



THE HITACHI

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

FEBRUARY 1970
Vol.13 No.1

HU-12形 日立電子顕微鏡の性能

赤堀 宏* 海野 一臣* 上野 武夫*

前号Vol.12, No.6にHU-12形日立電子顕微鏡の概要として設計上の要点を述べたが、本号では分解能を中心とした性能について実験結果をもとに報告する。

電子顕微鏡（以下電顕）の性能は主として分解能で示される。すなわち、撮影された写真上で識別しうる2点間の距離を分解能としているわけであるが、写真技術上の差を除けば電顕の総合性能を示すことは間違いない。分解能を左右する要因として電子レンズ系、主として対物レンズの球面収差、色収差、非点収差があげられるが、分解能が理論値に近づいてくると光源としての照射系の安定性が重要な役割を果たすことになる。一般に加速電圧 V が上昇すると分解能もよくなる。すなわち、理論分解能を求める式

$$d = ACs^{1/4} \lambda^{3/4}$$

は、球面収差 Cs を一定とすると分解能 d は電子線の波長 λ の $3/4$ 乗に比例することを示している。一方、波長 λ は加速電圧 V の平方根に逆比例するから、加速電圧が高いほど有利ということになる。また、加速電圧の上昇に伴って電子線の透過力が増し、試料中でのエネルギーの損失が少なくなるから、試料を透過した電子線の乱れも少なく、したがって色収差による分解能の低下が軽減される。このように考えてくると加速電圧は高いほど有利ということになるが、加速電圧の上昇に伴う不利な点も出てくる。まず、加速電圧が高くなるにしたがい高压出力の安定度を保つのに技術的制限が生じてくる。電子線発生装置としての電子銃も放電を起こさないような大きさ、構造、真空度のものでなければならない。また、電子線の透過力が増すと電子線像にコントラストがなくなるので、特に生物切片試料などには不利な現象となる。

以上の利点・欠点を勘案した結果、HU-12では最低25kVから最高125kVまでを5段階に分け、用途に応じて切換え使用できるようにした。25kVは無染色切片試料のようにきわめてコントラストのつきにくい試料を観察するのに適し、125kVは金属試料や結晶のように透過力を要求する試料に適している。生物切片でも染色法の発達でコントラストのよい試料が得られるようになり、むしろ高い加速電圧で分解能の高い写真が要求されるようになってきた。特にネガティブ染色による生物試料の場合100kV以上のほうがよい写真が得られる。25kVから125kVの範囲であれば商用電顕として信頼度の高い安定した電源が製作可能であり、加速電圧の安定度も $3 \times 10^{-4} \%$ /min

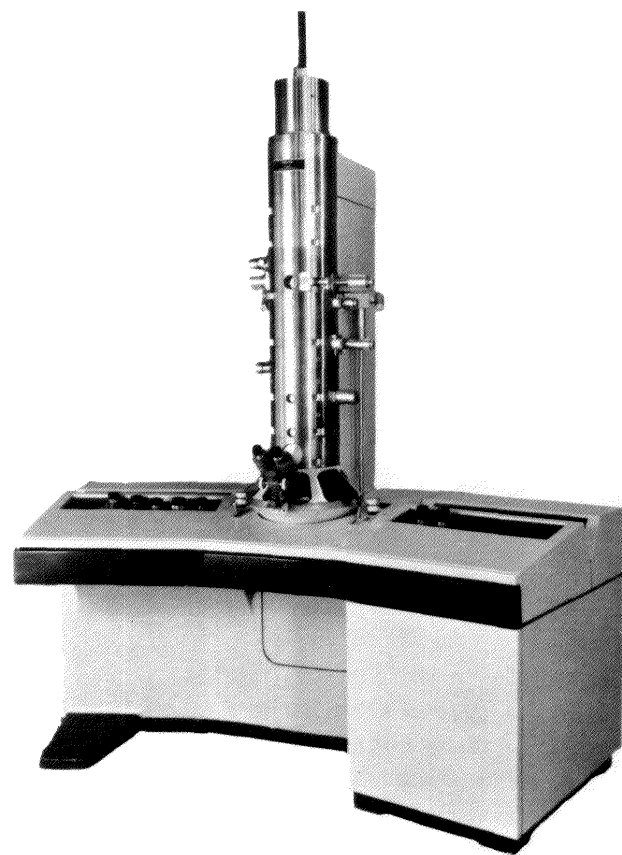


写真1 HU-12形 日立電子顕微鏡

目 次

■HU-12形 日立電子顕微鏡の性能	1
……赤堀 宏, 海野一臣, 上野武夫……	1
■356形 日立2波長自記分光光度計によるクリプトチトクロムCの低温吸収スペクトル(液体窒素)の測定……	4
……岩崎秀一, 設楽惣助……	4
■アミノ酸分析計によるアミンの分析	6
……波多野博行, 村上文子……	6
■ガスクロマトグラフィのベンゼン代謝研究への応用	9
……野見山一生, 野見山紘子……	9
■K53形 日立ガスクロマトグラフによる人工甘味料チクロおよび合成保存料の分析……	10
……五十嵐日出夫……	10

に入れることができる。

写真の解像度を上げるには、試料を照射する電子線の質がよくなければならない。質のよい電子線ということは速度の一定した平行に近い電子線ということで、光にたとえば、レーザ光線のように平行な干渉性のよい電子線ということである。電子線の場合は点光源に近づけることで、ポイントフィラメントがこの目的に適している。ポイントフィラメントを有効に使うには、フィラメントは直流加熱とし、ウェネルト円筒には安定な高いバイアス電圧が印加されなければならない。バイアス電圧としては、電子流を利用した自己バイアス方式と別電源より供給する固定バイアス方式とがある。自己バイアス方式は簡便であるが、電子線量によってバイアス電圧が左右され、特にポイントフィラメントのように数 μA 以下で使用する場合には必要なバイアス電圧が得られない。HU-12では自己バイアスは安全抵抗程度に止どめ、別の定電圧発生装置によって安定化されたバイアス電圧を供給している。ポイントフィラメントの場合はバイアス電圧を微細に調節する必要があるので、数ボルトから1,500Vまで連続に調節できるようにしてある。写真2はポイントフィラメントによる電子線の干渉性を示す写真で、数十本のフレネル縞が観察される。このフレネル縞は不足焦点の状態での約1分間の露出によって得られたもので、加速電圧が変動しては得られない。

このような照射系が収差の少ない結像レンズ系と組み合わせられて始めて高分解能が保証される。HU-12の結像系は4段拡大方式を採用し、各収差が最小になるような組み合わせで使用するようになっている。レンズ励磁電流の安定度は対物レンズを $1.5 \times 10^{-6}/\text{min}$ とし、他はいずれも $5 \times 10^{-6}/\text{min}$ の高安定度に入れている。総合的安定度を示す例としてカーボン薄膜の同一視野連続撮影による分解能写真を示す。写真3は100kVの場合、写真4は125kVの場合で、撮影倍率はいずれも直接50万倍、露出時間6秒、撮影間隔20秒である。数 $\text{\AA}$ 以下の同じカーボン粒子が4枚の写真上に撮影されていることがHU-12の高分解能安定性をはっきり示している。勿論、電顕としては低倍率に於ける解像度も保証されなければならない。写真5は直接倍率5,000倍の神経細胞切片写真の一部を10倍に引伸した例で、シャープなMYELIN構造が可視化されている。

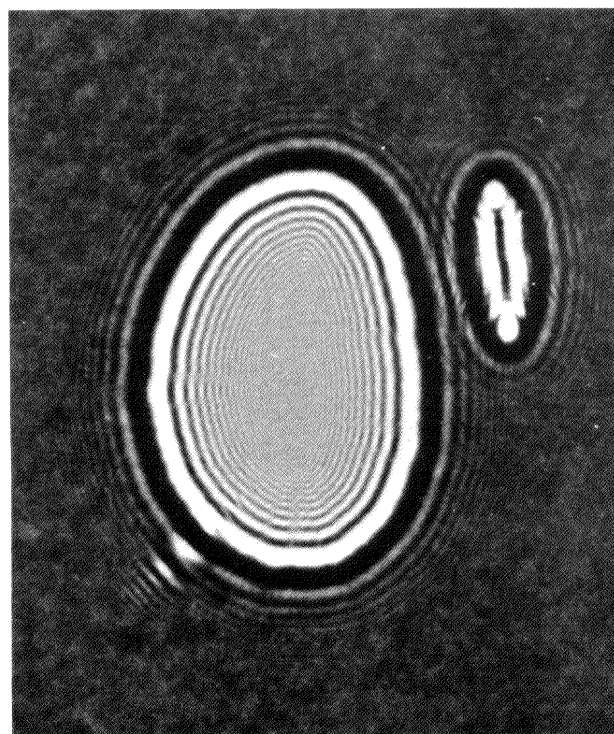
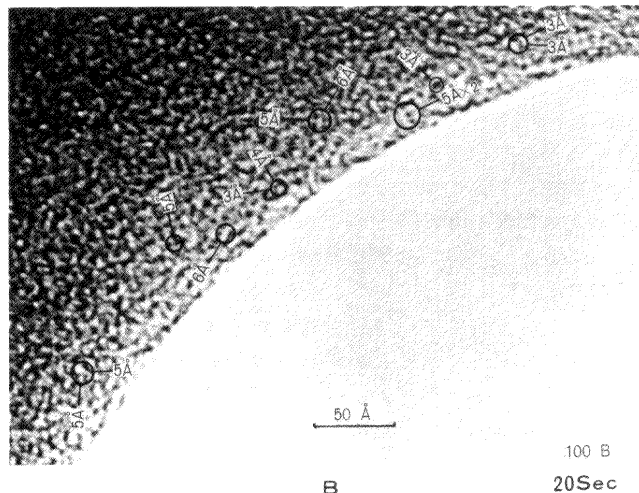
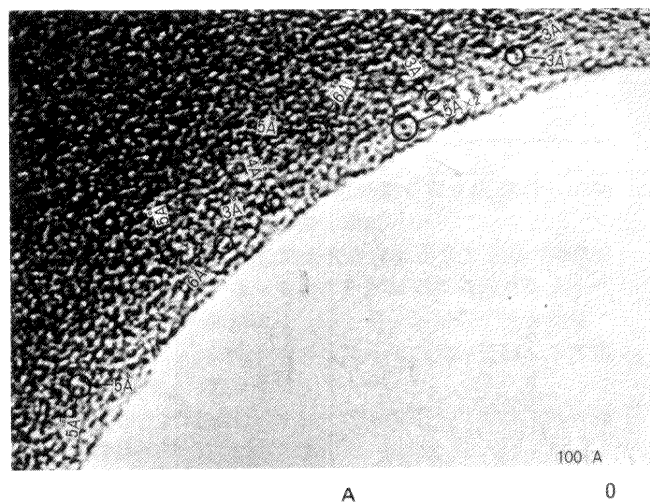


