ともその1,000℃、24時間酸化面からは α -Al₂O₃および α -Fe₂O₃の生成がX線回折的に認められたが、希土類元素を添加した合金の場合にはそれ以外にCeO₂結晶の(111)面からの回折線が強度は弱いが出検された。また、1,200℃、24時間酸化後には希土類元素の無添加合金では表面に α -Al₂O₃のみから成る酸化物の生成を見たが、希土類元素を添加した合金の場合には α -Al₂O₃以外に α -Fe₂O₃ならびに微量ながらCeO₂の生成を示す回折線が認められた。なお希土類元素を添加しない合金は1,000℃および1,200℃いずれの酸化に際しても酸化被膜は添加合金よりも固着性が劣っていた。次にこれら酸化被膜の断面と素地にわたるX線マイクロアナライザによる観察結果を示す。すなわち、9.97%Al-Fe合金の1,000℃、24時間酸化後の吸収電子像およびX線像(O-K_α, Fe-K_α, およびAl-K_α)はそれぞれ写真1に示すが、これと

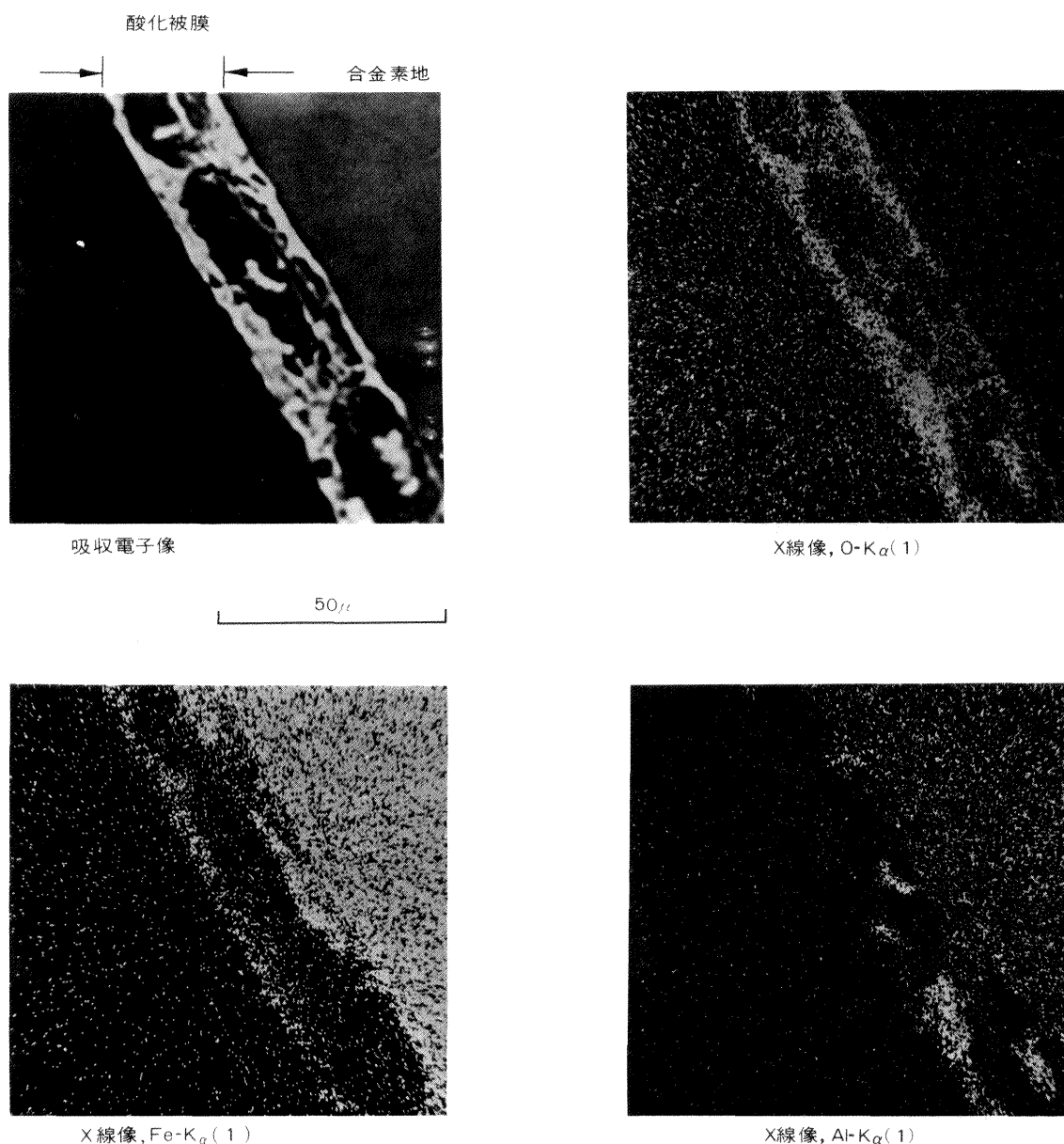


写真1 9.97%Al-Fe合金表面に1,000℃、24時間大気中加熱で生成した酸化被膜と素地からの吸収電子像とX線像

写真 2 に示した同条件酸化後の 9.80%Al-0.73%T.R.E.-Fe 合金の場合と比較すると明かなように、希土類元素の添加により α - Al_2O_3 から成る被膜はきわめて緻密なものとなり、かつ素地に接してよく固着し保護被膜としての役割りを十分果たしていることがわかる。それに反し希土類無添加の合金では、 α - Al_2O_3 および α - Fe_2O_3 と素地から遊離し、かつ保護被膜の形状を呈していないことが明白となった。しかし、Ce のような希土類元素は写真 2 から明かなように合金表面に特に濃縮することなく、いわゆる CeO_2 などより成る保護被膜を形成して耐酸化性に寄与していないことは明かで、むしろ Felten らが指摘するように表面生成酸化膜(ここでは α - Al_2O_3 あるいは α - Fe_2O_3) と素地の "Keying effect" として働らくような形態で CeO_2 は作用していることが推論されたのである。

1,200 °C, 24 時間酸化後にも酸化被膜構造は希土類を含まないものは写真 3 に示すように α - Al_2O_3 被膜は完全に素地と密着することはないが、添加合金では α - Al_2O_3 から成る被膜は 1,000 °C 加熱の場合よりさらに緻密となり、かつ特徴的なことは、これら α - Al_2O_3 相は素地中に内部酸化状を呈して侵入し、 CeO_2 の "Keying" とともに α - Al_2O_3 被膜の固着性改善の原因の一部を暗示しているように思われる(写真 4)。

それに反して、Ce の酸化被膜中もしくはその内層における濃縮、特に層状の蓄積は、1,000 °C の場合と同様認められず、X 線回折的にわずかに検出された CeO_2 がやはり "Keying effect" の作用はするが、これ自体の被膜生成による拡散障壁の役割りは本研究結果からも否定されたのである。

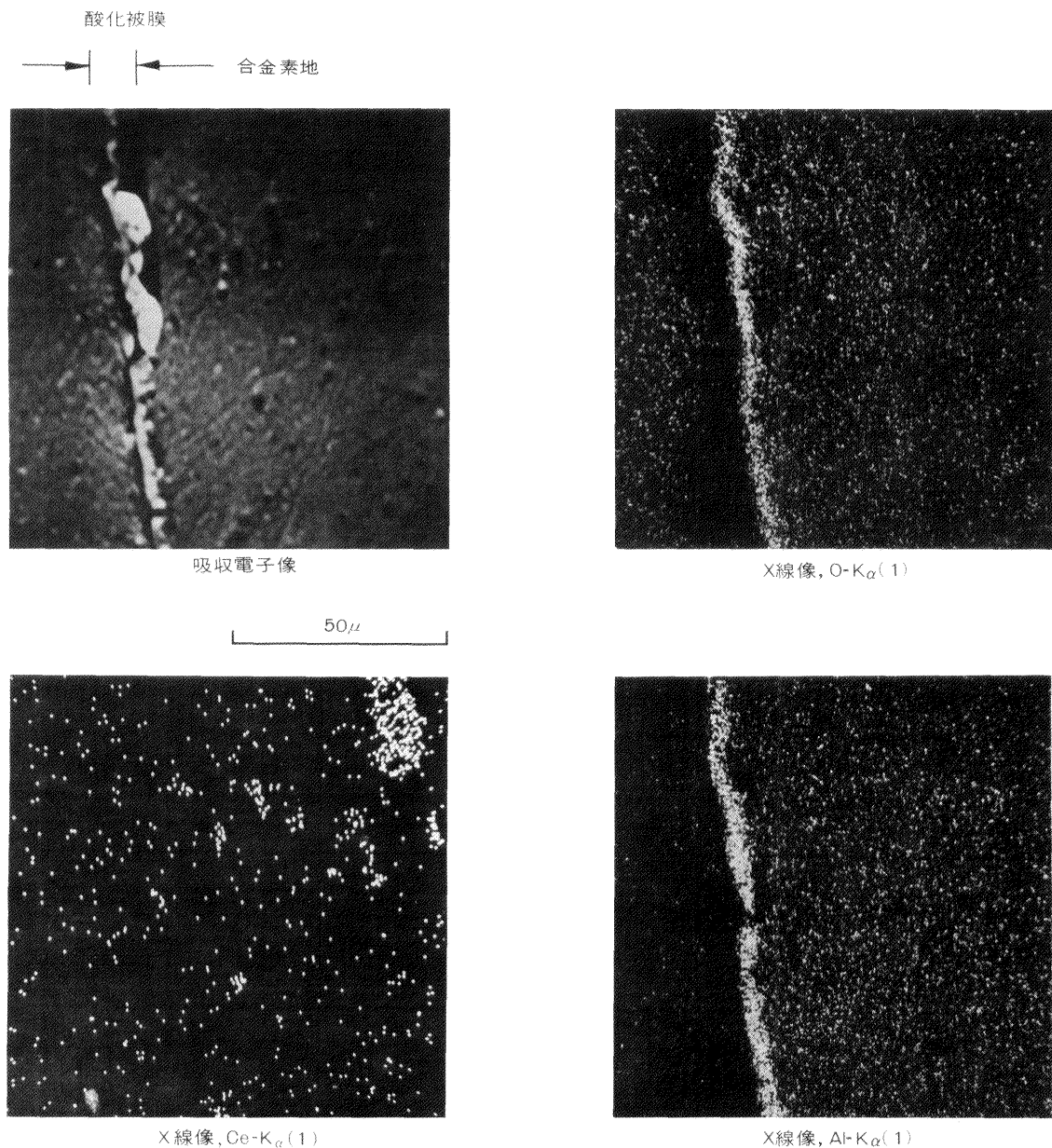
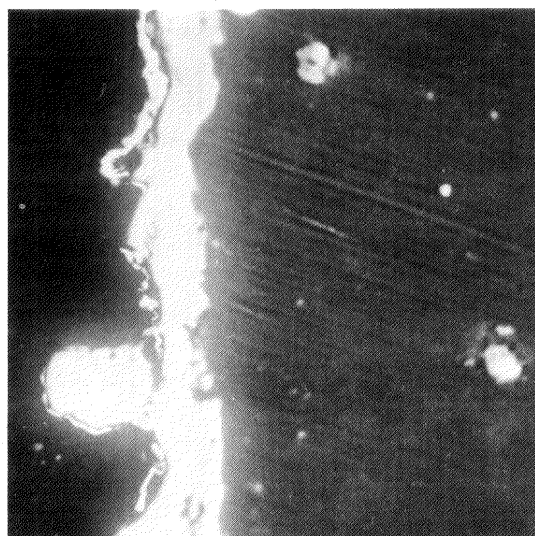
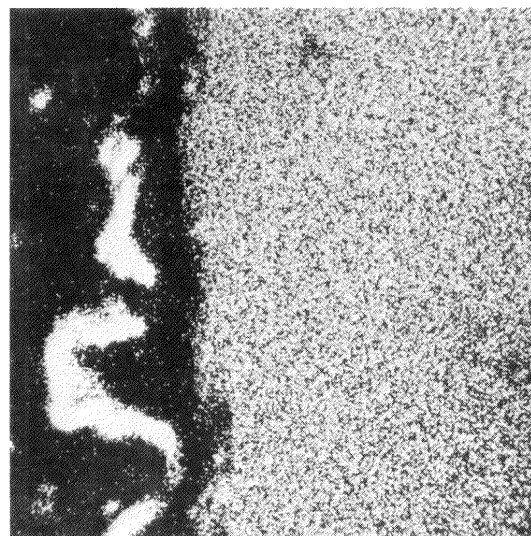
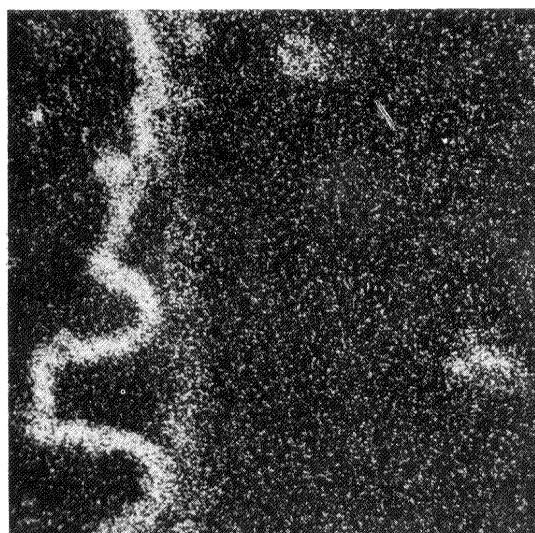


写真 2 9.80%Al-0.73%T.R.E.(全希土類元素)-Fe 合金表面に 1,000 °C, 24 時間大気中加熱で生成した酸化被膜と素地からの吸収電子像と X 線像

