

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SPRING 1977
VOL.20 NO.1

目 次

巻 頭 言

分析化学の対象のレベル……………
……………波多野博行… 1

報 文

走査電子顕微鏡による哺乳類卵の
微絨毛と受精の観察……………
……………野田善郎 肥高 洋… 4

酵素反応解析における200-20形日
立ダブルビーム分光光度計エン
ザイムシステムの応用……………
……………畠本 力 林 万喜… 8

解 説

“IN BEAM”電子衝撃法によるマ
ススペクトロメトリ……………
……………菱田真三郎 佐藤 弘… 12

GA-2形日立グラファイトアトマ
イザの応用……………原田勝仁
山田英雄 森谷一夫 内野興一… 16

トピックス

光照射によりガラス表面に析出す
る金属粒子と金属画像……………
……………丸野重雄… 19

706D形日立自動分析装置…………… 20

巻 頭 言

U.D.C. 543.06:001.12

分析化学の対象のレベル

波多野博行*



1. 分析化学の体系

分析化学の現在の知識体系の基礎をなしているものは、定性分析と定量分析である。「何が」「幾ら」あるかを明らかにするのが分析化学の目的であるとすれば、この「何が」を明らかにするのが定性分析であり、「幾ら」を明らかにするのが定量分析であるといえる。この分析化学の知識体系は、1923年、スイス・チューリッヒの工科大学（ETH）の教授 F. P. Treadwell の集大成した体系から発している。しかしながら、試みに同教授の名著 *Lehrbuch der Analytischen Chemie* の第1巻 *Qualitative Analyse* を繙いてみると、その大部分が類似の金属をいかにして分離し単一の金属元素イオンにするかに力が注がれており、「何が」という部分はそれがすんでから僅かに呈色や焰色によって決定されていることに気がつくであろう。

この「何が」という定性分析を行うためには、このように混合物から単一成分を取出す「分離」という操作が必要である。今日では、この「分離」を行う化学を分離分析と呼んでいる。そして、本来の「何が」という部分は、今日では、その後の物理化学的方法の進歩によって、赤外分析や質量分析あるいは核磁気共鳴などの方法、すなわち、いわゆる機器分析に頼っているのである。

したがって、現在の分析化学の知識の体系は、定性分析と定量分析に加うるに分離分析のこれら3本の柱で構成されなければならない。

2. 分離分析

分離分析の方法として我々になじみ深いのは、抽出、蒸溜、濾過、結晶化（再結晶）などである。遠心分離や電気泳動も忘れてはならない。さらに重要な分離の方法のひとつはクロマトグラフィである。クロマトグラフィに関する知識の体系は、これまでの前処理の域を出なかった蒸溜や抽出などの方法とは格段に進歩した系統的分離分析法として確立された。これによって、分離分析が定性分析と定量分析とに対等に並んで体系化されたといっても過言ではない。

クロマトグラフィは、単一の元素の金属イオンや単体のガスでも、数種の元素より成る有機化合物の分子でも、あるいはまた巨大な生体あるいは合成の高分子化合物でも、それぞれのレベルに応じて単一に分離できる極めて有効な方法である。

この場合、分離の対象が、元素のレベル、分子のレベル、さらに高分子のレベルなど、いろいろなレベルにあることに気がつくであろう。クロマトグラフィは、対

* 京都大学 理学部 教授、理博



象のレベルがどの辺にあって、それぞれのレベルにおいて極めて有効な分離分析法であるといえる。

3. 分析対象のレベル

ナトリウムやカリウム、銅やニッケルや鉄などの分析は元素のレベルにある対象の分析である。同様に、炭素、水素、窒素、硫黄の分析も、文字どおり元素分析である。ところが、炭酸ガスや亜硫酸ガス、メタンやエタンの分析とか、ベンゼンやトルエンの分析などはもはや元素分析ではない。これは化合物のレベルにある対象の分析である。これらの元素のレベルにある対象の分析と、化合物のレベルにあるその分析との間には、古くからメトキシ基の定量とかカルボキシル基やアミノ基の定量のような官能基の分析がある。同様に、化合物のレベルにある対象の分析でも、アミノ酸のような低分子もあれば、タンパク質や核酸のような高分子もあり、その中間にはオリゴ糖やオリゴペプチドのように中くらいの分子もある。アミノ酸分析はもはや元素分析ではなく、低分子の有機化合物の元素分析が果すのと同じような役割を、タンパク質化学において果している。

このように分析にはそれぞれその対象とするもののレベルがある。例えば、同じ機器分析といっても質量分析は分子レベルにある化合物の、あるいは分子に含まれる原子団フラグメントの質量数を求める分析法であり、赤外分析はひとつの分子内の一定の原子団である官能基の存在を示すのに有効な分析法である。また、核磁気共鳴法は分子内の構成元素、特にその構造に関する有力な情報を提供する方法である。これらはいずれも対象とするもののレベルがそれぞれ異なっていることに気付くであろう。