写真2 ポイントフィラメントによるフレネル縞



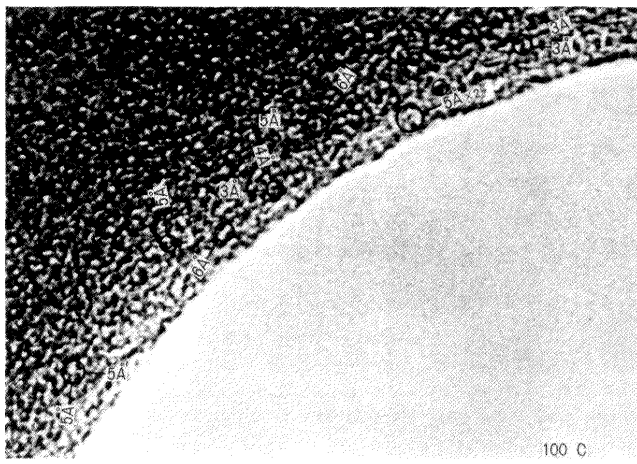
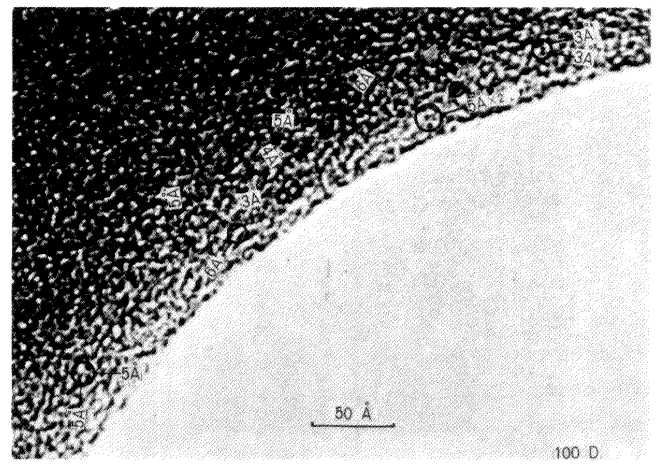
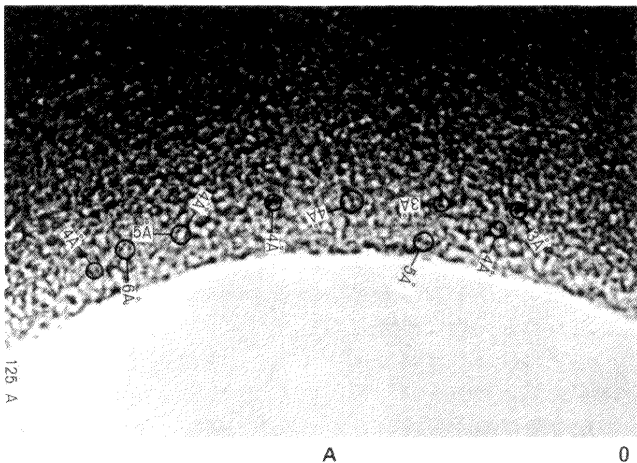