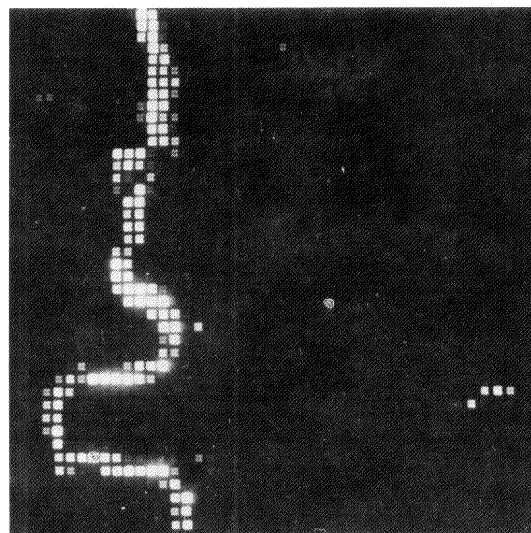
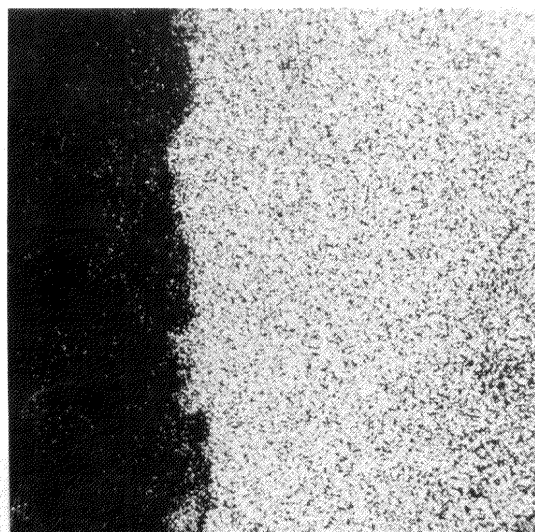
酸化被膜
合金素地



吸収電子像

160 μ X線像, Al-K α (1)

X線像, O-K(1)

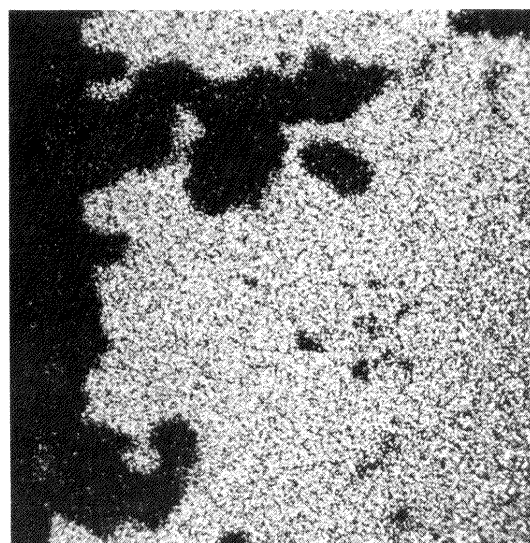
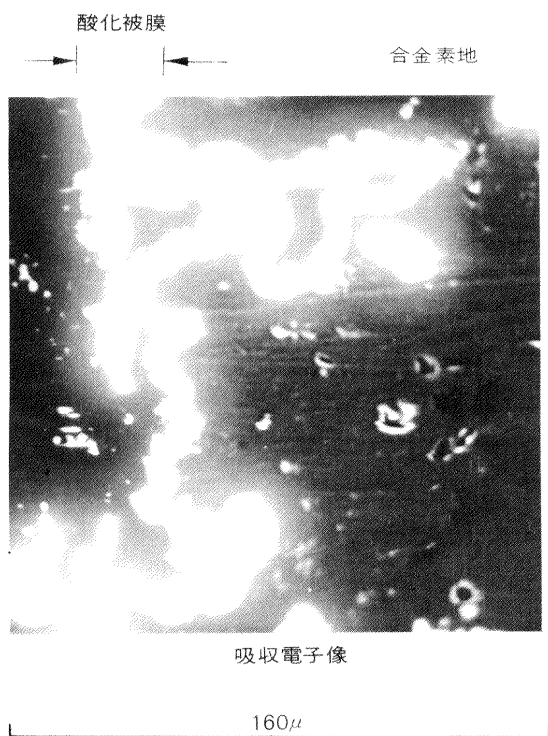
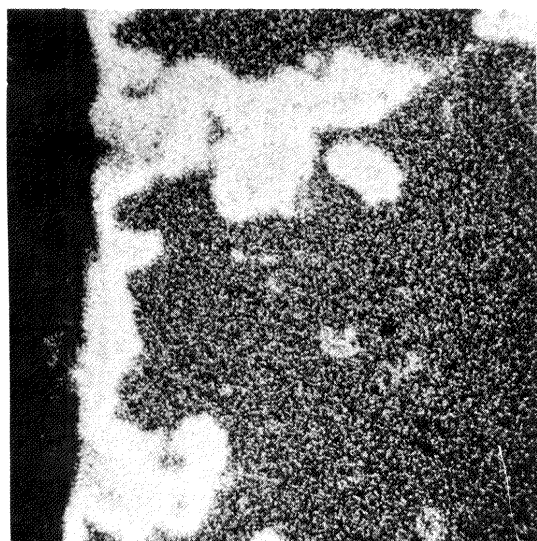
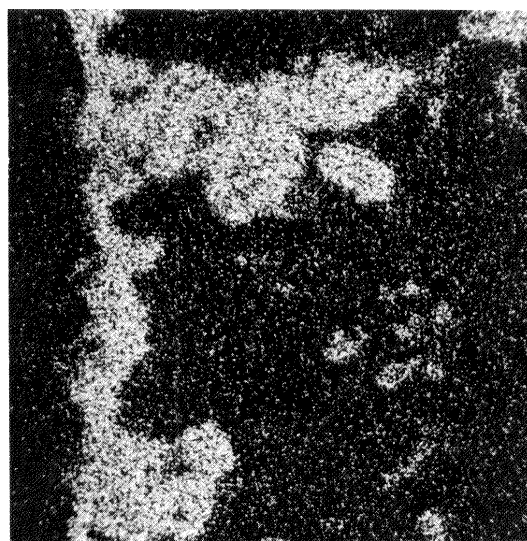
コンテンツ マッピング像
O-K(1)X線像, Fe-K α (1)

◀写真3

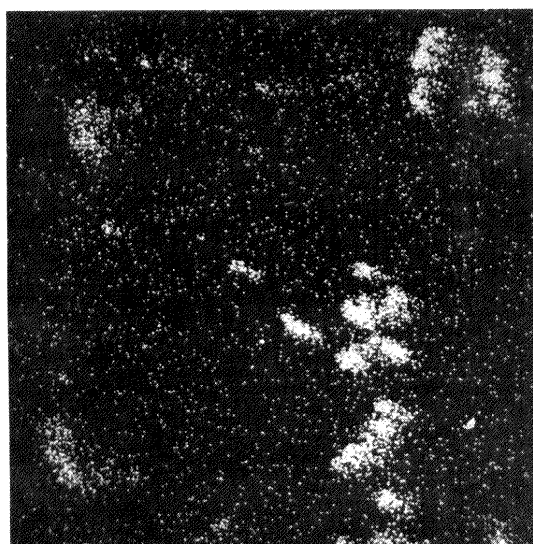
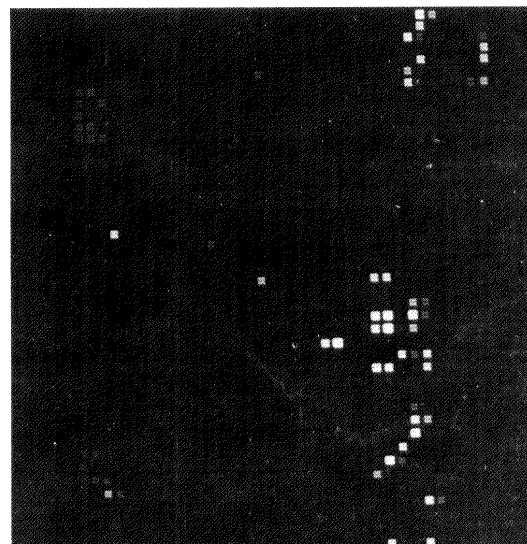
9.97% Al-Fe合金表面に 1,200℃, 24時間大気中加熱で生成した酸化被膜と素地からの吸収電子像とX線像

▶写真4

9.80% Al-0.73 T.R.E.-Fe合金表面に1,200℃, 24時間大気中加熱で生成した酸化被膜と素地からの吸収電子像とX線像

X線像, Fe-K α (1)X線像, Al-K α (1)

X線像, O-K(1)

X線像, Ce-L α (1)コンテンツ マッピング像 Ce-L α (1)

4. 結 言

10%Al-Fe系合金の高温酸化被膜構造に及ぼす微量Ce添加の影響をX線マイクロアナライザで観察することにより、これら希土類元素の添加により耐高温酸化性改善の原因を暗示する事実が明白となった。

すなわち、希土類元素の添加は本系合金の1,000℃もしくは1,200℃大気中酸化被膜構造、特にち密な α -Al₂O₃被膜の生成に寄与するとともに合金表面に固着していることが明白となった。なかんずく、 α -Al₂O₃被膜の合金素地との固着性はFeltenらのいうCeO₂など希土類酸化物による被膜の“Keying”効果以外に α -Al₂O₃被膜の一部から内部酸化状に素地中に“Keying”される結果一段と改善され、 α -Al₂O₃などアルミナ被膜自体の物理的、化学的安定性ととも耐酸化性に寄与することが明らかとなった。

終りに、本研究の遂行に当たりご懇篤なるご尽力をいただいた株式会社日立製作所那珂工場技術部長藤森慶一氏ならびに終始実験にご協力くださった同工場応用開発課鈴木 叶氏に深甚なる謝意を表します。

●参考文献

- 1) W.Hessenbruch: Mettalle und Legierungen für hohe Temperaturen 1. Aufl., Berlin (1940), 105
- 2) 中山, 渡辺: 日本金属学会誌, 31(1967), 385.
- 3) T.Nakayama & Y.Watanabe: Trans, Iron & Steel Inst. Japan, Vol.8 (1968), 259.
- 4) E.J.Felten: J.Electrochem. Soc., 108(1961), 490.
- 5) J.M.Francis & W.H.Whitlow: Sorr.Cei., 5(1965), 701.
- 6) J.M.Francis & W.H.Whitlow: J.Iron Steel Inst., 204(1966), 355.
- 7) 中山: 日本金属学会誌, 21 (1957), 716.
- 8) 中山: 日本金属学会誌, 22 (1958), 332.
- 9) T.Nakayama: 日本金属学会誌, 23 (1959), 1
- 10) 中山: 日本金属学会誌, 23 (1959), 739.

原子吸光分析法におけるディスペーザの利用について

—139-0420形日立原子吸光分光光度計への応用—

村中日出夫* 井上 博** 須藤健吾***

原子吸光分光分析法(AAS)の臨床医学での普及はめざましいものがあり、血清および水中のカルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)については既に多くの所で本法が広く用いられている。われわれもこの血清Ca、MgのAAS測定については詳細な検討を行ってきた。¹⁾²⁾最近ではさらに鉄(Fe)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)などの生体内微量重金属の測定にも応用されるようになってきている。生体内のこれら電解質や金属はその量が微量であり、臨床検査としては試料である血清などの使用量ができる限り少ないことが望まれるので、測定機器の測定限界を可能な限り小さくするよう感度を上げる努力が必要である。われわれは最近この目的のために、小ガラス球をアトマイザの前に装着し、試料の噴霧状態を均一かつ良好にして感度を上げうというDispensorを試用する機会を得た。これを用いて血清Ca、MgおよびZnの測定を行ない検討を加えた。

1. 実験方法

(1)分析機器: 原子吸光分析装置は139-0420形日立分光光度計付属装置で、バーナーは水冷とした。光源は日立Ca-Mg複合ネオン封入中空陰極ランプ(HCL)および日立Znアルゴン封入HCLをそれぞれ10mA、30mAの電流で使用した。Dispensorは図1のようなガラス製のものをアトマイザの前に装着し、簡単に着脱することができる。

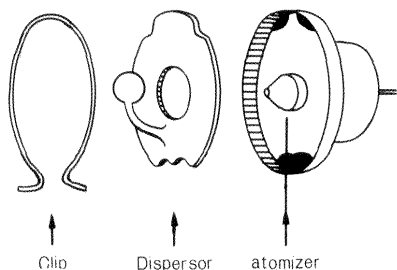
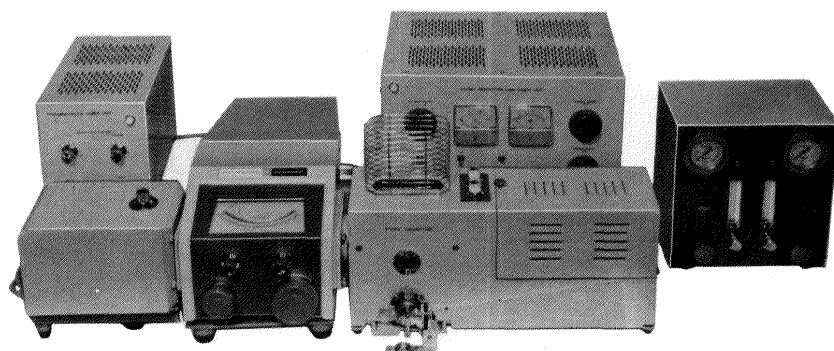


図1
Dispensorの略図



139-0420形日立原子吸光分光光度計

- (2)試薬: 使用する水は脱イオン水を再蒸留したもので、Ca標準液はクリントン社製のもの、Mg標準液は特級MgCl₂より自製した。Zn標準液としてはZnSO₄・2H₂O水溶液(半井化学)、添加用混合標準液は第1化学電解質焰光用混合標準液を用いた。その他試薬はLaCl₃を除きすべて特級を使用し、脱塩たん白としてはChemvalion(日本商事)を用いた。
- (3)試料希釈法: 血清0.5mℓに1N塩酸1mℓを加え脱イオン水で10mℓとして血清Caを、また、その一部をさらに5倍水希釈してそれでもって血清Mgを測定した。血清Znの場合は血清0.5mℓを脱イオン水で希釈(5または10倍)した。

2. 実験成績および考察

(1)血清Ca、Mgの測定について

基本的なバーナーの高さやスリット幅についての検討はDispensorを使用せずに行なったが、図2・図3に示すようなCaの場合では、HCLの光路がバーナー上6mmの所を通るMark 1にバーナーの高さを調整したときが、アセチレン流量のいかんにかかわらず吸光が最大であった。Mgについては著明な差がなかった。スリット幅はCaでは狭いほど吸光が大きくなるが、機器の感度の問題もあって0.15mmくらいが適当である。Mgではスリット幅によってあまり差がみられなかった。