4. 分析法と対象のレベル

このような観点に立って、従来から用いられてきた種々の分析法を対象のレベルに対応させて眺めてみよう。

従来からよく用いられてきた蒸溜、抽出、再結晶などの精製法は、それぞれ液体と固体の状態にある比較的分子レベルにある化合物の分離分析法である。気体の状態にある分子については、これらに対応するよい分析法がなかったが、今日ではガスクロマトグラフィがその役目を果たしている。また、液体クロマトグラフィやゾーンメルティングなどの新しい方法が有効に使われ、特に液体クロマトグラフィはその対象のレベルを高分子にまで広げた。高分子の領域では遠心分離や電気泳動があり、これらの方法はさらに高分子の複合体にまで適用できる。

定性分析法として、赤外分析、質量分析、核磁気共鳴法などのいわゆる機器分析の対象とそのレベルについてはすでに述べた。これに加うるに、可視紫外部の吸光分析とか原子吸光などの方法はそれぞれ原子や原子団、あるいは低分子から高分子に至る化合物の定性にも、そしてむしろ定量分析に今日大きな役割を果たしていることは周知のことである。今日の分光学的な著しい進歩は分析化学に幾多の新しい分析法の開発を促した。いわゆる ESCA と呼ばれる光電子分光の方法とか、ESR のような不対電子の分析法、メスbauer 効果を利用して原子や原子団の存在状態まで明

かにする方法を提供している。

5. 分析化学と分析法の将来

このように考えてみると、分析化学が化学に関連した科学と技術のあらゆる広い分野にその基礎となる方法論を提供する学問であるとするならば、分析化学者がいかなる分析法を開発して分析化学の知識の体系化に貢献すればよいかが明らかとなるであろう。

まず、レベルの低いところでは、不対電子を含む化合物、すなわちラジカルの分離分析のよい方法がなかった。これはラジカルが一般に不安定な化合物であるからその方法がむずかしかったことはいまでもないが、もしラジカルの分離化学が発達すれば、遊離基の化学に著しい進歩をもたらすであろうことは容易に想像できる。筆者がラジカルのクロマトグラフィに力を入れているゆえんはこの辺にあるといえる。

次に、金属にしても非金属にしても、イオン種の分離にイオン交換が適当であることはよく知られているが、気相におけるイオン種の分離は極めてむずかしい。これは現在、質量分析に頼っているのであるが、常圧の質量分析法はその開発が極めて困難である。筆者が常圧の質量分析法やプラズマクロマトグラフィの開発に強い関心を抱くのはこの故である。

さらに、レベルの高い方へゆくと、従来、重合度が全く同一であるポリマーを均一に得ることは極めて困難であった。高分子化学の著しい進歩にもかかわらず、重合度の全く同一である純粋なポリマーを対象とした真の意味の高分子の化学が全く未開発なのは、分子量の全く同一な高分子を得る適当な方法がなかったからである。現在の新しいゲルパーミエーションクロマトグラフィは、この分野の発展に著しい貢献をなすであろうことが十分期待できよう。

また、細胞顆粒や細胞のレベルでの系統的分離法や測定法は未だないといっても過言でない。僅かに遠心分離法やレーザ光散乱の方法がそれをカバーしているが、さらに何か新しい分析法が開発されるべきであろう。筆者は、非常に孔径の大きいしかも機械的に強い水系のゲルの開発を急いでいるが、この巨大粒子の水系ゲル濾過法の開発は生物学に大きな貢献をもたらすことが期待できる。巨大粒子レベルの定性分析には電子顕微鏡が大きな役割を果たしていることはいまでもない。これは当然のことながら、定量化に精力がそそがれるべきであろう。

このように既知の方法論をこの観点で見直してみると、何が確立されていて、何が欠けているかを改めて見直してみることができるであろう。

6. 極限に挑む

3 ページの表に示した知識は単に二次元的な見方であるが、これにいかに関時間で観測できるかという時間の要素を加えたり、また、いかに小さい量まで検出できるかという感度の要素を加えたりすると、分析化学の知識体系はさらに三次元的、立体的に高次に体系化することができる。分析精度についても同様なことがいえる。現在、最も進歩の著しい分光学的な分析法でパルス閃光法はピコ秒(10^{-12} sec)



表1 分析法と対象のレベル

分析 法	遠心分離	電気泳動	ゾーニング	再結晶	蒸溜	溶媒抽出	イオン交換	光学顕微鏡	蛍光顕微鏡	電子顕微鏡	カウンタ	液体クロマト	グラフ	アフィニティクロマト	グラフ	ガスクロマト	分析	光子分光	ES	ISC	IMS	XMAS	ES	紫外可視	赤外	蛍光	放射線	分光	旋光	NMR	質量分析	容量分析	重量分析	電気分析	ポログラフィ		
区分	分離分析	定性分析	定量分析																																		
細胞																																					
顆粒																																					
複合分子																																					
高分子																																					
オリゴマ 錯体																																					
低分子																																					
原子団																																					
元素 原子																																					
電子																																					
原子核																																					