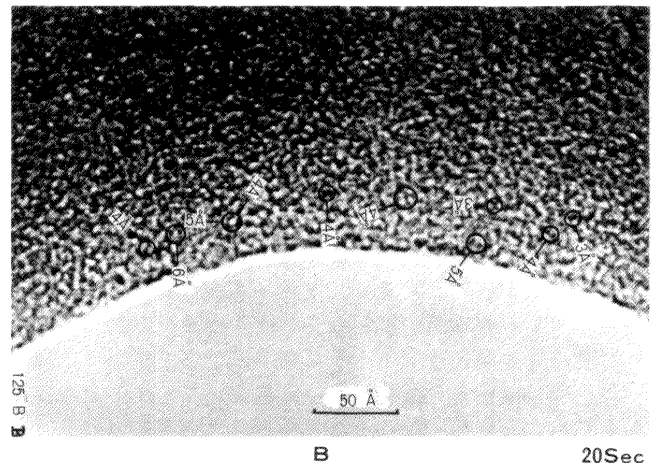
写真3 加速電圧：100kV 撮影倍率：50,000X



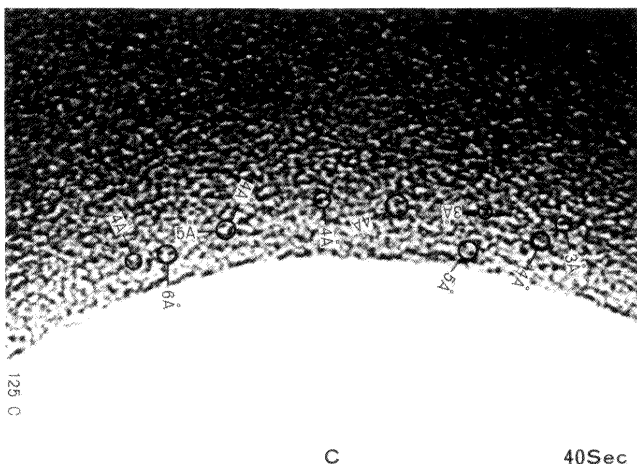
D 100 D 60Sec



A 0

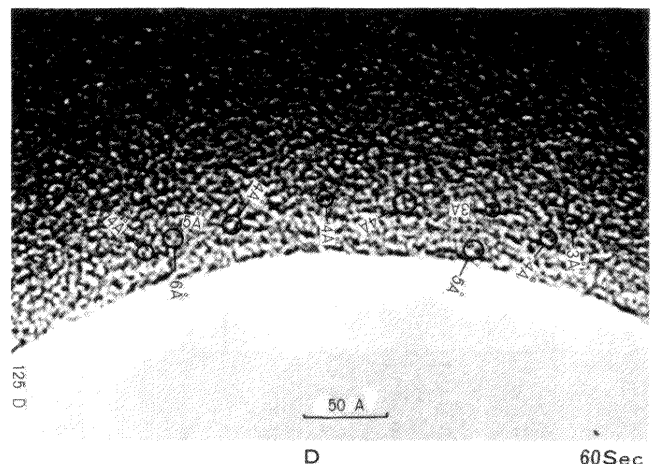


B 125 B 20Sec

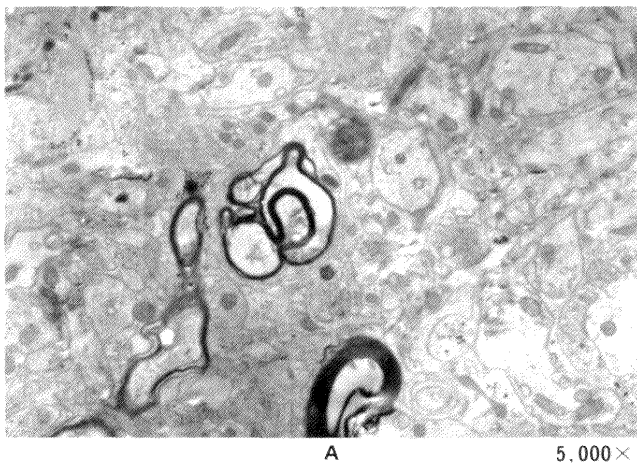


C 40Sec

写真4 加速電圧：125kV 撮影倍率：500,000X

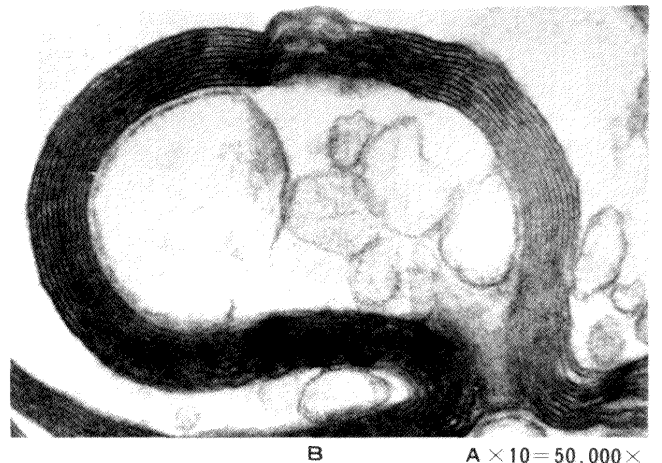


D 125 D 60Sec



A 5,000X

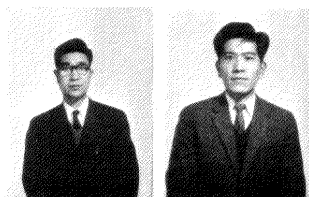
写真5 低倍率に於ける解像度 加速電圧：100kV



B A X 10 = 50,000X

356形 日立 2 波長自記分光光度計による クリプトチトクロムCの低温吸収スペクトル(液体窒素)の測定

クリプトチトクロムCは、通性嫌気性菌、*Pseudomonas denitrificans*の嫌気・好気培養菌の粗抽



岩崎 秀一 設楽 惣助

出液の可溶性分画から結晶化される。¹⁾クリプトチトクロムCが鋭い α 、 β -吸収帯をもつと異なって、ヘモグロビン形の吸収スペクトルをもつヘム蛋白質で、1モル蛋白あたり2モルのヘムをもち、銅は含まない。ヘミンはアセトン-塩酸処理で分割されず、ピリジンヘモクロムは521、550m μ に吸収ピークを示すのでC形チトクロムに属するが、酢酸酸性で銀塩または水銀塩処理をした場合、チトクロムCを100%とすると、1モル蛋白あたり2モルのヘミンとした理論量の30%しかヘマトヘミンが得られない。このことはクリプトチトクロムCの2つのヘミンは、一方あるいは両者ともCヘミンと異なっていることを示すものかもしれない。このヘム蛋白の低温吸収スペクトルを測ることは興味のあることと思われるので、356形日立2波長自記分光光度計を用いて実験を行なった。

実験

装置・方法は、小森・黒石によって示されたものを用いた。²⁾

試料は*Pseudomonas denitrificans*の嫌気培養菌から結晶化されたクリプトチトクロムCを再結・脱塩後、凍結乾燥したものを使用した。pH6.6でのディスク電気泳動

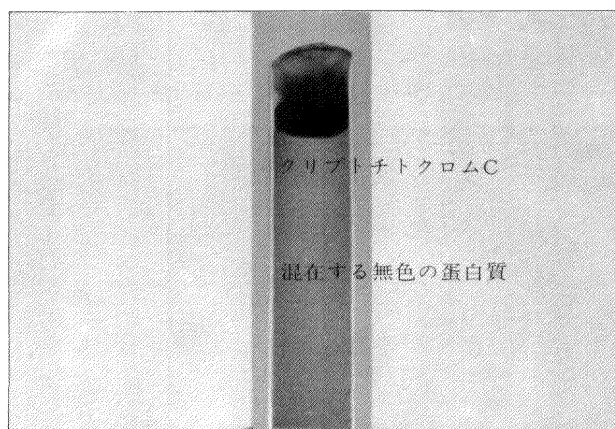
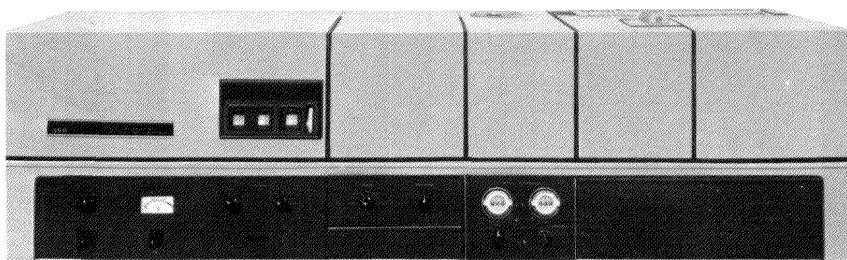


図1 クリプトチトクロムCのディスク電気泳動図

100 μ gのクリプトチトクロムCを内径5mmのガラス管内に調製したpH6.6用アクリルアミドゲルに加え、室温で1本あたり2.8mAの電流を流した。70分後に泳動を止め、アミド・ブラックで染色し、7%酢酸溶液で洗って余分のアミド・ブラックを除いた。

* 名古屋大学 理学部 生物学教室



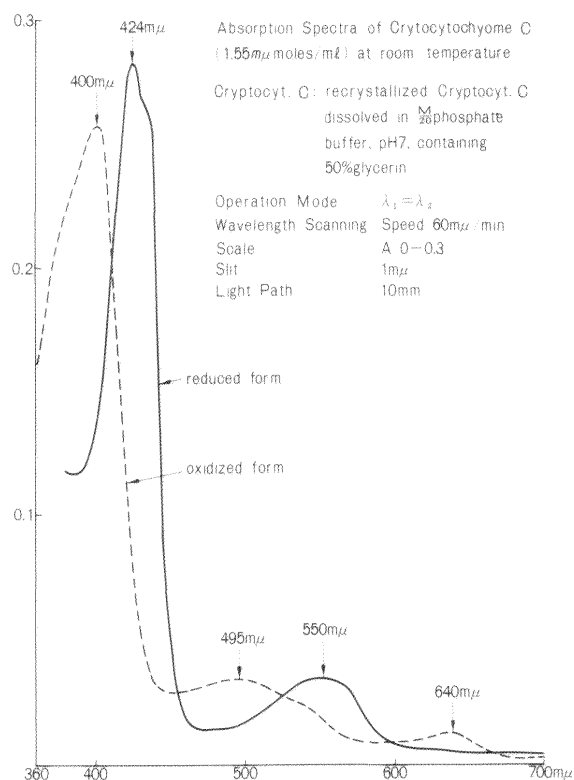
356形 日立 2 波長自記分光光度計

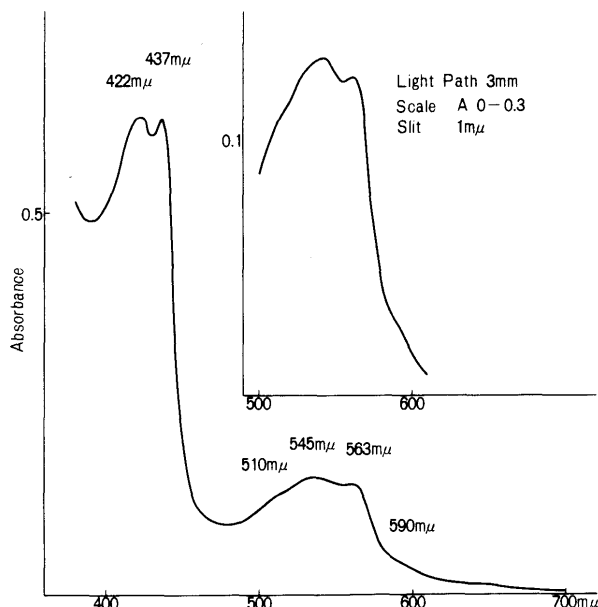
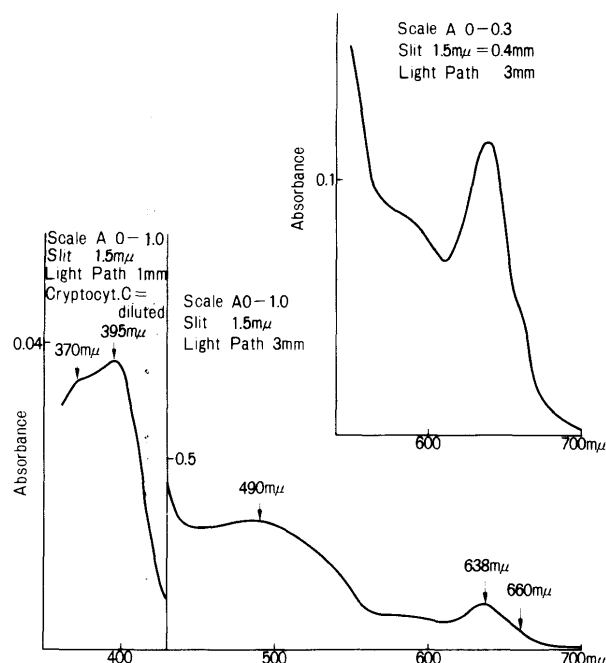
動で調べた純度は97~98%以上と思われる。図1にディスク電気泳動の結果を示す。

その適量を50%グリセリンを含む $\frac{M}{20}$ pH7のりん酸緩衝液に溶解した後、液体窒素で氷結させ、デューワーより取出して、60W白熱ランプで温め、氷の微結晶を生成させて測定に供した。還元形dithionite添加により還元されたものを同様に処理した。