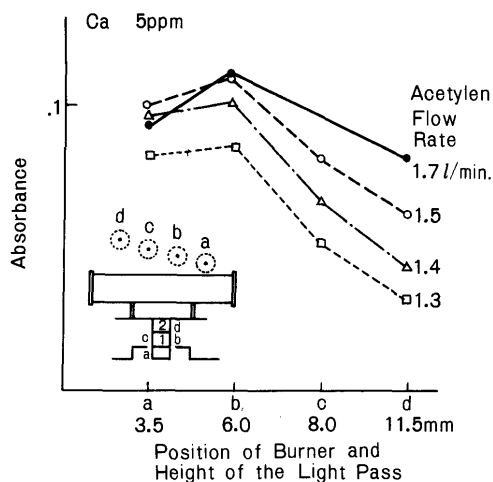


図2 バーナーの位置とアセチレン流量のCa原子吸光におよぼす影響

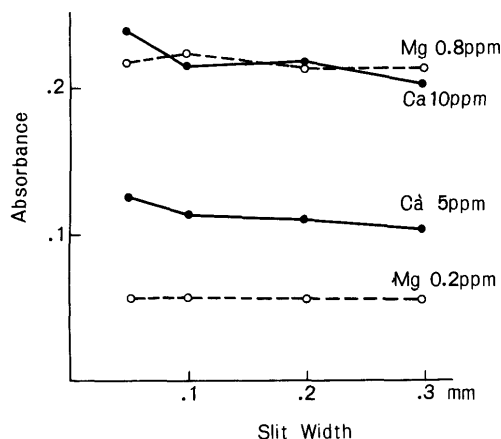


図3 Ca, Mg 吸光とスリット幅

(a)アセチレン流量および空気流量：空気流量を7.0 l/minに固定しアセチレン流量を変えると、Dispensorの有無にかかわらず図4のようにMgでは1.5 l/minで吸光が最大であり、Caの場合はDispensorを用いないときは1.7 l/min、Dispensor使用時1.8 l/minで最大の吸収を示した。すなわち、fuelrichな点でCa吸光が大となる。しかし、アセチレン流量1.8 l/minでは、ときにバーナー室が共鳴するので、実際には1.7 l/min程度がよい。空気流量はDispensor使用時Caでは7.0 l/minの場合が吸光が最大で、Mgのときは空気流量の少ないほど吸光が大きくなる傾向にあった。しかし、実際には1.7 l/minで十分である。

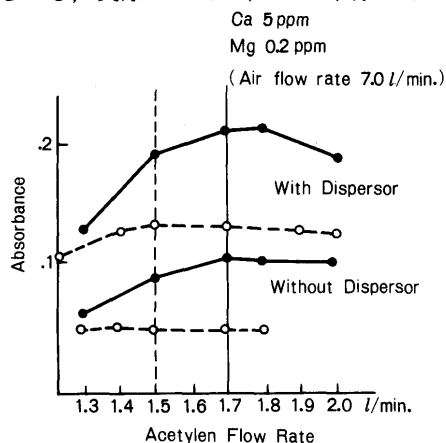


図4 Dispensor使用の有無によるアセチレン流量とCa, Mg 原子吸光との関係

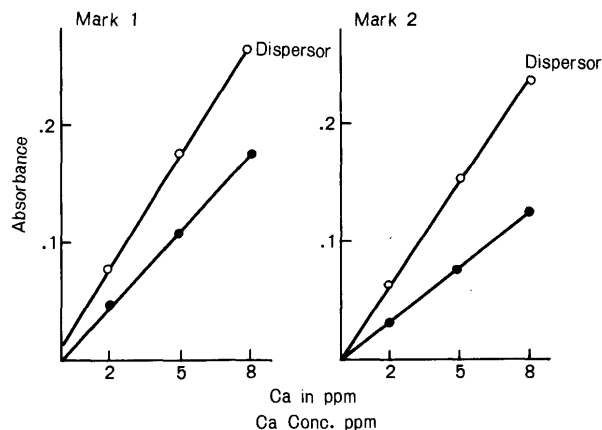


図5 Ca原子吸光の標準直線におよぼすDispensorの影響

(b)標準直線の比較：Dispensorを使用することにより、Ca, Mgともに図5, 図6のように吸光は約2倍増大して直線性も良好であった。ただ、Dispensorの使用時CaをMark 1のバーナーの高さで測定するとき標準直線は原点を通らない。このことは今後さらに検討する必要がある。

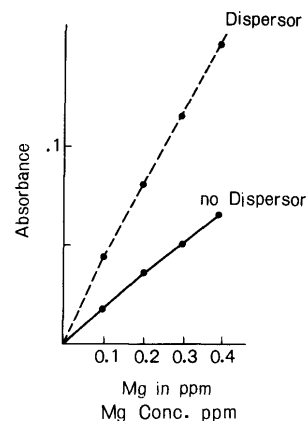


図6 Mg原子吸光の標準直線に及ぼすDispensorの影響

(c)干渉について：血清Caの測定においては、そのたん白がCa吸光に正の干渉を示して問題を複雑にしていることはすでにわれわれが指摘したところであるが、¹⁾図7に示したようにたん白はDispensorの有無にかかわらずCaの吸光に対して同じような干渉を示した。Dispensor使用時は吸光増大に伴って干渉も大きく現われている。これはDispensorにより試料のたん白が細粒化して噴霧されるので、Zettnerら³⁾のいうForming actionが働くのではないかとと思われる。また、りん(P)はどの研究者も述べているように、特にCaに対し負の強い干渉を示す。これはCaがりん酸カルシウムとなるため原子化が妨げられるためと考えられる。Dispensor使用でこれらの生成が防げるかと考えたが、図8に示すようになんら改善されたとは認められない。たん白のときと同様Dispensorの使用時の方が干渉が大きくなっている。

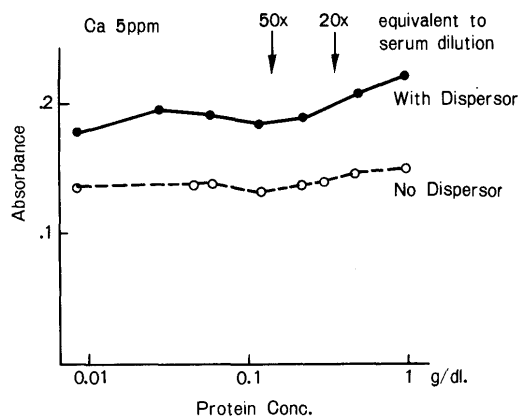


図7 Ca原子吸光におけるたん白の干渉とDispensor

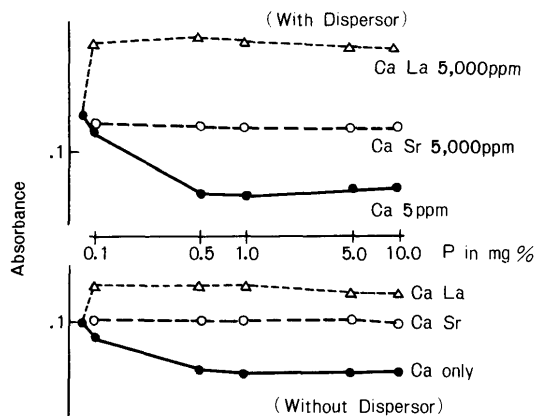


図8 Ca原子吸光におけるPの
干渉とDispensor

われわれがすでに¹¹⁾²⁾に報告したところによると、CaにSr塩を加えると低濃度(500~2,000ppm)ではCa水溶液の吸光が最大となり、一方血清にSrを加えると吸収がむしろ減少する。これは前に述べたが、たん白のForming actionの消失によりPの影響が表面に出てくるからであろう。この干渉も図9のようにDispensor使用によって減少するという事はなかった。

以上のことから、Dispensor使用は確かにCa, Mgの吸光を増加せしめ、感度を上げることができるが、干渉については改善されないといえることができる。

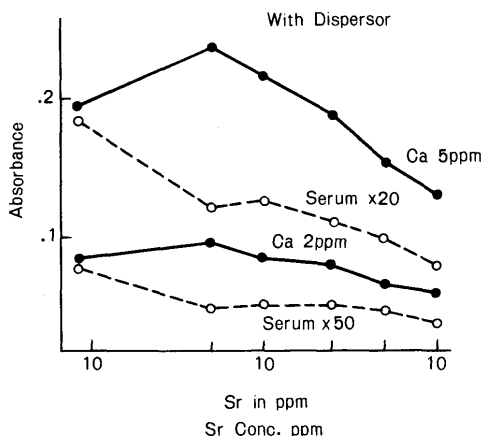


図9 Dispensor使用時のCa原子
吸光におよぼすSrの影響

(d)測定値の比較：実際に血清試料を測定してみると図10, 図11のようにCa, MgともにDispensor使用時には非使用時に比較して高い測定値を得た。このときTCA除たん白

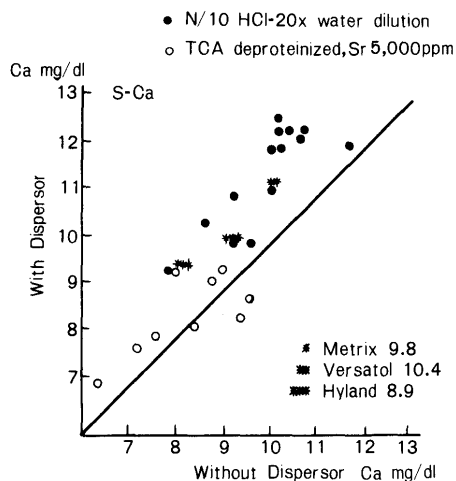


図10 原子吸光分析による血清
Ca値とDispensor

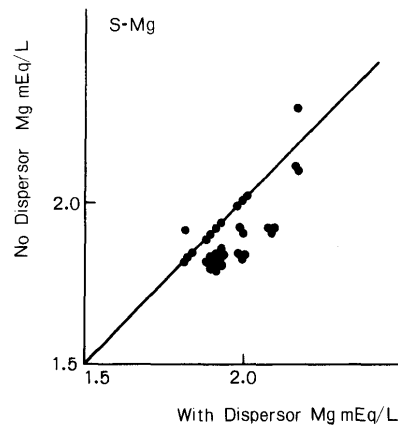


図11 原子吸光分析による血清
Mg値とDispensor

を行ないSr5,000ppmを添加した場合は、両者がわりに相似た値を示すようである。表1も同様の結果を示すものであるが、標準血清の測定例ではDispensorを用いないほうが表示値に近い値を与えることがわかる。伊藤⁴⁾らは207形日立原子吸光分光光度計でDispensorを使用し、血清中のNa, K, Mg, Caを測定しよい結果を得たと報告したが、これはわれわれの検討成績と異なるものである。この差はおそらく使用した分析機器の差および水希釈とTCA除たん白Sr添加法との違いによるものであろう。

表1 血清Caの原子吸光分析におけるDispensor
および希釈倍数の影響 (unit: mg/dl)

	no Dispensor		with Dispensor		EDTA	Chloranil
	20X	50X	20X	50X	Titrat.	Method
1	10.3	11.6	12.2	12.6		
2	10.0	10.8	11.4	12.1		
3	9.6	9.8	10.0	11.2		
3	10.2	8.6	12.4	14.0	10.4	10.0
4	8.6	10.2	10.4	12.1	9.2	8.3
5	10.2	11.2	12.0	13.8	9.8	10.0
6	9.2	10.6	11.0	12.6	9.4	9.8
7	7.6	8.6	9.4	9.6	7.0	7.2
8	10.0	10.2	12.0	14.2	9.6	10.0
9	10.4	11.2	12.4	13.2	10.2	
10	11.6	10.2	12.0	14.2	10.8	9.6
11	10.2	11.8	12.6	14.2	9.2	8.6

1: Metrix 9.8(9.0-10.6), 2: Versatol 10.4 3: Hyland 8.8-9.0

(2)亜鉛について

Znは原子吸光分析の対象金属としては特異性、感度ともに有利なものの1つであるが、臨床医学で取扱う生体試料中のものはその量が微量であるため色々の問題がある。わが国ではAASによる血清Znの測定については139-0420形日立原子吸光分析装置を用いた佐藤ら⁵⁾、松宮ら⁶⁾の詳細な検討がある。佐藤らは血清を10倍に希釈し、また松宮らは5倍希釈で、分光計のメータまたは記録計を用いて2倍にスケール拡大を行ない測定している。われわれも前述したように5~10倍で測定してみたが、できる限り血清量を少なくし、測定試料(希釈試料)を多くするため10倍希釈が好ましいと考えた。このときはもう少し吸光を増すようにする必要を感じDispensorを用い、その影響を検討した。

(a)アセチレン流量：Dispensor使用の有無にかかわらずZnの吸光はfuer poorな状態で大となる。すなわち、図12に示すごとくである。しかし、1.0ℓ/min以下では焰がしばしば消えたり、不安定になったりするおそれがあるので、1.0ℓ/minが適当である。

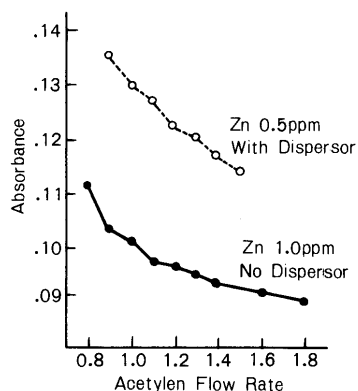


図12 Zn原子吸光とアセチレン流量との関係およびDispensor

(b)干渉について：DispensorはCa, Mgの原子吸光における干渉を改善しなかった。そこで、Znについてもたん白の影響を観察したところ、やはりDispensor非使用時と同じ傾向であった。

(c)測定値の比較：表2は血清ZnのDispensor使用の有無による測定値の比較であるが、Dispensor使用時、10倍希釈時がそれぞれ非使用時、5倍希釈時に比べてやや高い値を与えるが、その差はごくわずかである。一方、図13に見るようにDispensor使用によりZnの吸光は約2倍に

表2 血清Zn原子吸光分析におけるDispensor希釈倍数およびバーナーの影響

	Mark 1: light pass 6 mm		Mark 2: light pass 11.5mm	
	no Dispensor	with Dispensor	no Dispensor	with Dispensor
10-fold Dilution	100r/dl	105r/dl	90r/dl	100r/dl
5-fold Dilution	95	100	90	98

Standard Zn in water

増加し、感度が上昇していることがわかる。このことからわれわれは血清Znの測定にはDispensorを使用して10倍希釈法を行なうのが適当であると考えた。本法による正常値は $102.8 \pm 9.2 \text{ mcg/dl}$ であった。これらの詳細については別報⁷⁾を参照されたい。

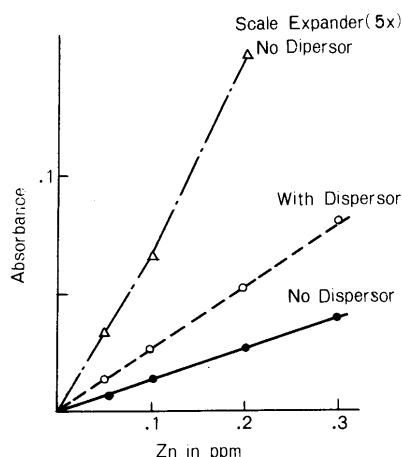


図13 Zn原子分光分析の標準直線とDispensor

(3)総括および結論

原子吸光分析においてその感度を上げて測定限界を低いところにもってくるために、アトマイザの前に小ガラス球を置き、試料の噴霧を均一かつ微細にしてその目的を達しようとするDispensorを使用し、血清Ca, MgおよびZnの測定に応用を試みた。本品は確かにCa, Mg, Znともに吸光を約2倍増強することができた。しかし、血清Ca, Mgにおいては実際の血清測定値がDispensor使用によりかなり高くなり、一方種々の干渉もなんら改善されなかった。また、血清Znにおいては同様に干渉はDispensor使用により変わることはなく、測定値もやや高値を示す傾向にあったが、その差はごくわずかでむしろ感度増強のためにはDispensorを使用するほうがよいと考えられる。

以上よりDispensor使用は、分析機器の機種、測定対象金属などによりその功罪は異なるが、感度増強の1つの方法として試みてみるべき手段といえる。

参考文献

- 1) 村中日出夫ほか : Hitachi.S.I.News, 11: 575-579, 1968.
- 2) 村中日出夫ほか : 臨床病理投稿中
- 3) Zettner, A. & D.Selgson : Clin Chem, 10: 869-890, 1964.
- 4) 伊藤賀祐他 : Hitachi.S.I.News, 11: 567-569, 1968.
- 5) 佐藤 彰, 高橋正直 : Hitachi.S.I.News, 10: 461-464, 1967.
- 6) 松宮和人他 : 臨床病理, 16: 103-106, 1968.
- 7) 村中日出夫, 叶 妙子 : 臨床病理投稿中

液体クロマトグラフ特集

034形日立液体クロマトグラフによる TCAサイクル・ α -ケト酸の分析

1. 緒言

α -ケト酸は植物組織、動物の組織および体液、微生物体内に広く存在しており、その分析法としては、クロマトグラフィ、ポーラログラフィ、比色分析法などが研究されている。

クロマトグラフィには、2,4ジニトロフェニルヒドラゾンや3-アルキル-2-キノオキサリジン誘導体としてのにペーパークロマトグラフィ、薄層クロマトグラフィ、吸着カラムクロマトグラフィなどによって分離する方法、およびメチルエステル誘導体あるいはオキシム化してトリメチルシラン誘導体としてのにガスクロマトグラフィにより分離する方法などがある。しかし、ガスクロマトグラフィでは、無水試料の調製や誘導体の生成に長時間を要する。

筆者らは、セミカルバジド試薬を用いて、グリオキシル酸、ピルビン酸、オキサロ酢酸、 α -ケトグルタル酸などのTCAサイクル・ α -ケト酸のイオン交換クロマトグラフィによる分析を試みたのでその概要を紹介する。

2. 実験方法

(1)検出方法と α -ケト酸の安定化

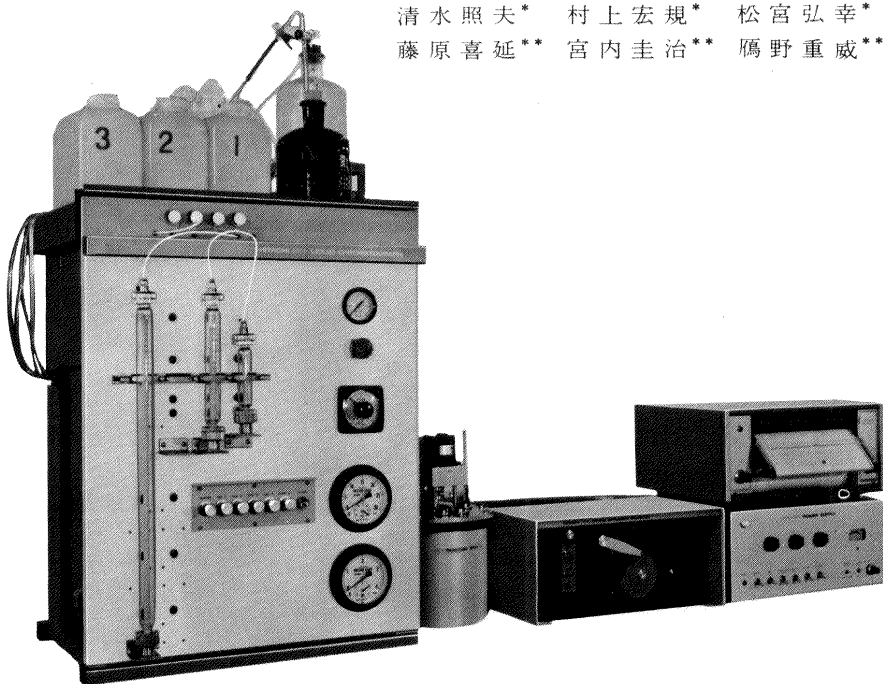
脂肪族の α -ケト酸は紫外吸収を示すが、230m μ 以上の実用的な波長領域では吸光度係数が小さく、流動光度計による検出感度はすこぶる低い。そこで、 α -ケト酸をセミカルバゾン誘導体($\lambda_{\max} = 250\text{m}\mu$)あるいはチオセミカルバゾン誘導体($\lambda_{\max} = 280\text{m}\mu$)として検出するほうが望ましい。オキサロ酢酸のように非常に不安定な α -ケト酸を含む試料を分析する場合には、カラム内で分解してほかのケト酸の分離を妨害するので、この場合には α -ケト酸をあらかじめセミカルバゾン誘導体としてから、イオン交換クロマトグラフィで分離するのが適当である。

(2)セミカルバゾン誘導体の生成条件

α -ケト酸とセミカルバジドとの反応はpH5以下では反応速度が非常に大きく、約6minで一定の生成率を示すが、pH6以上では20minでも一定の生成率を示さなかった。また、pH4以下ではオキサロ酢酸の分解速度が大きくなり、その生成率は逆に低下した。したがってセミカルバゾン誘導体の生成条件を下記のように選定した。

pH	4.5~4.8
反応温度	37°C
反応時間	10~15 min
試薬	セミカルバジド($\text{NH}_2\text{NHCONH}_2 \cdot \text{HCl}$)

清水照夫* 村上宏規* 松宮弘幸*
藤原喜延** 宮内圭治** 隅野重威**



034形日立液体クロマトグラフ

(3)セミカルバゾン誘導体の分離方法

α -ケト酸のセミカルバゾン誘導体は、陰イオン交換樹脂に吸着されるので、pKの違いによって分離することができる。特に誘導体の相互分離には、弱塩基性金属イオンの錯生成反応を利用することが、選択性を改善する立場からも有効であった。

(4)分析条件

カラムはAG1×4 (Cl⁻形) minus 400 meshの樹脂を内径6mm長さ100mmカラムに充てんし、溶離液として5×10⁻⁴Mの亜鉛を含む食塩-塩酸-酢酸ソーダ系の塩素イオン濃度のこう配溶出法を用い、60mℓ/hの流速で37°Cで溶出分離し、250, 260, 280m μ で測定記録した。その分析条件を表1にまとめた。

* 野村総合研究所 生物科学研究室

** 日立製作所 那珂工場

表1 ケト酸の分析条件

カラム: $6\phi \times 100\text{mm}$					
充てん剤: AG1 $\times$ 4 (Cl ⁻ 形) minus 400 mesh					
温度: 37℃					
溶離液組成:					
	A	B	C	D	E
NaCl (M)	0.02	0.05	0.10	0.20	0.30
HCl (N)	0.001	0.014	0.014	0.014	0.014
CH ₃ COONa (M)	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037
Zn(CH ₃ COO) ₂ (M)	5×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-4}
pH	5.7	4.5	4.5	4.4	4.4

濃度こう配法:

チェンバ	1	2	3	4	5	6
溶離液	B	C	D	D	D	D

各20 ml

カラム平衡化: A 液

分析法: グラディエント装置を使用, 70 min 後 E 液に切換える。

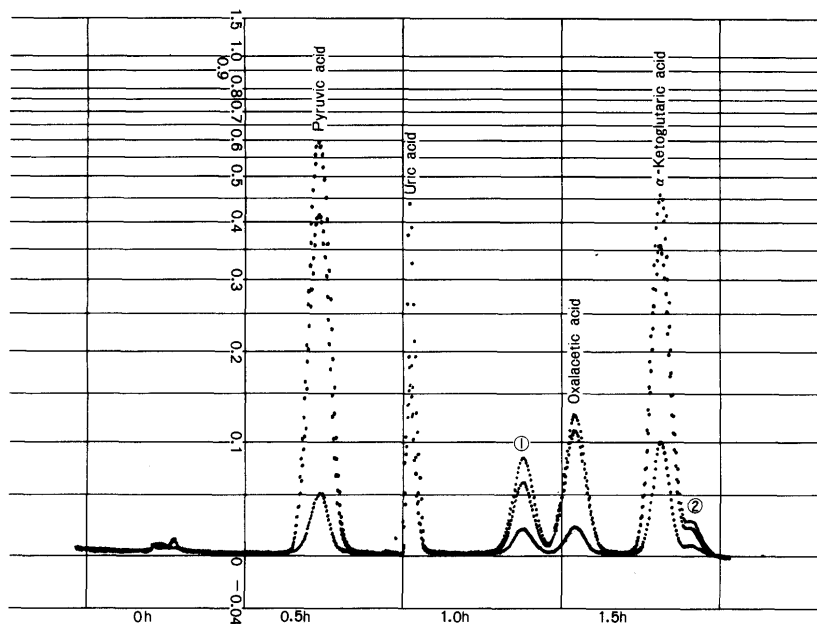
溶離液送液量: 60 ml/h

測定波長: 250, 260, 280 mμ

3. 実験結果と応用例

(1) α -ケト酸標準試料の分析例

ピルビン酸, 尿酸, オキサロ酢酸, α -ケトグルタル酸の混合試料各 1 μ mole に, セミカルバジド試薬 0.5 mℓ を加え, 37℃ で 10~15 min 間反応させたセミカルバゾン誘導体を, 表1の分析条件で得たクロマトグラムは図1に示すとおりである。

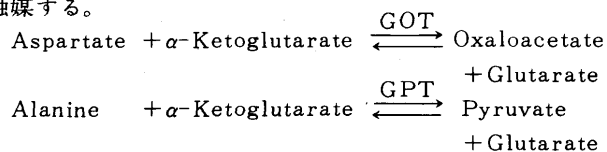
図1 α -ケト酸標準試料のクロマトグラム

この場合, ① および ② の未知ピークが現われたが, 別に個々の試料について分析した結果からピーク①はピルビン酸, ピーク②はオキサロ酢酸の異性体であることを確かめることができた。

(2) トランスアミナーゼ活性

酵素反応への一つの応用例として, トランスアミナーゼ活性の測定を試みた。この酵素はいろんな組織に分布しておりその種類も多いが, 臨床化学的意義をもつもの

としては血清中の GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase) および GPT (Glutamic pyruvic transaminase) 活性の2種で, それぞれ次のようにアミノ基転移反応を触媒する。



これらの酵素は, 心筋こうそくや急性肝炎などでそれぞれの組織が破壊されると血清中の活性は増加するので, それらの診断に利用されている。

GOT 活性は, Karmen 法¹⁾ によるとアスパラギン酸と α -ケトグルタル酸から生じるオキサロ酢酸を NADH (Reduced Nicotinamide-adenine dinucleotide) と Malic Dehydrogenase 存在下でりんご酸に変化させてこのときに消費される NADH を 340 mμ の紫外吸収で測定することができる。GPT 活性は Reitman-Frankel ら²⁾ によると, α -ケトグルタル酸とアラニンを経質として血清の GPT を作用させ, 生成したピルビン酸で活性を求める方法がとられている。

われわれは, アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸に血清の GOT を作用させたのち, セミカルバゾン誘導体としてイオン交換クロマトグラフィーで分析した。

(3) 異常血清中の GOT 活性

アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸に Hyland 社製の異常血清を作用させて, その GOT 活性を測定したクロマトグラムを図2に示した。試料は次の表2のとおりに調製した。

表2

GOT 基質 (200 mM アスパラギン酸, 2 mM α -ケトグルタル酸, pH 7.4)	
← 血清 0.4 mℓ を加えて混合	
37℃, 30分反応	
← 25% 酢酸で pH 4.5~4.8 に調整	
← セミカルバジド試薬 0.25 mℓ を加え	
37℃, 10~15 min 反応	
水 冷	
← 10% 過塩素酸溶液を滴下	
10,000 rpm, 5分 遠心分離	
上澄液	沈でん
← 水冷後 10 N KOH で pH 8	
10,000 rpm, 3分 遠心分離	
上澄液	沈でん
← 25% 酢酸で pH 4.5~4.8	
← セミカルバジド試薬 0.25 mℓ を加え	
37℃, 10 min 反応	
試料液	

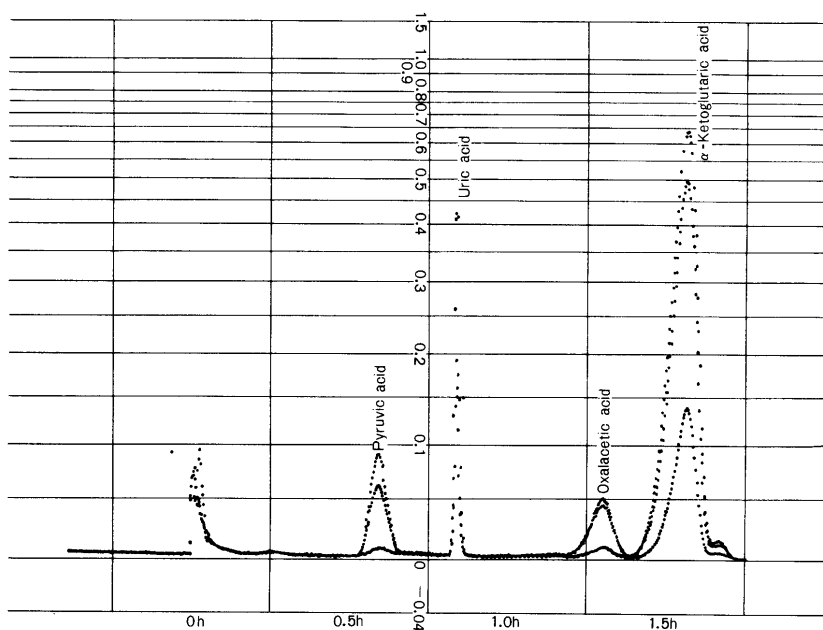


図2 異常血清中の GOT 活性を測定したクロマトグラム(分析条件は図1と同じ)