以下の図はいずれもベースラインを補正した結果を示す。

図2に50%グリセリンを含む $\frac{M}{20}$ pH7のりん酸緩衝液に溶解したクリプトチトクロムCの常温での吸収スペクトルを示す。図で明らかなように、酸化形は400、495および640m μ にピークをもち、400m μ のピークはより短波長側に肩をもつ。還元形はSoretピークに明白な肩が見



Absorption Spectrum of Reduced Cryptocytocchrome C
(0.775 $m\mu$ moles/ $m\ell$) at 77°KCryptocyt. C: dissolved in $\frac{M}{20}$ phosphate buffer, pH7, containing
50% glycerinLight Path 3mm Scale A 0-1.0 Slit 1 $m\mu$ = 0.25mmAbsorption Spectrum of Oxidized Cryptocytocchrome C
(0.775 $m\mu$ moles/ $m\ell$) at 77°KCryptocyt. C: dissolved in $\frac{M}{20}$ Phosphate buffer, pH7,
containing 50% glycerin

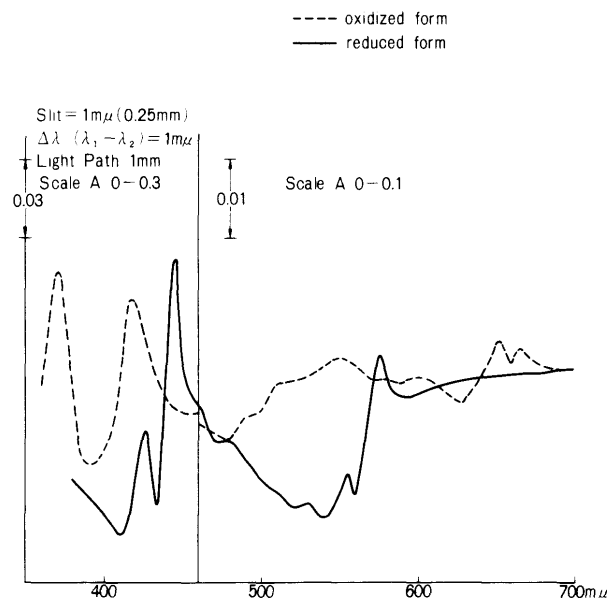
られ、 α -, β -ピークは区別されず、ゆるやかな1つの山になっている。640 $m\mu$ のピークは還元によって消える。

図3には77°Kでの酸化形クリプトチトクロムCの吸収スペクトルを示す。395, 490, 638 $m\mu$ の各ピークは、明らかに常温酸化形の各ピークより短波長側にずれ、370, 660 $m\mu$ には明らかに肩が見られる。なおSoretピークは試料を適当に薄めて液層1mmでの測定を図に示した。使用された実験条件のもとでは、常温の同じ液層に比べて、430~700 $m\mu$ の範囲では38倍の吸光度の増加が得られた。比 $\frac{A_{495m\mu}}{A_{640m\mu}}$ も2.9~3.0で常温の場合と変わらなかった。

図4には還元形の低温吸収スペクトルを示す。常温スペクトルと比べて、Soretピークが422 $m\mu$ と437 $m\mu$ の2つの山になってはっきり現われている。また、545 $m\mu$ と563 $m\mu$ にはっきりピークが見られ、563 $m\mu$ の吸光度は545 $m\mu$ のそれよりもやや低い。このほか、510 $m\mu$, 590 $m\mu$ に肩が少し現われている。吸光度の増加は、液層3mmの場合、常温の同じ液層に比べて、Soretピークでは20倍、500~600 $m\mu$ では40倍の値が得られた。

図5には微分スペクトルを示すが、分離の状態が明らかに観察される。

1st Derivative Spectra of Cryptocytocchrome C at 77°K

Cryptocyt. C: dissolved in $\frac{M}{20}$ phosphate buffer, pH7, containing
50% glycerin

参考文献

- 1) Suzuki, H. and Iwasaki, H., J.Biochem., **52**, 193 (1962)
- 2) Iwasaki, H. and Shidara, S., Plant and Cell Physiol., **10**, 291 (1969)
- 3) 小森律夫, 黒石忠夫, : The Hitachi Scientific Instrument News, **12**, No.3 (1969)

アミノ酸分析計によるアミンの分析

波多野博行* 村上 文子*

アミノ酸分析計は、周知のとおり、ニンヒドリン発色による光電比色検知法を用いているから、アミノ酸だけではなく、一般にニンヒドリン反応陽性物質はすべて分析の対象となりうるものである。ニンヒドリン反応については、ニンヒドリンがかなり強い酸化剤で、単にアミノ基を有する化合物だけではなくそれ以外の化合物をも酸化するので、その生成物や反応機構が明らかになっていないとはいえない。ニンヒドリンはアミノ酸と反応していわゆる Ruheman purple といわれる紫色の色素を生成するが、その他の物質を酸化すればいろいろな色調の酸化物を生成する。従来はこの反応によって生成した呈色物質を混合物のままで検知し、570m μ 、440m μ あるいは640m μ で測定してきた。このことは、普通のアミノ酸以外のニンヒドリン反応陽性物質のクロマトグラムの解析に際して、特に定性的に有効に利用されてきた。

これらのニンヒドリン反応陽性物質の分析法に関しては、約50種に及ぶ生体液に含まれる化合物の分析法が¹⁾すでに報告されているので、アミンの分析についてもこの方法に従えばよいのであるが、アミンだけについていえばさらに簡便な分析法が確立されることが望ましい。ここに述べる分析法²⁾はアミノ酸分析計を用いて、アミノ酸分析を行なう条件に最少限の改変を加えるだけで、約16種のアミンをできるだけ簡単迅速に、かつ正確に分析する方法である。天然物中にはここに掲げる16種のアミンが同時に存在するようなことはほとんどないから、対象となるアミンが限定されればこの方法はさらに簡単迅速に行なわれることとなろう。

アミン分析法

(1) 標準試料の調製

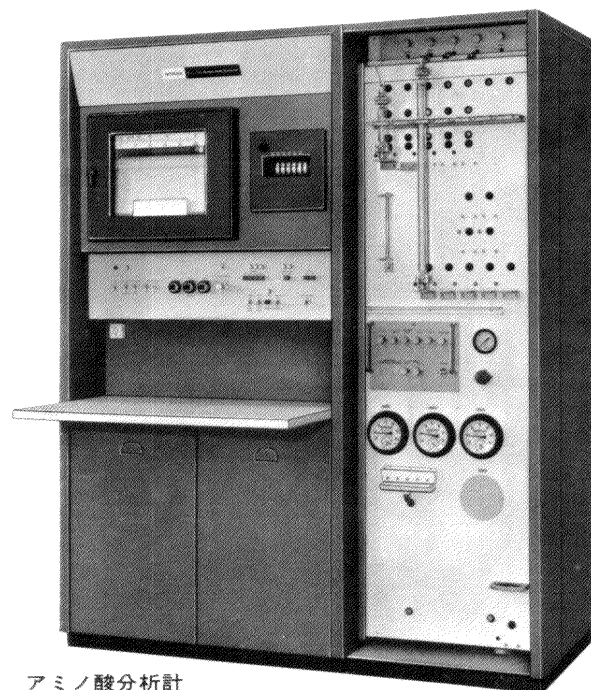
メチルアミン・エチルアミン・アリルアミン、n-プロピルアミン、iso-ブチルアミン、n-ブチルアミン、1,2-プロパンジアミン、ヒスタミン、iso-アミルアミン、n-アミルアミン、チラミン、プトレシン、フェネチルアミン、カダベリン、ヘキサメチレンジアミン

以上のアミンは濃度0.02Mの0.01N塩酸溶液とし、セロトニンだけは濃度0.005Mの0.01N塩酸溶液とする。

これらのアミン試料を0.5 μ mol（ただし、セロトニンは1.0 μ mol）添加すれば、本法の条件下で各ピークの高さは適当な吸光度を与えることとなる。試料の添加容量は1mlをこえないことが望ましい。

(2) 腐敗魚肉のアミン試料の調製

魚のミンチ肉約10gを10mlの蒸留水に浸し、28°Cに調節した孵(ふ)卵器に入れて一昼夜放置して腐敗させる。腐敗液を2,000rpmの遠心分離器で10分間遠心分離し、上澄み液をうる。このとき生じた沈殿に10mlの蒸留水を加え再び遠心分離し、その上澄み液を前回のものに加える。この液に30mlの85%エタノールを加え、沈殿を遠心分離して除いた後、上澄み液を約10mlにまで濃縮する。



アミノ酸分析計

この液に50mlの1%ピクリン酸溶液を加えて除蛋白する。Dowex 2 $\times$ 8 Cl⁻形樹脂でピクリン酸を除いた後減圧濃縮し、最後にpH2.2の0.2Nクエン酸緩衝液を加えて10mlに定容する。この定容した試料溶液については、アミノ酸分析計のカラムに添加する前に、あらかじめニンヒドリン発色テストを行なって、クロマトグラムの記録に適当な試料の量を検討しておく。

試料濃度を推定するには、試料溶液0.1mlを試験管に取り、蒸留水2.0mlを加える。これにニンヒドリン試薬1.0mlを加え、100°Cで15分間加熱して発色させる。冷却後蒸留水で25mlに定容する。これを570m μ において光電比色する。同時に、1 μ molに相当するロイシンについても同様の発色を行ない、試料中のアミンの量をロイシン値として計算する。分析に最も適当な試料濃度は各アミンが0.2~0.8 μ mol ずつ含まれる程度であり、たとえば、腐敗魚肉中には普通約5種類のアミンが存在するとすれば、ロイシン値がこの条件で吸光度約2程度になる量を添加すればよい。

(3) アミン分析用イオン交換樹脂とカラムの調製

アミネックスA-4（スルホン化スチレンジビニルベンゼン共重合体、架橋度8%）米国バイオラド社製、球状樹脂平均直径17 $\pm$ 2 μ のものが適当である。この樹脂は2N水酸化ナトリウムと2N塩酸を用いて洗浄を繰返し、洗浄液がニンヒドリン反応陽性物質を含まないようにするまで洗浄しておく。

カラムは0.6 $\times$ 15cmのものをを用い、カラム温度50°Cで樹脂を12cmにつめ、pH5.28に完全に緩衝化しておく。

(4) 溶出液の調製

必要な試薬：クエン酸ナトリウム、ほう酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、ベンジルアルコール、塩酸、水酸化ナトリウム、塩化ナトリウム

以上いずれも市販特級品を用意する。

溶出液の組成：表1にその種類と組成を掲げる。

表1 溶出液の種類と組成

Buffer system	Conc. N	Conc. of benzyl alcohol %	pH	Ionic strength of sodium ion M
I Sodium citrate	0.116	—	5.28	0.35
II Sodium borate	0.025	0.5	8.02	0.60
1 Sodium borate	0.05	0.4	10.00	0.60
III 2 Sodium salicylate	0.20	—	11.50	0.65
3 Sodium salicylate	0.20	—	12.50	0.70

〔調製に際しての注意〕

- (1) pHは6 N塩酸溶液あるいは6 N水酸化ナトリウム溶液で調整する。
- (2) イオン強度は塩化ナトリウム溶液で調整する⁵⁾
- (3) ベンジルアルコールはテーリングを防止しピークの分離をよくするために加える。このためにニンヒドリン発色を妨害することはないことが確かめられている。

(5) ニンヒドリン試薬の調製

ニンヒドリンとメチルセロソルブの純度などに関する試薬購入および使用上の諸注意はアミノ酸分析法⁶⁾の場合と全く同様である。メチルセロソルブ1.5 lと4 N, pH 5.51の酢酸緩衝液0.5 lを加えて高純度(99.9995%以上)の窒素ガスを15分間通じる。このメチルセロソルブ-酢酸緩衝液に40 gのニンヒドリンをすばやく加える。さらに窒素ガスの通気を続けて完全にニンヒドリンを溶解させた後、0.76 gの塩化第一すずを溶解させて液が透明な赤色になるのを確かめる。調製後は加圧用タンクに窒素ガスを満たし、試薬が空気に接触するのを防ぐ。調製した2%ニンヒドリン試薬を等容の溶出液と混合することになるので、発色時のニンヒドリンの濃度は1%を維持することとなる。普通のアミノ酸分析の場合は、1容のニンヒドリン試薬が2容の溶出液に添加されることとなるので0.67%であるのに対して、この濃度は約1.5倍の濃度である。アミンのニンヒドリン発色に際しての再現性と定量性とをよくするために、この程度の高濃度が必要である。

(6) 分析計とグラディエント溶出装置

KLA-3形日立アミノ酸分析計を用いる。この分析計は570m μ と440m μ のほかに640m μ で比色することができるので、3波長における吸光度比は後出の表2に示すようにアミンの定性的同定にも役立つ。

グラディエント溶出のためには、市販のグラディエントチェンバを用いてもよいが、200ml容のエーレンマイヤーフラスコを3個連結した手製のものでもよい。この場合には各フラスコにソーダライム管を取付けて空気中の炭酸ガスのためにpHが変わるのを防ぐこと、および各フラスコにマグネティックスターを用いて完全にかくはんして再現性のよいpHグラディエントが得られるように配慮することが必要である。連続流通式pH計を用いてpHをモニターしておくともよい。

(7) 溶出と発色の操作

表1に示した溶出液のうちIとIIは溶出開始後70分で切替える。同じくIIとIIIとはさらに150分溶出を続けた後で切替える。IIIの各溶出液は、それぞれ120mlずつ用いてグラディエント溶出を行なう。

流速は溶出液もニンヒドリン試薬もいずれも同じで毎時30mlとする。カラム温度は50°Cに保つ。

ニンヒドリン発色には普通のアミノ酸の場合と異なり100°Cで正確に11分15秒間反応させる。

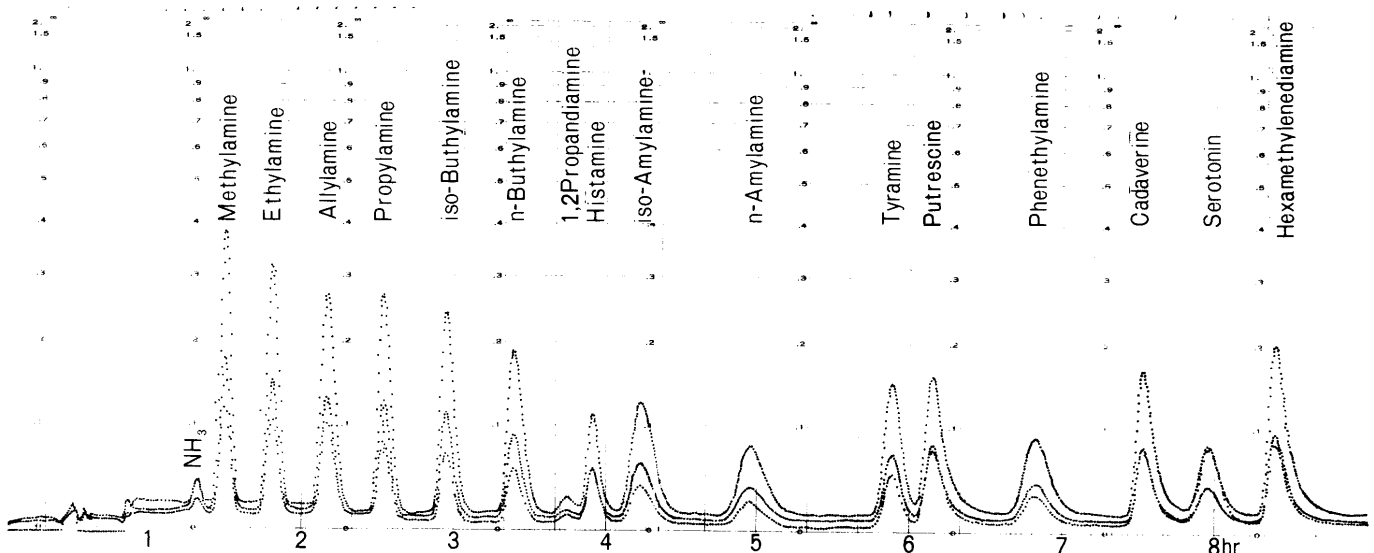
記録は打点間隔5秒で毎時7.5cmのチャートスピードで570、440、640m μ で打点記録する。比色におけるキュベットの光路幅は2mmである。

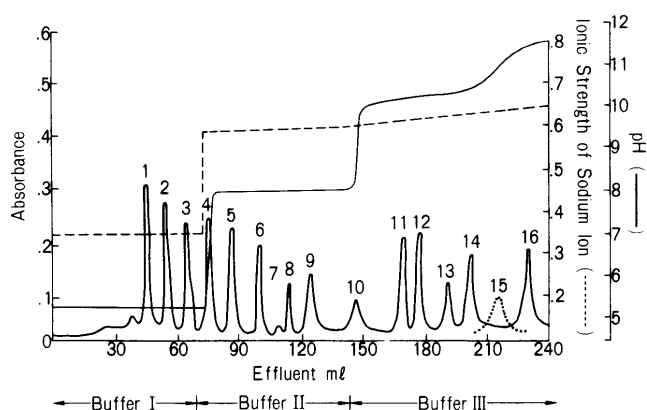
(8) 標準試料(16種のアミン混合液)のクロマトグラム

前記16種のアミンの混合物を試料として本法を用いて分析した結果を図1に示す。実際のチャートは写真に示すとおりである。図1のピークの番号は注記のとおりで、セロトニンだけは1.0 μ molで他はすべて0.4 μ molである。

すべてのピークは570m μ で記録した場合であるが、セロトニンだけは440m μ で測定したものである。

この結果からわかるとおり、緩衝液Iではメチルアミン、エチルアミン、アリルアミンの3種の脂肪族アミンが溶出され、緩衝液IIではn-プロピルアミン、iso-ブチルアミン、n-ブチルアミン、1,2-プロパンジアミン、ヒスタミン、iso-アミルアミン、n-アミルアミンの7種の脂肪族モノアミンおよびジアミンが溶出される。最後のグラディエント緩衝液IIIではチラミン、プトレシン、フェネチルアミン、カダベリン、セロトニン、ヘキサメチレンジアミンの6種の異環環状アミンとジアミンが溶出される。