図2から GOT と基質の反応によって生成したオキサロ酢酸、オキサロ酢酸の分解によって生成したと予想されるピルビン酸、血清中の尿酸、基質として用いた α -ケトグルタル酸などが検出されたことを示している。

(4)培養液の分析例

Bacillus を下記の培地で培養し、その培養液を遠心分離で菌体などを除いた上澄み液 2 ml を pH 4.5~4.8 に調整後、セミカルバジド試薬を加えて 37°C 10 min 反応させたものを試料液とした。

培地組成	イーストエキス	0.3 %
	ぶどう糖	1.0 %
	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺	Trace

それを図1、図2と同じ分析条件で行なったクロマトグラムを図3に示した。これから、細菌の培養によって生成したピルビン酸、 α -ケトグルタル酸などが検出されたことを示している。

4. むすび

脂肪族の α -ケト酸は、セミカルバジドあるいはチオセミカルバジドを検出試薬としてイオン交換クロマトグラフィーで直接分析することができるが、オキサロ酢酸のように不安定な酸が存在する場合には、あらかじめケト酸をセミカルバゾン誘導体としてから分離するほうが適当である。

なお、この方法は、除たん白操作などを必要とする生体試料や培養液のように不純な試料の分析にも応用することができる。

参考文献

- 1) A. Karmen, J. Clin. Invest., **34**, 131 (1955)
- 2) S. Reitman, S. Frankel, J. Clin. Path., **28**, 56 (1957)

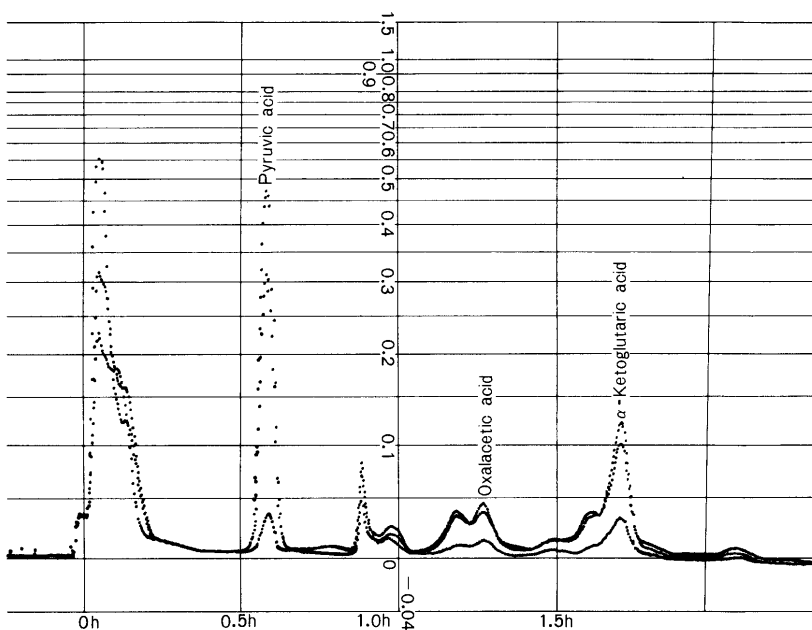


図3 培養液のクロマトグラム(分析条件は図1、図2と同じ)

KLA-3B形 日立アミノ酸分析計によるリガンド分析法

隅野 重威*

1. まえがき

アミノ酸の系統的分離分析法は、Moore, Steinら¹⁾によって、イオン交換クロマトグラフィを適用した方法が開発され、それに基づいたアミノ酸分析計が、生化学、薬学、農学、医学など広く各分野で応用されてきた。その後分析の迅速化、マイクロ化などクロマトグラフィの改善と、それに伴う分析形の改良もなされてきた。

有川ら²⁾はアミノ酸の系統的分離を迅速化するために、 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} および Co^{2+} など弱塩基性金属イオンとアミノ酸との錯化合物生成反応を利用するリガンド交換法について検討した。その結果、強酸性カチオン交換樹脂を亜鉛(Zn^{2+})形とし、亜鉛を含む酢酸緩衝液で展開すると従来のイオン交換法による分析結果と比較して、高分離・迅速分析が可能となった。このリガンド分析法をKLA-3B形日立アミノ酸分析計に適用した結果^{3,4)}についてその概要を紹介する。

2. リガンド分析法の概要

図1は、リガンド分析装置を組み込んだKLA-3B形日立アミノ酸分析計であるが、この装置はカラム構成を変えれば、従来のイオン交換分析法を行なうこともできる。

(1) プリカラム方式

たん白質加水分解物中のアミノ酸分析を行なう場合、塩基性分析は内径9mm、長さ150mmカラムで、チロシンとフェニルアラニンも分析することができるので、酸・中性分析はロイシンまで分析すればよいことになる。したがって緩衝液を切換えずに、1種類のみで分析することができる。また、リガンド法の亜鉛形カラムでは、イオン交換法のようにか性ソーダで再生することができないので、再生液をカラムに流すと、緩衝液でのカラムの平衡化に時間がかかるので、プリカラム方式を採用している。すなわち、内径9mmで長さ100mmのプリカラムと、長さ400mmのメインカラムを用い、プリカラムに添加した試料の分析を開始して、酸・中性アミノ酸グループがメインカラムに流出し、塩基性グループがまだプリカラムに残っているときにプリカラムを切りはなして、再生液でプリカラムに残っている塩基性グループを流出し、次の塩基性アミノ酸の分析中にプリカラムのみを緩衝化する方式をとった。このときの流路については、本誌「KLA-3B日立アミノ酸分析計用オートサンプラ」の項⁵⁾で述べたのでここでは省略する。

(2) たん白質加水分解物中のアミノ酸分析

酸・中性アミノ酸分析は、0.35mMの Zn^{2+} を含むpH4.10の酢酸-酢酸ソーダ緩衝液1種類で、塩基性アミノ酸分析は1mMの Zn^{2+} を含むpH5.12の酢酸-酢酸ソーダ緩衝液で分析する。再生液には0.3Mの Zn^{2+} を含むpH4.10の緩衝液を用い、さきに述べたプリカラムのみに窒素ガス加圧方式で行なうようにした。

(3) 生体液中のアミノ酸分析

尿や血清など生体試料中にはたん白質の構成アミノ酸以外のアミノ酸やその類縁化合物を含んでいるので、これらの物質の分析には、イオン交換法でも温度を切換えたりした工夫がなされている。リガンド法では、表1に示したような分析条件で、約45種類の物質の分析を8時間以内に完了することができる。

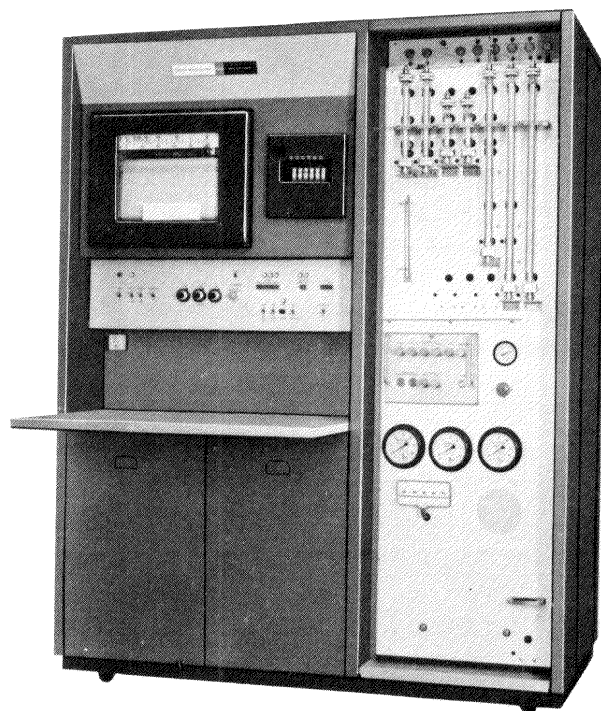


図1 リガンド分析装置付 KLA-3B形
日立アミノ酸分析計

表1 リガンド生体液の分析条件

	酸・中性分析	塩基性分析
溶離液		
pH	3.06 → 4.13	5.53→6.21→5.53
Na 濃度	0.18M	0.35M
Zn 濃度	1.60×10^{-3} M	1.0×10^{-3} M
アルコール濃度	2.5% → 0%	6.5%→10%→6.5%
ハイドロキノン	2.0×10^{-3} M	—
流速	90ml/h	90ml/h
カラム	9φ×100mm(プリカラム) 9φ×400mm(メインカラム)	9φ×400mm
カラム温度	35℃ → 65℃	65℃
分析時間	3時間20分	4時間10分

(4) ニンヒドリン試薬

金属イオンは、一般にアミノ酸のニンヒドリン発色を妨害するが、イオン交換法では溶離液にクエン酸ソーダを用いているので、これが金属イオンをマスクする役割りを果たしていた。リガンド分析法では、溶出液中にも常に一定濃度の亜鉛イオンが含まれており、イオン交換法に用いられているニンヒドリン試薬ではアミノ酸の発色率が悪くなって使用することができないので、0.5%のクエン酸ソーダを加える必要がある。しかしこうして調製したリガンド分析用ニンヒドリン試薬は通常のイオン交換法の発色試薬としても使用することができる。

3. 装置の概要

(1) リガンド連続分析用バルブ群

さきに述べたようなブリカラム方式を用いて、酸・中性アミノ酸と塩基性アミノ酸の分析を連続的に、再生・緩衝液も含めてすべて自動的に行なうための配管系をもったバルブで、ブリカラムとメインカラムとの接続や切断し、カラムからの溶出液を反応そうへ送ったり再生液を廃液そうへ流したりする流路の切換えを行なうためのリガンドバルブと、あらかじめ試料を添加しておく、酸・中性分析終了後、塩基性分析を連続的に分析できるようにカラムを自動的に切換えるためのシーケンシアルバルブをもっている。このシーケンシアルバルブは、イオン交換法による酸・中性アミノ酸分析のみの4本のカラムによるシーケンシアル分析にも利用することができる。

(2) 緩衝液切換電動弁

リガンド生体分析法では酸・中性グループも塩基性グループの分析も、それぞれ2種類の緩衝液で溶出する方法を用いるので、従来のBuffer change valveの配管を変更してポンプ1、ポンプ2とも2種類の緩衝液に切換えられるように配管を変更した。また、これによるとBUFF 3のときにはBUFF 1と同じ緩衝液が流れるようになっている。

(3) 恒温そう自動冷却用バルブ

リガンド生体液分析で、2回連続して分析する場合(この場合は2本の塩基性カラムと2本のブリカラムにあらかじめ試料を添加しておく)、塩基性分析の65°Cから酸・中性分析の35°Cに恒温そうの温度を冷却する必要がある。このため、35°Cに保っている間は水道水が恒温そうに流れ、65°Cに保っている間は水道水の流路が短絡されて流れるように、水道水の流路を自動的に切りかえるためのバルブを付けることもできるようにした。

(4) カラム構成

図2にリガンド分析用カラムの構成を示した。ブリカ

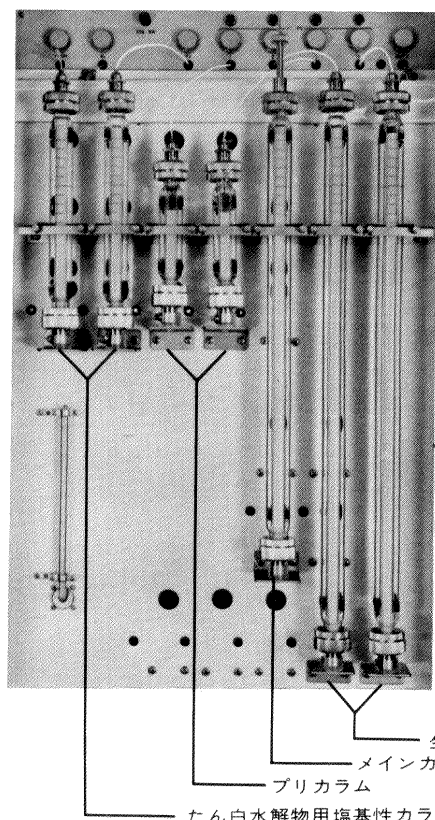


図2 リガンド分析法のカラム構成

ラムとメインカラムは、たん白質加水分解物と生体液の分析に共用し、塩基性カラムは別のものを用いる。またブリカラムと塩基性カラムがそれぞれ2本用意されているのは、あらかじめ試料を添加しておいて2回連続分析をすることができるようにしたためである。なお、表2に分析法に応じて使い分けるカラムの種類をまとめた。

表2 分析法に応じたカラムの種類

カラム	樹脂の高さ (mm)	分析法
9×150 塩基性カラム	200 ± 10	たん白加水分解物中の塩基性アミノ酸
9×400' 塩基性カラム	430 ± 10	生体液中の塩基性アミノ酸
9×100 ブリカラム	100 ± 5	たん白加水分解物中の酸・中性アミノ酸
9×400 メインカラム	450 ± 10	生体液中の酸・中性アミノ酸

4. 分析結果

(1) たん白質加水分解物中のアミノ酸分析

図3は、日立カスタム樹脂を用いて標準アミノ酸混合物を分析したクロマトグラムの一例である。この場合の分析条件を表3に示した。

表3 たん白質加水分解物中アミノ酸の分析条件

	酸・中性分析	塩基性分析
溶離液		
pH	4.10	5.12
Na 濃度	0.05M	0.90M
Zn 濃度	$0.35 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$
アルコール濃度	8.0%(エチルアルコール)	2.0%(ベンジルアルコール)
ハイドロキノン	0.011%	—
流速	90ml/h	90ml/h
ニンヒドリン試薬		
流速	45ml/h	45ml/h
カラム		
樹脂の高さ	ブリカラム 100mm メインカラム 440mm	200mm
温度	52°C	60°C
ブリカラムカット 時間	21min	—
分析時間	1 時間30分	45分

(2) 生体液中のアミノ酸分析

図4に、さきにのべた分析条件で、日立カスタム樹脂を用いて標準混合物を分析したクロマトグラムを示した。この方法によると、全分析が7時間30分で終了し、温度を65°Cから35°Cに切換える時間をいれても8時間以内で完了することができる。したがって、オートサンプラを用いると1日に3検体の分析をすることが可能である。