(9) 溶出容量と溶出時間

溶出容量と溶出時間を表2に示す。

表2 アミン分析における溶出容量と溶出時間
および各測定波長における吸光度比

Amine	Retention time min.	Retention volume ml	Ratio of absorbancies	
			640m μ /570m μ	440m μ /570m μ
Methylamine	86	43	0.458	0.264
Ethylamine	104	52	0.458	0.278
n-Propylamine	146	73	0.458	0.279
iso-Butylamine	171	86	0.453	0.289
n-Butylamine	198	99	0.456	0.292
iso-Amylamine	246	123	0.459	0.294
n-Amylamine	290	145	0.462	0.308
Allylamine	125	63	0.462	0.325
Histamine	227	114	0.469	0.521
Tyramine	336	169	0.459	0.346
Phenethylamine	378	189	0.452	0.315
1,2-Propandiamine	216	108	0.429	0.357
Putrescine	348	174	0.496	0.496
Cadaverine	402	201	0.456	0.476
Hexamethylenediamine	455	228	0.451	0.401
Serotonin (440m μ)	426	213	0.469	1.08
(参照) Amino acid				
Alanine			0.437	0.270
Leucine			0.437	0.234
Cystine			0.439	0.543
Glutamic acid			0.438	0.487
Proline			0.679	4.36

(10) 各波長における吸光度比

570m μ における吸光度に対する440m μ と640m μ における吸光度の比はそれぞれのアミンで特異な値を示すのでこれを表2に示した。これは溶出時間とともにピークの定性的判別に大いに役立つものである。比較のためアミノ酸の場合を付記する。

この全分析に要する時間は、1 kg/cm²の圧力で流速30 ml/h送液して8~8.5時間である。

(11) 定量のためのHW係数

面積の積分値の近似値をうるためのピークの高さ(H)と半分の高さにおけるピーク幅(W)との積HW係数の本分析条件における値を表3に示す。

表3 アミンの定量のためのHW値と分析精度

Amine	C: H X W aver. (0.4 μ mol)	Standard dev. δ	$\frac{\delta}{C} \times 100\%$
Methylamine	5.86	0.060	1.02
Ethylamine	5.54	0.035	0.64
Allylamine	5.40	0.035	0.65
n-Propylamine	4.94	0.073	1.48
iso-Butylamine	4.88	0.082	1.68
n-Butylamine	4.35	0.042	0.97
Histamine	1.88	0.041	2.18
iso-Amylamine	4.20	0.059	1.40
n-Amylamine	2.80	0.062	2.21
Tyramine	3.81	0.109	2.86
Putrescine	4.19	0.149	3.56
Phenethylamine	3.02	0.097	3.21
Cadaverine	3.96	0.091	2.30
Serotonin (440m μ)	0.102	0.029	2.85
Hexamethylenediamine	5.13	0.143	2.79

(12) 検量線と定量精度

各アミンの量0.1~1.0 μ molの範囲での検量線はベアの法則に従う。正確な定量のための安全な濃度範囲は0.2~0.8 μ molである。定量精度は表3に示したように3.56%以内の誤差におさまる。

(13) アミン分析法の応用

本分析法で腐敗さば肉中のアミンを分析した実例を図2に示す。この結果より腐敗魚肉1g中に含まれるヒスタミン、チラミン、プトレシン、カダベリンの量は表4に示すとおりである。

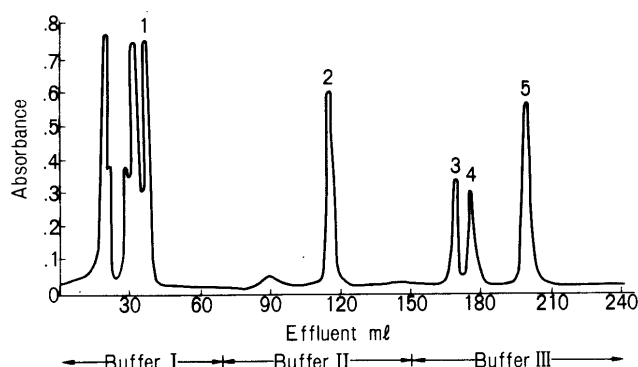


表4 さばの腐敗肉中のアミンの量

Amine	Amount in 1 g of putrefied fish μ mole
Histamine	11.95
Tyramine	1.70
Putrescine	1.60
Cadaverine	5.70

後 記

アミンは強塩基性の物質であるから、スルホン酸型樹脂とは本来強固に結合して溶出は困難である。したがって、Amberlite CG 50のようなカルボン酸型樹脂を用いて比較的弱く結合させて溶出するほうが分析法としては適当であるかもしれない。しかし、本法はアミノ酸分析の条件の改変をできるだけ少なくして、アミノ酸分析計をそのまま用いることを意図したため、きわめて高いpHの溶出液を用いなければならないこととなった。本法の条件でも溶出されないため分析できないアミンはトリプタミン、ヘキシルアミン、シスタミンなどである。これらの分析には樹脂を変えるほうが適当であろう。

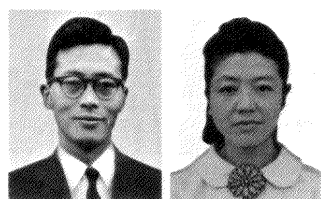
参考文献

- 1) Paul B.Hamilton: Anal. Chem., **35** (1963) 2055~2064
- 2) Paul B.Hamilton: Autom. in Anal. Chem., Technicon Symp. 3rd 1967 317~319
- 3) H.Hatano, K.Sumizu, S.Rokushika, F.Murakami: Anal. Biochem. in press (1970)
- 4) 村上文子, 六鹿宗治, 隅水瑋一郎, 波多野博行: 分析化学 投稿中 (1970)
- 5) E.A.Peterson, H.A.Sober: Anal. Chem., **31**, 857 (1959)
- 6) 波多野博行: "アミノ酸自動分析法" 化学同人 (1964)

ガスクロマトグラフィーのベンゼン代謝研究への応用*

野見山一生** 野見山絃子**

石油化学工業の急速な発展によって、ベンゼンの生産量および消費量は年々激増している。しかし、ベンゼンは造血臓器に対して強い毒性を有しているの



野見山一生 野見山絃子

で、わが国では、有機溶剤中毒予防規則(1961年)を設けて中毒発生の予防に努めているが、産業現場での中毒発生や白血病誘発事故はいまだ後を絶たない。

ベンゼンが生体内で酸化されてフェノールになることは、すでに前世紀に知られていた。その後、Williams一派¹⁾や中島ら²⁾の研究によって、ウサギでは、フェノール、カテコール、ベンゼングリコール、ヒドロキノン、ヒドロキシヒドロキノン、フェニルメルカプツール酸、ムコン酸などに代謝されることがわかった。さらに、野見山によって、³⁾ラットでは、ベンゼングリコール、カテコールがベンゼン中毒の造血障害を起こす原因物質であることもつきとめられた。しかし、ベンゼンの代謝に関する研究は、酵素に関する研究を除けば、代謝物の分析がはん雑であるため、Williams以後大きな進歩がみられず、ヒトにおけるベンゼン代謝はほとんど知られていなかった。そこで、われわれは、ベンゼン代謝物をガスクロマトグラフィーによって簡便に測定する方法を開発し⁴⁾、ヒトや動物のベンゼン代謝について検討することにした⁵⁾。

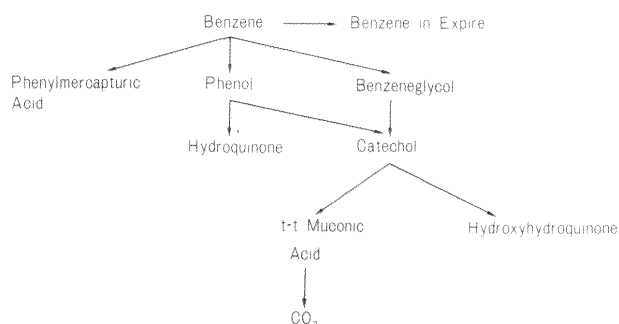
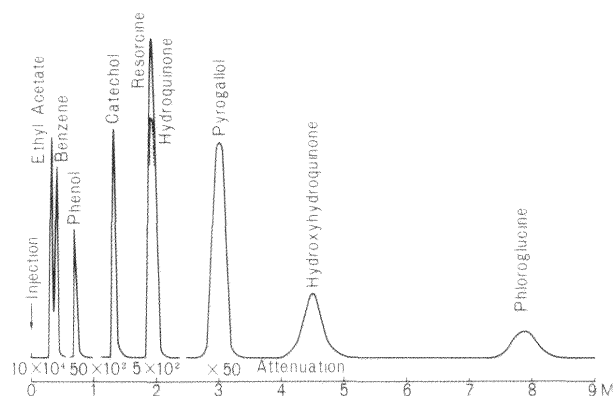