5. 参考文献

- 1) S. Moore and W.H. Stein, J. Biol. Chem., **199**, 663 (1951)
- 2) Y. Arikawa and I. Makino, Federation Proceedings, **25**, 786 (1966)
- 3) 有川喜次郎, 本誌11, (NO. 1) 8 (1968)
- 4) LG-3S形日立リガンド分析装置(KLA-3B形日立アミノ酸分析計用)取扱説明書
- 5) 鷹野, 大沼, 伊藤, 本誌18(NO. 2) 18 (1969)

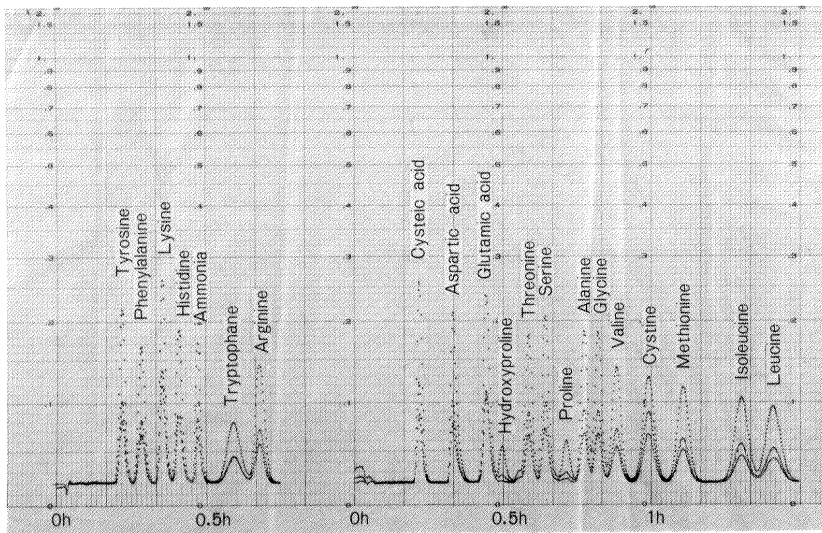
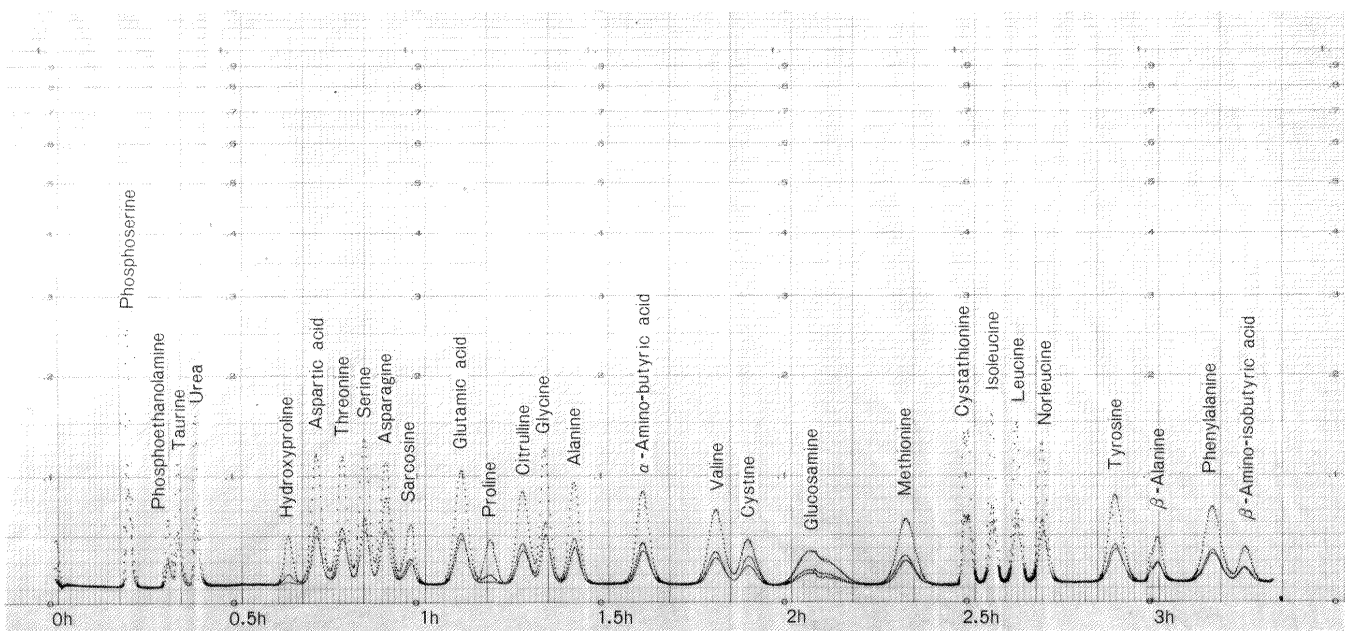
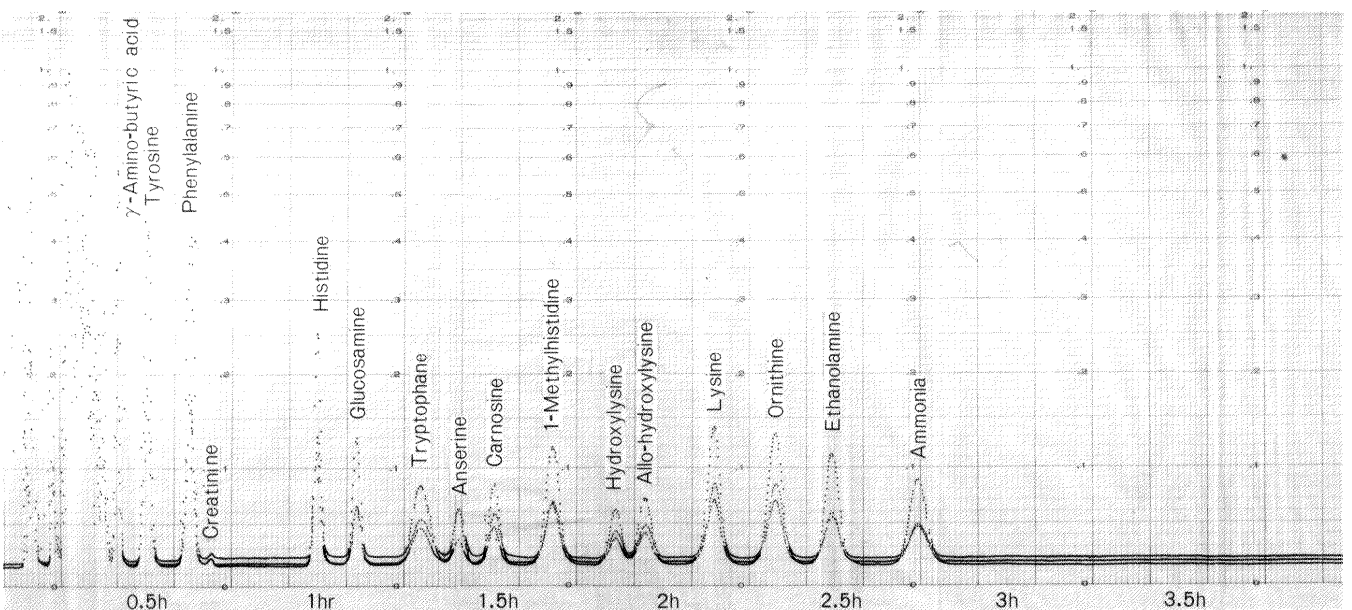


図3 標準アミノ酸混合物のクロマトグラム



A：酸・中性分析



B：塩基性分析

図4 生体液分析法による標準混合物のクロマトグラム

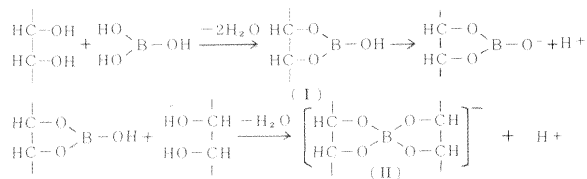
034形日立液体クロマトグラフによる糖類の分離

1. 緒言

糖類は動植物の重要な構成成分の一つであり、かつ重要な食品でもあるため、種々の分野で定性および定量分析する機会の多い試料の一つとなっている。糖類の系統的分離法として揮発性化合物への変換によるガスクロマトグラフィの応用に関する研究が近年盛んに進められているが、分子量の大きい糖に対しては限界があり、液体クロマトグラフィが再び注目を集めつつある。これまで報告されたものとしては、Khym¹⁾らによってなされたほう酸形陰イオン交換樹脂による方法、あるいはSamuelson²⁾らによる混合溶媒と架橋デキストランを用いる分配クロマトグラフィによる方法がおもな研究例である。しかし、複雑な糖類混合試料を迅速に分離定量できる条件を確立することは実用的には非常に重要であるが、そのためには分離カラムの選択性のほかカラム効率などに関し系統的検討を行なう必要がある。034形日立液体クロマトグラフ(図1)を用いて、単糖類、少糖類などの混合試料について分離条件を検討した結果、十数成分を約5時間で分離することができたのでその概要について述べる。

2. ほう酸形陰イオン交換樹脂法

糖類は弱電解質であるため(水酸基の解離定数は約 10^{-13})、強アルカリ性溶液以外ではイオンとして存在できず、したがってイオン交換樹脂に吸着されない。しかし、隣接炭素に2個の水酸基をもつグリセリンあるいはGlucose, Fructoseなどの糖類など多価アルコールはほう酸と容易に反応して、次式で示されるようにほう酸錯化合物を生成する。



このようにして生成したほう酸錯化合物(I)あるいは(II)では、ほう酸に比較して酸としての強さが著しく強められる("activation" of boric acid)。Mannitolの場合についての例を表1に示したが、ほう酸化合物の生成によって容易に解離し、陰イオンを生成することになることがわかる。このようなほう酸錯化合物生成反応は古く Bist⁴⁾により報告されており、Thompson⁵⁾らによりGlycerine添加によるほう酸の滴定などに応用された。その後Khym¹⁾らによって糖ほう酸錯化合物の生成反応は糖類のイオン交換クロマトグラフィに利用されるようになった。

糖とほう酸からの錯化合物は、5員環のフラノーズの場合2個の水酸基がシス位にあるとき最も形成されやすいとされている。したがって、糖の構造によって錯化合物の安定度あるいは化合物の酸解離度に差があるので、

有川喜次郎* 武内 静士*

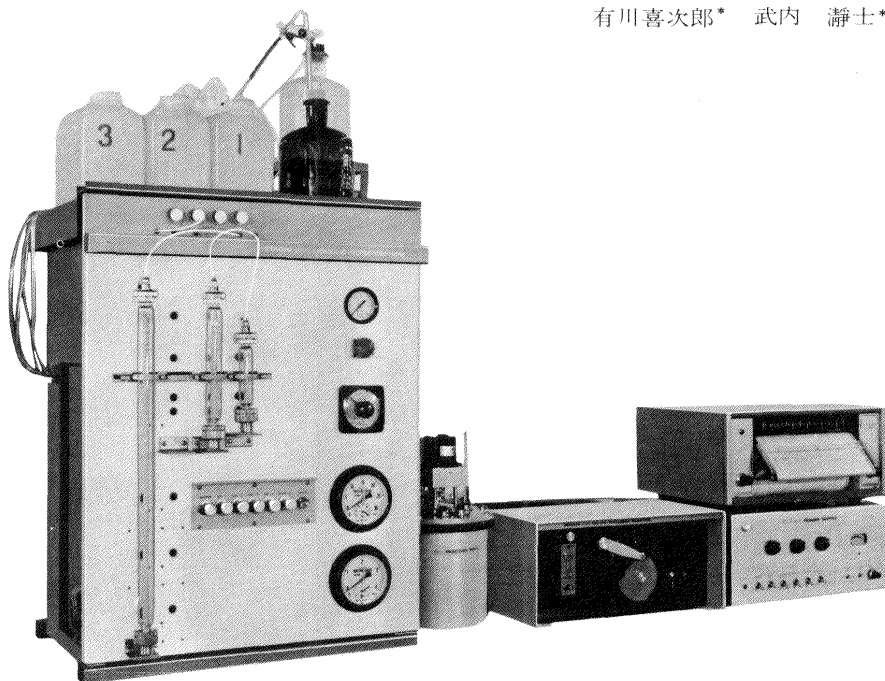


図1 034形日立液体クロマトグラフ

溶離液に用いるほう酸緩衝液の濃度、pHなどを調節することによって各種の糖類を効果的に分離することが可能である。Khym¹⁾らはほう酸形陰イオン交換樹脂を用いて数成分の糖類の分離に成功した。しかし、カラムからの溶出液を多くのフラクションに分け糖濃度を測定する方法であったため長時間を要した。その後自動液体クロマト装置を用い、さらに溶離法としてはBenson⁶⁾らはほう酸濃度、Kesler⁷⁾らは H^+ 濃度を連続的に変化するグラジェント法を用いて14成分の糖類を約7hで分離できるようにした。以下に述べる方法では操作と再現性をよくするため2種の溶離液を用いるTwo-step elution法を用いた。

表1. 酸解離定数³⁾

	ほう酸	マンニトール-ほう酸錯化合物
ka	6×10^{-10}	$6.3 \sim 8.4 \times 10^{-6}$

3. 分離条件

3.1. 交換樹脂

はじめに強塩基性陰イオン交換樹脂(Dowex 1, -400mesh)を用い、樹脂の架橋度とカラム効率との関係を検討した。

Lactoseの一定量を試料として、架橋度2%, 4%および8%樹脂について、一定溶離条

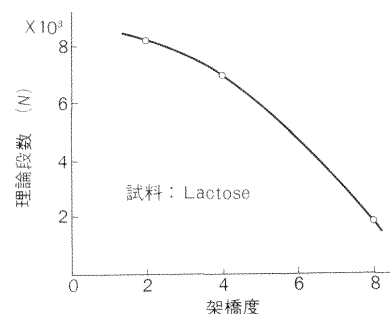


図2 樹脂の架橋度とカラム効率

Dowex-1 (-400mesh), 0.2M H_3BO_3 , pH8.5, 9mm ϕ ×55cm, 50°C, 60ml/ml

件で理論段数 (N) の変化を求め図 2 に示した。カラムは $0.9\text{mm}\phi \times 55\text{cm}$ 、カラム温度 50°C 、溶離液 ($0.2\text{M H}_3\text{BO}_3$, $\text{pH}8.5$) の流速 60ml/h における結果である。カラム効率は架橋度が高くなるほど著しく低下する。