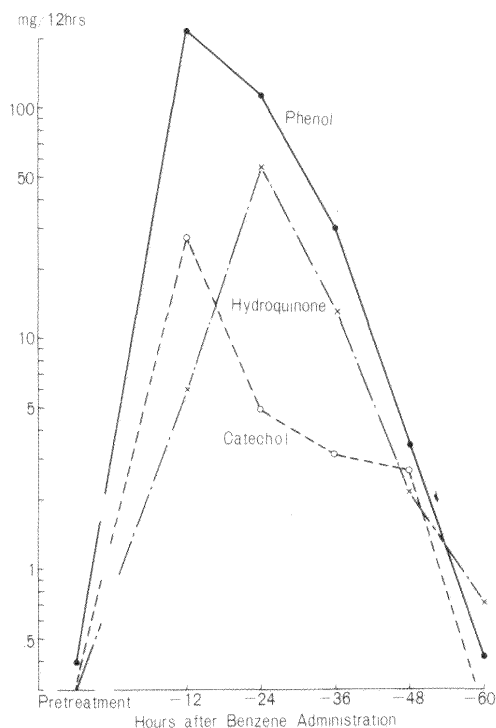
図1 ベンゼンの生体内代謝(ウサギ)

フェノール類をガスクロマトグラフィーによって定量しようとする試みはあったが、一価、二価のフェノールに限られ、クロマトグラフィーの分離もよくなかった。そこで、まず、一種のカラム条件でフェノール類を破壊なしに定量する方法を開発した。*** 一価、二価、三価のフェノールは、3%シリコンOV-17ガラスオンカラム(3mm×2m、担体はクロモソルブG AW80/100メッシュ)で、カラム温度190°C、注入口温度250°C、キャリアガスは窒素60ml/min、水素炎イオン化検出器で分離定量することができる。レゾルシンとヒドロキノンの保持時間が同一であるので、試料のガスクロマトグラフィーにレゾルシン・ヒドロキノンのピークを認めたときには、化学的に2物

質を分離する必要がある。フェニルメルカプツール酸はエチルエーテルで抽出してガスクロマトグラフィーで定量し、ムコン酸はガスクロマトグラフィーでは感度が悪いので、比色法で定量した。



次に、ウサギに1.0ml/kgのベンゼンを当量のごま油に混じて皮下投与し、その後3日間にわたって採尿した。尿は6N硫酸酸性で100°C、1時間加水分解したのち、遊離形代謝物をエチルエーテルで抽出してガスクロマトグラフィーで定量した。フェノールおよびカテコールは早期に排泄つされ、ヒドロキノンが遅れて排泄つされていた。これらの成績はWilliamsの所見¹⁾に一致していた。



* 本研究の一部は、昭和44年度文部省科学研究費の援助を受けた。

** 群馬大学 医学部 衛生学教室

***日立製作所那珂工場応用開発課の協力による

さらに、男女学生志願者12名に、60~80ppmのベンゼンを4時間吸入させた。ばく露後3日間、12時間ごとに採尿した。尿は凍結乾燥法によって20ml程度に濃縮し、その後はウサギ尿と同様に処理してガスクロマトグラフで定量した。ヒトでは、ウサギに比べて、ヒドロキノンの排せつがフェノールとほぼ時を同じくして早く始まり、カテコールの排せつが遅れていた。ピロガロール、ヒドロキシヒドロキノン、フロログルシンは検知できなかった。

以上の成績から、ウサギとヒトでは、ベンゼンの生体内代謝が異なるように思われた。また、女性は男性よりもベンゼン中毒に罹(り)患しやすいといわれている⁶⁾が、男女のベンゼン代謝には著明な差を認めることができなかった。同一濃度のベンゼンを吸入しても、女性は男性の2倍もベンゼンを体内にとり込むという報告⁷⁾もあるから、ベンゼン中毒に対する感受性の性差は、生体内代謝よりもとり込み率に主たる原因を考えるべきなのかも知れない。

参考文献

- 1) R.T.Williams: Detoxication Mechanism P.108, Chapman and Hall, London, 1959
- 2) 中島稔, 富田一郎: 化学の領域 13: 770, 1959
- 3) K.Nomiyama: Ind. Health 3: 53, 1965
- 4) K.Nomiyama and H.Nomiyama: J.Chromatog. 44: 386, 1969
- 5) K.Nomiyama: XVI Int. Cong. Occup. Health, Sept. 1969

6) 野見山一生: 労働衛生 10(12): 18, 1969

7) K.Nomiyama and H.Nomiyama: Ind. Health 7: 86, 1969

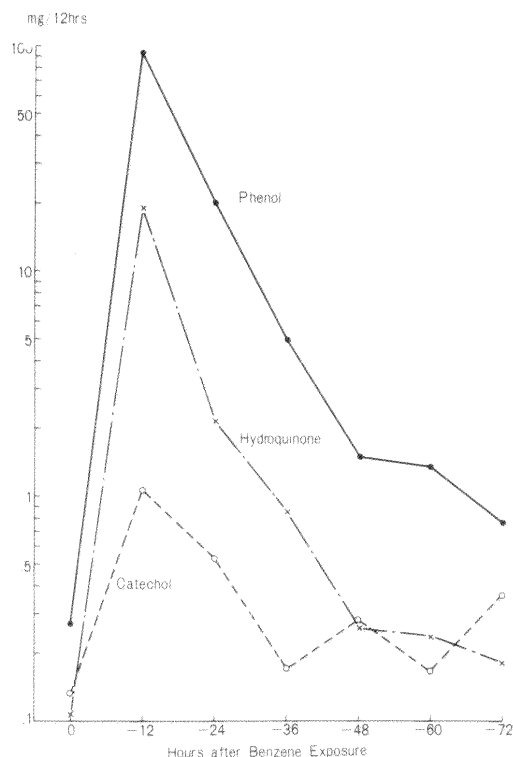


図4 ベンゼン曝露後の尿中ベンゼン代謝物(ヒト)

K53形 日立ガスクロマトグラフによる 人工甘味料チクロおよび合成保存料の分析

五十嵐日出夫 *

はじめに

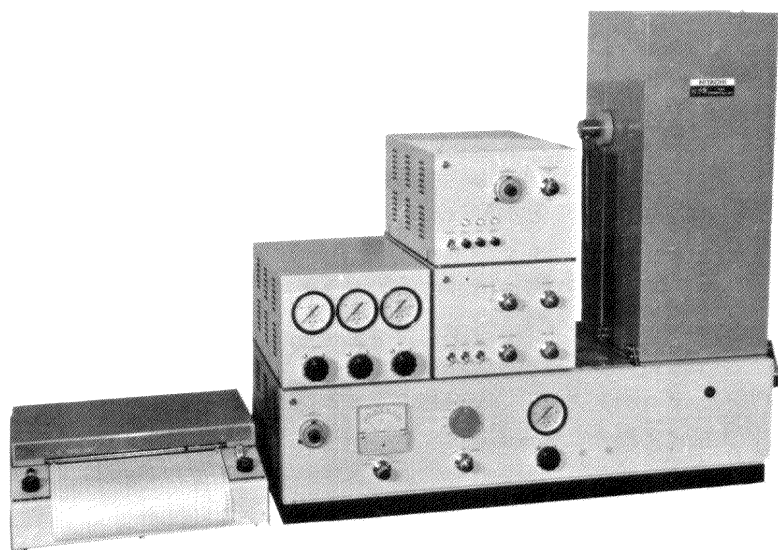
当社では、従来より各種原料資材に起因する人工甘味料などの混入を防ぐために、徹底した品質管理を行なっているが、その一端として行なっているガスクロマトグラフによる人工甘味料チクロと合成保存料の分析方法について報告する。



五十嵐日出夫

チクロの分析方法

従来、チクロ(サイクラミン酸ナトリウム)の分析は、酸性ソーダでアルカリ処理し、ビスキングなどで透析、さらに塩酸で酸性にして、酢酸エチルで抽出、ペーパクロマトまたは薄層クロマトで展開、ロジン酸ナトリウムで発色検出していた。しかし、この方法は、検出感度が低く(50~100ppm)、再現性、安定性も悪く、処理時間が長くなるため多数の試料の分析には不向きであるなど分析上の欠点があった。ここに紹介するガスクロ



K-53形 日立ガスクロマトグラフ

マトグラフによる方法は、これらの欠点が是正され、検出感度が5~10ppmまで上がり、再現性、定量性にもすぐれている。ことに、処理時間が短縮されるため、多数の試料の分析に最適な方法といえる。

原 理

硫酸酸性下で亜硝酸を0~3℃でサイクラミン酸と反応させて生成するシクロヘキサノール亜硝酸エステルを定量することによりチクロを測定する方法である。

分析条件

(1)装 置

K53形 日立ガスクロマトグラフ

水素炎イオン化検出器

1 m×3 mmφ ステンレスカラム

(2)標準溶液

サイクラミン酸ナトリウム (チクロ) 水溶液

①0.01mg/ml ②0.05mg/ml ③0.1mg/ml

④0.25mg/ml ⑤0.5mg/ml ⑥1.0mg/ml

⑦2.0mg/ml

標準水溶液の調製は2.0mg/ml溶液100 mlを正確に作り、以下希釈法で調製した。

(3)検液の調製法

チクロ0.1~2.0mg/mlを含む試料¹⁾ 10mlを50ml共せん試験管にとり、0~3℃の氷水中で10%NaUO₂溶液2 ml²⁾ および 10%H₂SO₄ 2mlを加えて、十分振りまぜて、冷蔵庫中に1時間放置し、次に塩化ナトリウム³⁾ 適量を添加し、n-ヘキサンを正確に5 ml加え、共せんをして2~3分間振盪(とう)したのち、n-ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウム⁴⁾を加えて脱水、検液とする。

注1) 液体試料の場合は、ほとんど前処理が不要である。

固形試料の場合は、試料中のチクロ含量が0.1~2.0mgになるよう10~50gを正確に計量し、純水50mlを加え十分にかくはんする。試料によってはホモジナイザまたは加熱溶解させ、遠心分離またはろ過により水溶液をとり以下検液調製に準じて行なう。

2) 10%NaNO₂の添加量はチクロ含量に応じて添加する。やや過剰のほうがサイクラミン酸のエステル化が完全に進み、未反応生成物であるシクロヘキサノールやシクロヘキサンは認められなくなる。

3) 塩化ナトリウムの添加は試料により異なるが、省略できる場合が多い。

4) 無水硫酸ナトリウムの添加も省略できるが、グラフを検討のうえ、行なったほうがよい。

(4)ガスクロマトグラフ条件

固定相: 10% SE 30

担 体: クロモソルブ W(80~100メッシュ)

カラム温度: 60℃

注入口温度: 140℃

ガス流量: 30ml/min N₂

25ml/min H₂

650ml/min Air

試料量: 2 μl

絶対検量線の作製

前記の分析条件により標準溶液を作り、検液調製法でエステル化を行なう。エステル化した各標準液を検液として、ガスクロマトグラフ条件で展開して得た各濃度のピーク高さをY軸に、それに対応する各濃度をX軸にとり検量線を作成した。分離能力がよいため、絶対検量線でも十分に目的を果たせるが、できればn-ノナンによる内部標準法が望ましい。

以上のようにして得られたクロマトグラムを図1に示す。また図2は絶対検量線である。

検出線利用による定量

市販のプラム缶詰(人工甘味表示品)から液汁10mlをとり、前記の方法で分析した結果が図1の⑧であり、検量線より求めたチクロ含量は1,500ppm添加されている。

合成保存料の分析方法

合成保存料については従来より分光光度計とガスクロマトグラフを併用して検討していたが、その結果をここに報告する。

(1)内部標準液の調製

内部標準アセトアニリド0.15%含有アセトン溶液に、(1) ソルビン酸(SOA)、デヒドロ酢酸(DHA)、安息香酸(BA)各1 μg、(2) SOA, DHA, BA各2 μg、(3) SOA, DHA, BA各4 μgを含むように正確に調製した。

(2)分析条件

固定相: 5% DGŚ + 1% H₃PO₄

担 体: クロモソルブ W(60~80メッシュ)

カラム: 2 m×3 mmφステンレスカラム ガス流量はチクロの場合と同じ。

カラム温度: 200℃

注入口温度: 250℃

試 料 量: 2 μl

(3)検量線の作製

図3は前記の手法で調製した内部標準液をガスクロマト条件で展開して得たもので、分離能力、再現性、定量性の非常にすぐれていることが認められる。各ピークの分離が非常によいので、内部標準アセトアニリドのピーク高さに対する各合成保存料のピーク高さの比で検量線を作成したが、結果は良好である。検量線を図4に示す。

(4)各試料の前処理方法

固形または半固形試料の場合、適当量の保存料(5~10 mg)を含むように正確に計量し、必要によりホモジナイザで粉碎または加熱し水に十分溶解させ、1 N-NaOHでアルカリ性として、細かく均一にする。これを遠心分離し、上澄み液をとる。必要に応じてろ過し、ろ液を分液ロートによる(脂肪や妨害物質の存在が予想されるときは、1 N-NaOH 溶液でアルカリ性として抽出溶媒約等量で抽出除去する)。次いで10%H₂SO₄で酸性として、抽出溶媒(エーテル)を等量用いて3回抽出を行ない、抽出液はクーデルナ・ダニッシュ濃縮器を用いて一定量としてガスクロマトグラフに注入、展開する。

図4の④は、市販計り売り味噌の分析結果であるが、これによれば検量線より、ソルビン酸の含量1,600ppmが検出されており、許容量よりやや多い。DHAやBAも混入しているが、原料よりの移行であろうと考えられる。

おわりに

以上、人工甘味料チクロおよび合成保存料のガスクロマトグラフによる分析方法について簡単に報告したが、この方法は容易に定性、定量が行なえることがわかったので、当研究室では盛んに利用している。

なお、研究中、種々ご援助いただいた小出孝之専務、河野実製造部長に深く感謝する。

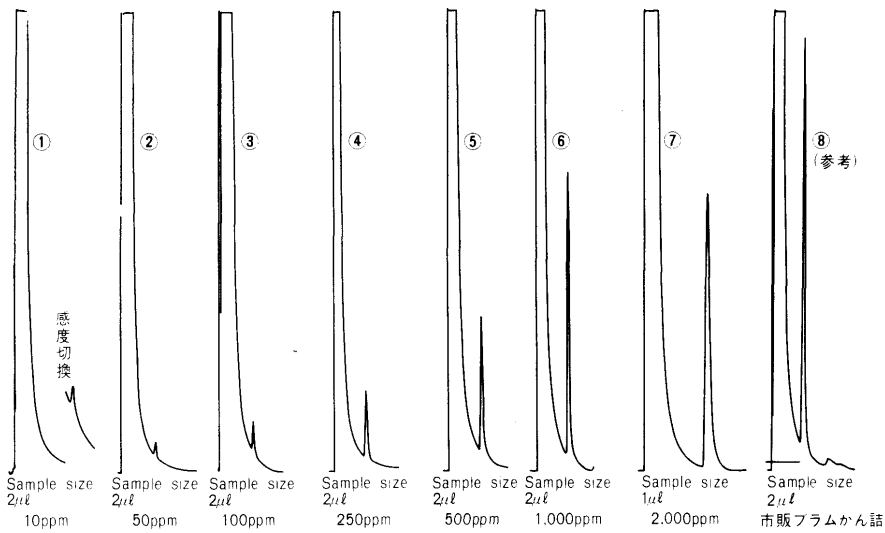


図1 クロロのクロマトグラム

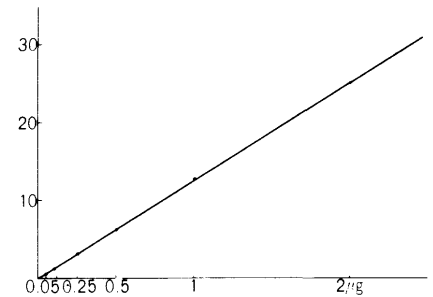


図2 クロロの絶対検量線

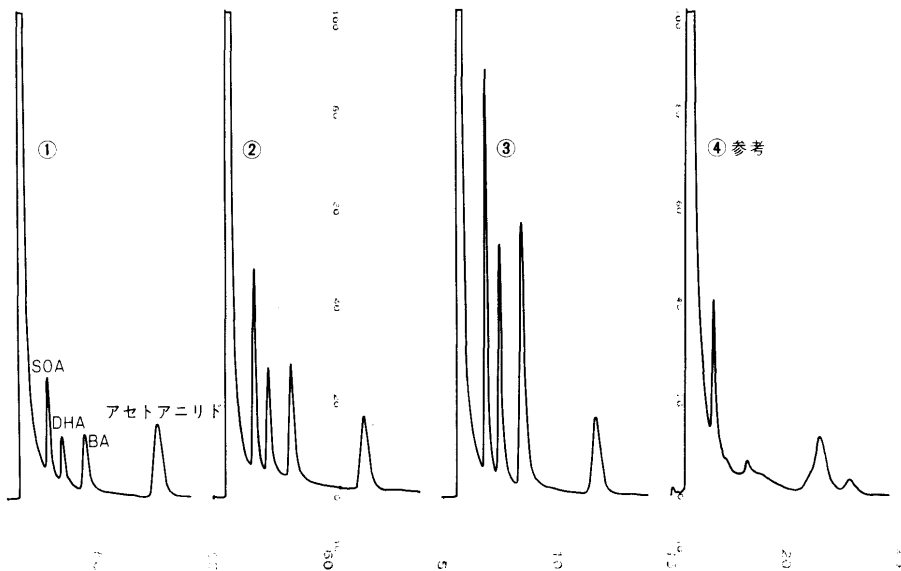


図3 合成保存料のクロマトグラム

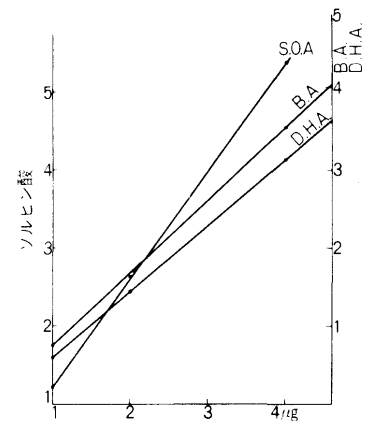


図4 合成保存料の検量線

THE HITACHI Scientific Instrument News
Vol. 13 No. 1

昭和45年1月20日印刷

昭和45年2月1日発行

非売品

年6回毎偶数月発行

編集人 石川直成

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

Printed in Japan NT-S H