イオン交換反応は樹脂相細孔内の拡散律速であるため、アミノ酸の場合と同様に分子サイズの大きい糖類の分離では、架橋度が著しくカラム効率に影響することが明らかである。しかし、架橋度が低下すると樹脂の膨潤、収縮が著しくなるので、取扱い上問題を生ずる。

3.2 ほう酸緩衝液

ほう酸濃度は式 (1), (2) に示したように、ほう酸錯化合物の生成に影響する重要な因子の一つである。しかし、ほう酸濃度の増加は図 3 に示すように、各糖の溶出を促進する。このような濃度範囲では糖に対して大過剰に存在することになるので、濃度の増加はほう酸錯化合物陰イオンに対して競走対イオン (Competitive counter

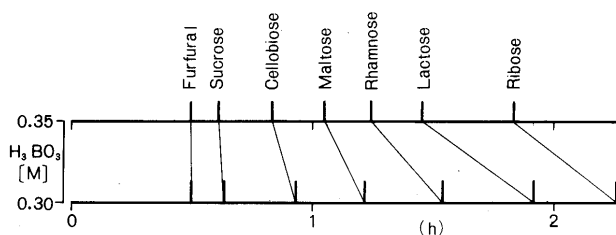


図 3 ほう酸濃度の影響

Dowex-1 $\times$ 2, $\text{pH}8.3$, 60°C , $9\text{mm}\phi \times 55\text{cm}$, 90ml/hr

ion) として作用する H_2BO_3 を増大させることになるためと考えられる。

また、緩衝液の pH はほう酸錯化合物および遊離ほう酸の解離にも影響を与える。一般に pH の増加は単糖類の溶出を促進し、2 糖類の溶出を遅らせる効果を示す。したがって、本実験では第 1 段には $\text{pH}8.2$ 、第 2 段には $\text{pH}10.0$ の緩衝液を溶離液として用いた。

4. 流路系

図 4 には糖類分離用の液体クロマト装置の流路系統を示した。溶離法としては Two-step elution 法を用いたので、2 種の溶離緩衝液 (B-1 および B-2) が電動切換弁および定量ポンプを経て分離カラムに接続されている。カラムは所要温度に保持するため恒温水が循環されている。カラム内で分離された糖はミキサーで呈色試薬と混合され、反応そうで一定時間加熱されたのち、吸光度として濃度が連続的に自動記録される。

糖の検知法としては、種々の呈色反応を用いることが

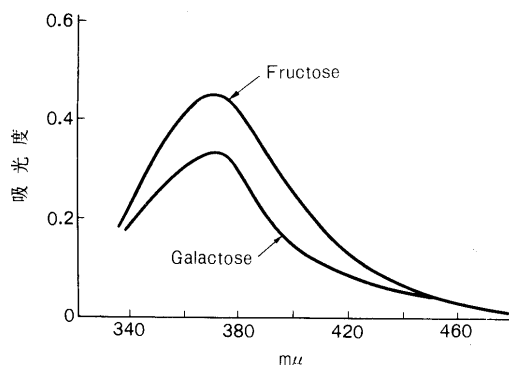


図 4 Aniline- H_3PO_4 法による糖の吸収スペクトル

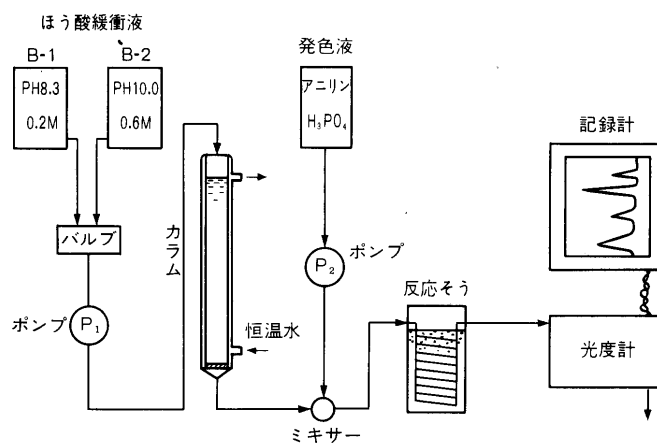


図 5 流路系統図

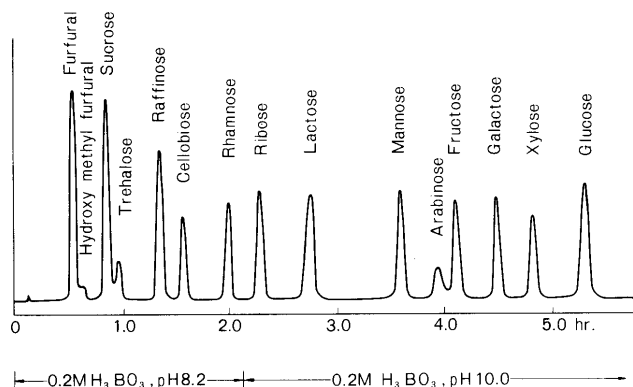
できる。Orcine- H_2SO_4 法あるいは Anthrone- H_2SO_4 法など、強酸の存在下で生成するフルフラールあるいはその誘導体と芳香族アミンあるいはフェノールと縮合させ、その吸光度を測定するものである。本法では Aniline- $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_3\text{PO}_4$ の混合試薬を用いる Walborg 法⁸⁾の改良試薬を用いた。図 5 には Fructose, Galactose との反応による吸収スペクトルで $370\text{m}\mu$ 付近に極大吸収がみられる。本波長を糖の検出に用いた。

5. 測定例

フルフラール、ヒドロキシフルフラールを含む単糖類、2 糖類および 3 糖類など 15 成分 ($6\sim 7\mu\text{mole/ml}$) を試料とした場合の分離例が図 6 である。カラムは $9\text{mm}\phi \times 56\text{cm}$ 、カラム温度 50°C で Two-step elution 法により約 5 時間で分離することができる。

6. 参考文献

- 1) J.X.Khym, L.P.Zill: J.Am.Chem.Soc., **73**, 2399 (1951); **74**, 2090 (1952)
- 2) P.Johnson, O.Samuelson: J.Chromatography, **26**, 194 (1967)
- 3) W.Treadwell, L.Weiss: Helv.Chim.Acta, **3**, 440 (1920)
- 4) J.Biot: Compt.rend, **14**, 49 (1842)
- 5) R.T.Thompson: J.Chem.Soc.Jnd.(London) **12**, 432 (1893)
- 6) J.I.Ohms, J.V.Benson: Anal.Biochem., **20**, 51 (1967)
- 7) R.B.Kesler: Anal.Chem., **39**, 1416 (1967)
- 8) E.F.Walborg, L.Christensson: Anal.Biochem., **13**, 186 (1965)



Column: $9\phi \times 55\text{cm}$, Column Temp: 50°C
Resin: Dowex1- $\times$ 4, Flow Rate: 60ml/hr .

図 6 糖類の分離例

KLA-3B形日立アミノ酸分析計用オートサンプラー

鷹野 重威* 大沼 定文* 伊藤 三男*

1. まえがき

アミノ酸は、生物の体内では、たん白質の構成成分や遊離した形として存在し、それぞれ重要な役割を果たしている。アミノ酸分析は、たん白質の構造を決定するために、たん白質を酸、アルカリ、酵素などを用いて加水分解して得られたアミノ酸を測定する生化学分野や、飲食品、医薬品、栄養剤などのアミノ酸組成を調べるために栄養化学の分野でも応用されている。さらに、尿や血清中の遊離アミノ酸の変化を調べていろいろな疾患の診断や治療の資料にしたりするために、医学の分野でも多く利用されている。

1958年 Moore, Steinらによって発表されたイオン交換クロマトグラフィによるアミノ酸の自動分析法は、このような生化学、農学、薬学、医学など広い分野で利用され、応用されてきた。はじめは約20種のたん白質構成アミノ酸を21時間もかかって分析していたが、その後イオン交換樹脂やアミノ酸分析計の改良によって、現在では普通4時間で分析できるようになり、さらに3時間-、または2時間-迅速分析法の開発によって、1日に10検体もの試料を分析できるまでに迅速化されてきた。しかし迅速分析法が開発された当初は1日に3検体の分析を行なうために、アミノ酸分析計のオペレータは、朝8時と9時半、午後3時と4時半、夜10時と11時半の6回は試料を添加するために働かなければならなかった。このため、試料の添加やカラムの切換えが自動的に行なえるように装置を改良することが課題とされていた。

日立製作所ではさらに、シーケンシャル分析装置(LS-3形)という酸・中性アミノ酸分析を4本のカラムにあらかじめ試料を添加しておいて夕方分析を開始しておく、順次カラムが自動的に切換えられる装置を開発した。

このほど、これに引続き、試料をあらかじめ試料保持管に仕込んでおいて、分析する直前にそれらの試料を塩基性と酸・中性分析用各1組のカラムに自動的に添加して、順次分析を行ない、しかもカラムの再生も自動的に行ない、塩基性分析が終了したときには先に分析した酸・中性カラムで分析が開始できるような配管系をもったオートサンプラーを開発したので、その概要を紹介する。

2. 原 理

オートサンプラーを用いて、試料が自動的に、連続的に添加されて分析される原理は次のとおりである。

(1)試料の注入 (Sample loading)

回転するターンテーブルに組込まれた24個のサンプルコイルに、注射筒を用いてあらかじめ試料を注入装着しておく。

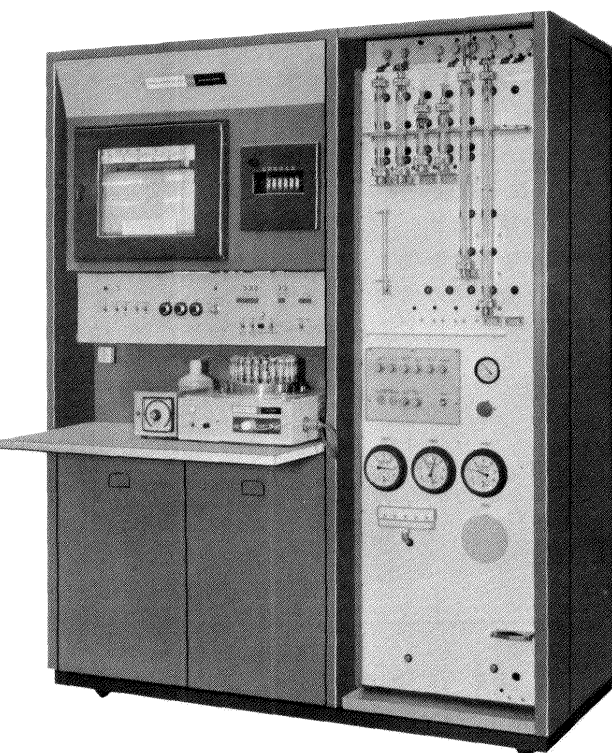
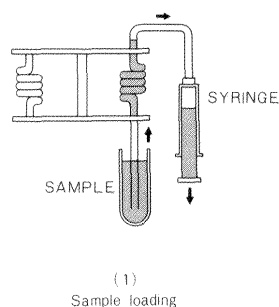
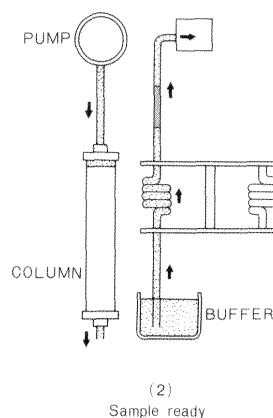


図1
オートサンプラーを付属したKLA-3B形日立アミノ酸分析計

(2)試料の吸引 (Sample ready)

サンプルコイルに保持された試料を、ポンプでサンプリング用緩衝液と一しょにいったん吸上げる。試料はサンプリング用緩衝液ではさまれた状態でテフロン管に誘導される。このときポンプから送られている溶離液は、直接カラムと接続されるように、バルブ機構によって切換えられている。



(3)試料の添加 (Sample injection)

流路切換えバルブによって、ポンプから送られていた溶離液が試料(さきの(2)の動作でテフロン管に導入された試料)を押流しながらカラム上部に添加され、分析が開始される。

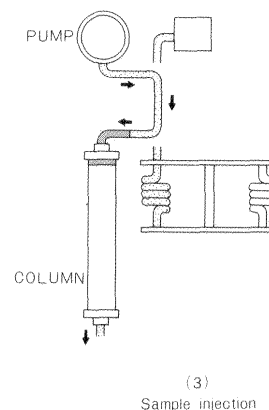
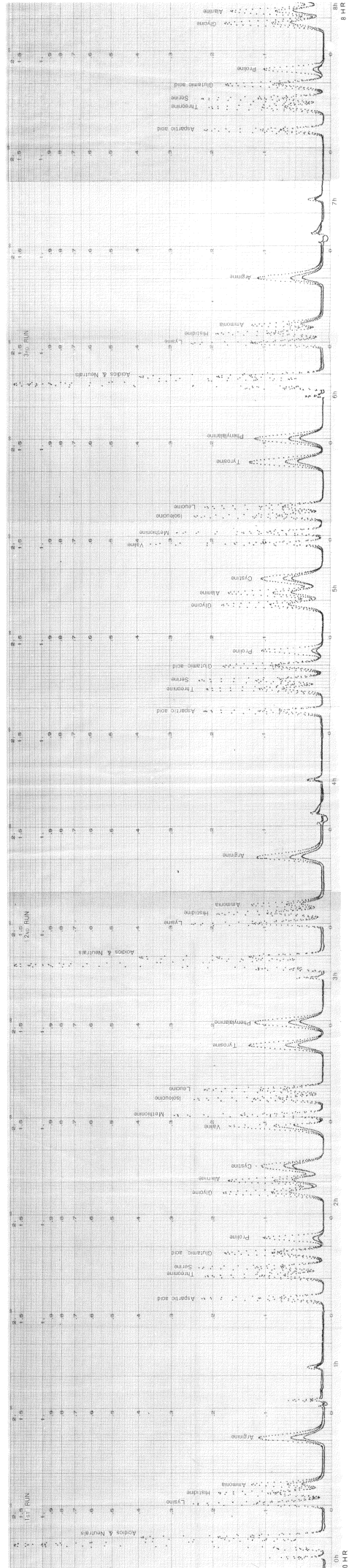
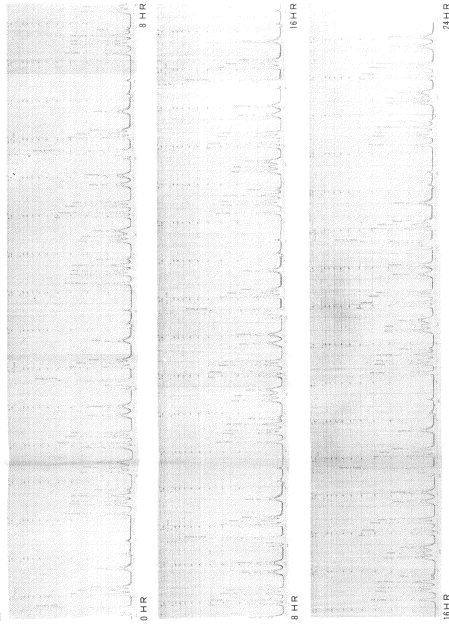
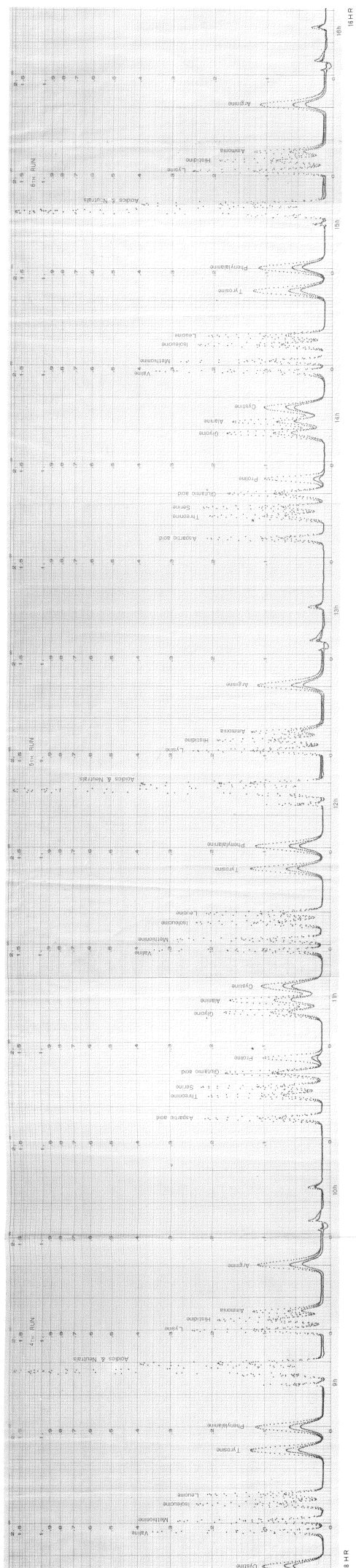
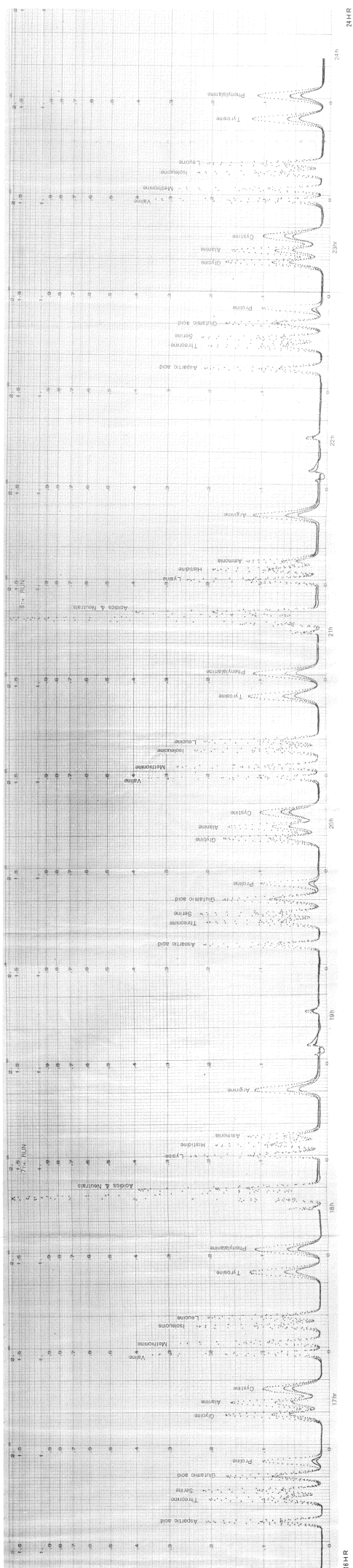


図5 オートサンプリングによるアミノ酸の分離クロマトグラム

図5-1図のオートサンプリングによるアミノ酸の分離クロマトグラム



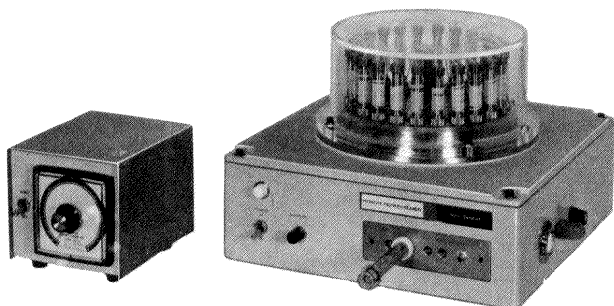


3. 装置の概要

(1) サンプルホルダ (ターンテーブル)

(Sample holder and rotary turntable)

試料をあらかじめサンプルコイルに注入、装てんしておくためのもので、1つの試料の分析が終了してカラムが切換えられると、ターンテーブルが回転して次に分析されるサンプルコイルが準備されるようになっている。サンプルコイルは内径1mmのテフロン管で内容積 $0.5 \pm 0.005\text{ml}$ に調製されたもの24個からできている。



(2) カウンタ (Counter)

サンプルコイルは合計24個（2カラム法による分析では12検体）まで装てんすることができるが、所定の数まで分析したい場合に、分析計が自動的に停止するようにするために用いる。このため分析は原則として塩基性分析から開始し、所定の試料数の分析が終ってから、試料のはいっていない緩衝液だけを塩基性カラムに添加してからニンヒドリン試薬を止め、次のカラム切換えの信号で分析計を停止させることができる。こうすることによって酸・中性カラムの再生が終了していることになり、次回からはすぐ分析が開始されるように考慮した。

(3) オートサンプラバルブ (Automatic Sampler valves)

試料を緩衝液でサンドイッチにして吸引するためのポンプ、カラムの切換えなどを行なうためのバルブ群で、従来の装置ではシークエンシャルバルブの位置に置くようにした。

(4) カラム (Columns)

オートサンプラを使用する際のカラムは、すべて樹脂床上部のスペースを少なくするようなカラムコネクタを用いる。また塩基性分析中に酸・中性分析用カラムを再生してしまうために、プリカラムを用いる方式を採用した。たん白質加水分解物中のアミノ酸を分析するためのカラム構成は次のとおりである。

9φ×100 mm	塩基性カラム
9φ×100 mm	酸・中性分析用プリカラム
9φ×400 mm	酸・中性分析用メインカラム

図3にそのときのカラム構成を示した。

(5) 付属品 (Accessory)

生体試料のように分析に長時間を要する場合には、試料が変質したり分解したりするおそれがあるので、サンプルコイルを低温に保つために冷却装置をターンテーブルにかぶせて、別に用意した冷凍機を用いて冷水を循環させて試料を安全に保つことができるような、冷却装置を付属させることもできるようにした。

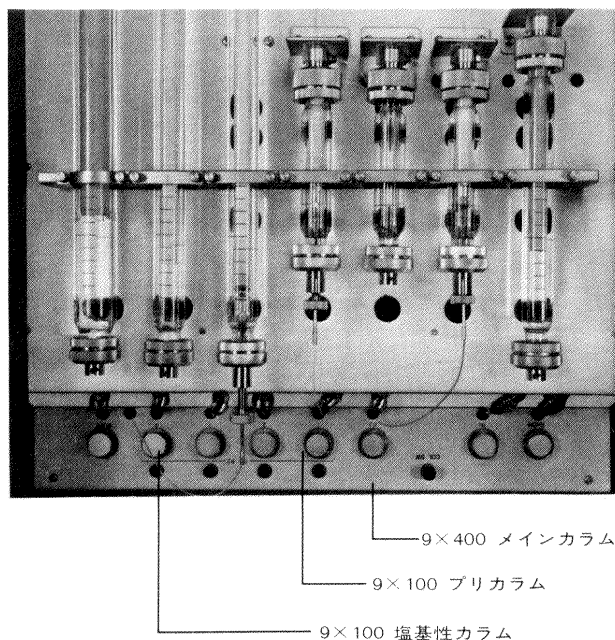


図3 カラムパネル (カラム構成の一例)

4. オートサンプラによる分析法

リガンド分析法では、再生後の緩衝化に時間がかかるので、プリカラム方式を採用してその時間短縮をはかるようにした。イオン交換法ではこの方式のほかに、通常のカラムで分析することもできる。

(1) プリカラム方式

酸・中性分析を行なう際、プリカラム上部に添加した試料を pH 3.25-buffer でプリカラムとメインカラムをシリーズに連結して分析を開始し、酸・中性アミノ酸グループがメインカラムに流出し、塩基性アミノ酸グループがまだプリカラムに残っているときにプリカラムをカットして pH 4.25-buffer を直接メインカラムに送液して分析を続けると同時に、プリカラムに残っている塩基性アミノ酸グループを 0.2N-NaOH で再生除去する方法で、その後塩基性アミノ酸の分析中に pH 3.25-buffer で緩衝化をするように、バルブの切換えによって自動的に行なわせるようにしたものである。これらの流路については図4に示した。

(2) プログラム

オートサンプラを付属させた KLA-3B アミノ酸分析計を用い、たん白質加水分解物中のアミノ酸の分析を、さきののべたカラム構成で、イオン交換クロマトグラフィによって、送液量を毎時 90ml の迅速分析を行なう場合のプログラムドラムの設定方法を表1に示した。

(3) コイル方式

酸・中性分析用カラム (9φ×500mm) の再生は 0.2N-NaOH 10ml で行なうことができるので、予め 10ml の再生液を貯めたテフロン管をカラム上部に設け、塩基性分析中にポンプを用いて緩衝液で再生液を押し流しながら再生・緩衝化を同時に行なうことができるように配管することができる。この場合のプログラムはプリカラム方式の表1と全く同じに設定すればよい。

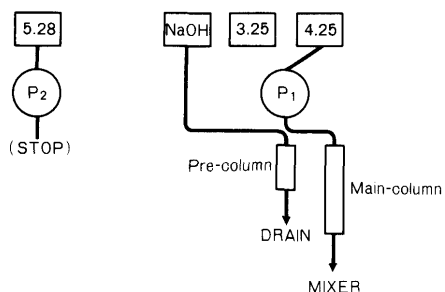
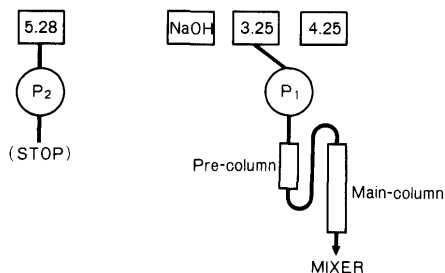
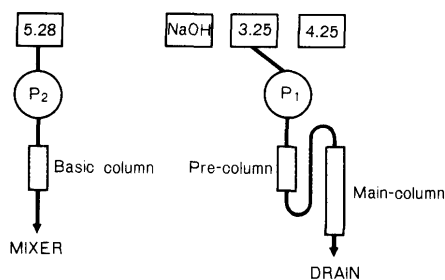


図4 オートサンプラによる分析法の流路

表2 オートサンプラによる標準アミノ酸分析データの一例

Amino acid	HW-Values					HW	Max-Min / HW x 100 (%)	$\sigma / HW \times 100$ (%)
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)			
Asp	3.4731	3.4854	3.4128	3.4615	3.4400	3.4546	2.10	0.83
Thr	3.6740	3.7022	3.6192	3.6488	3.6192	3.6527	2.27	0.98
Ser	3.7842	3.7653	3.7184	3.7464	3.7464	3.7521	1.75	0.66
Glu	3.5979	3.5875	3.5700	3.5870	3.5700	3.5813	0.47	0.33
Pro	2.1600	2.1840	2.1630	2.1630	2.0910	2.1522	4.32	1.63
Gly	3.9160	3.8988	3.8512	3.8940	3.8940	3.8908	1.67	0.61
Ala	3.8080	3.8305	3.7288	3.7366	3.7450	3.7697	2.70	1.22
Cys	3.4132	3.4112	3.3762	3.3762	3.3864	3.3926	1.09	0.58
Val	3.6480	3.6472	3.6278	3.6358	3.6432	3.6404	0.55	0.23
Met	3.6208	3.6000	3.5814	3.5968	3.6010	3.6000	1.09	0.40
Ile	3.7960	3.7926	3.7350	3.7350	3.7448	3.7607	1.62	0.82
Leu	3.7720	3.7682	3.7128	3.6960	3.7180	3.7334	2.04	0.92
Tyr	3.5880	3.5376	3.4572	3.4830	3.4816	3.5095	3.03	1.51
Phe	3.5178	3.4680	3.4338	3.4456	3.4398	3.4610	2.43	0.99
Lys	3.9176	3.9176	3.8940	3.8911	3.8701	3.8981	1.22	0.52
His	3.3936	3.3800	3.3264	3.3432	3.2886	3.3464	3.14	1.26
NH ₂	2.8435	2.8892	2.7900	2.8644	2.8200	2.8414	3.49	1.36
Arg	3.2178	3.2148	3.2585	3.2054	3.3120	3.2417	3.29	1.37

注 (1) HW: 5回のHWの平均値

(2) σ : 標準偏差

$$\sigma = \frac{\sum (HW - \overline{HW})^2}{(n-1)}$$

(3) n: 測定回数

表1 オートサンプラのプログラムの設定

BUFF 1	BUFF 2	BUFF 3	TEMP	NIN	END	塩基性カラム	酸・中性カラム
0:50		0		0:20*	0	① 分析中	緩衝化
	1:55				0:50	② —	プリカラムカット
		3:00			3:00	③ 待機	緩衝液の切換え プリカラム再生 メインカラム分析

注 (1)*: カウンタを使用する場合のニンヒドリン停止用

(2)①, ②, ③は, 図4を参照されたい

5. 分析結果

プログラムドラムの1目盛を5分, 1回転12時間すなわち4回の分析ができるようにプログラムを設定しこ、ではプリカラム方式で24時間にわたって標準アミノ酸混合物を分析したクロマトグラムを図5(別紙)に示した。

また溶離液を毎時60mlにした4-時間標準分析法(プログラムドラムを連続回転して用いるために1目盛2分すなわち1回の分析を4.8時間周期にした)による24時間に5回分析した場合のHW値を表2にまとめた。