の測定が可能であるし、また常圧質量分析やプラズマクロマトグラフィではピコグラム (10^{-12} g) の領域にまでの感度を得られている。X線回折の分解能も優に $1 \text{ \AA}$ の域に達しているし、電子顕微鏡で分子を見る努力も成功した。しかし、ある種の物質に感ずる犬の鼻の最高感度は 10^{-14} g といわれているし、人間でも鼻や舌は僅かに 10^{-13} g を嗅ぎ分け、味わい分けているから、俗にいうにおいメトリーや、はな

リシスに匹敵する感度の分析法を開発するにはさらに格段の努力が要求される。このような分析法の進歩があってはじめて嗅覚や味覚の化学の進歩が促されるといえるだろう。われわれは“またたくひま”もないほど速い測定に情熱を燃やし、“清” (10^{-22}) “浄” (10^{-23}) な空気や水を証明すべく、いろいろなレベルで極限に挑まなければならない。

報 文

U.D.C. 599-131.086.3:621.385.833.28

走査電子顕微鏡による哺乳類卵の微絨毛と受精の観察

野田 善郎* 肥 高 洋**

1. はじめに

電子顕微鏡による動物の受精の観察は、1961年に Colwin, L. H. & Colwin, A. L.¹⁾ が環形動物、多毛類の一種ツバサゴカイ (Hydroides) で精子先体反応及び卵と精子の結合状態を詳細に報告したのが最初といってよい。1963年、彼ら²⁾ が半索動物のギボシムシ (Saccoglossus) の受精において、両配偶子の膜癒合の重要性を指摘したことが受精の電顕研究の基礎となり、以後、微細構造変化の追跡に大きな影響を与えることになった。

哺乳類の受精の電顕観察では、Szollosi & Ris³⁾ が最初であるが、Pikó & Tyler⁴⁾ は精子が卵膜を通過し、精子と卵の癒合過程を観察しており、これが受精過程の最初の観察とされている。哺乳類の受精過程の継続的な電顕観察はウサギで Bedford^{5), 6)}、ハムスターで Yanagimachi & Noda^{7), 8)}、モルモットで Noda & Yanagimachi⁹⁾、マウスで Thompson¹⁰⁾ の報告がある。

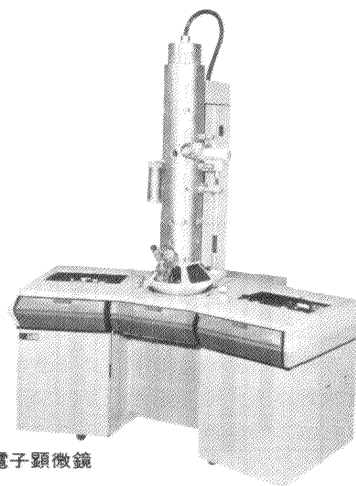
無脊椎動物卵の細胞質突起が、受精の際、精子とどのような関連性をもつかは全く不明であるが、哺乳類卵の表面にある細胞質突起は受精に際して重要な役割を演ずると筆者らは考えている。哺乳類卵の細胞質突起を Microvilli (微絨毛) と呼ぶ習慣があるが、これは一般の組織に見られる微絨毛とは多少異なる。ここにこの微絨毛について明らかにした知見を報告する。

2. 材料と方法

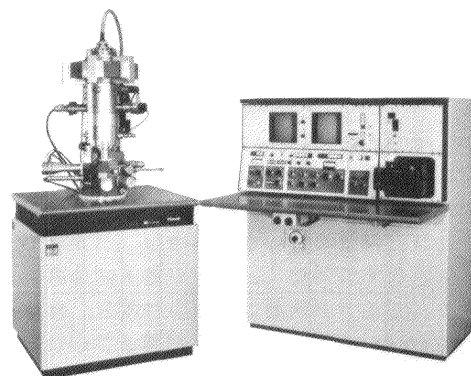
ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) の成熟した雌に PMS (Pregnant Mare Serum) と HCG (Human Chorionic Gonadotropin) を腹腔内注射し、15~16時間後にこれを殺し、卵管膨大部から排卵された卵を採集した。卵はタイロッド液中に保存し、加精前にヒアルロニダーゼで卵丘 (cumulus oophorus) を除去し、さらにトリプシンで卵膜 (zona pellucida) を除去した。

精子は精巢上体を取り出し、精子の capacitation 用培養液中で精巢上体尾部を針先で破り、浮遊してきたものを用

いた。capacitation 用培養液に精子を浮遊させておくと、2~3時間間で capacitation (受精能力獲得) し、やがて先体反応を起す。このような精子を上記の卵に加精した。電顕用試料は、0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4、を含むグルタルアルデヒドとオスミック酸で二重固定、脱水後、日立臨界点乾燥装置 HCP-1



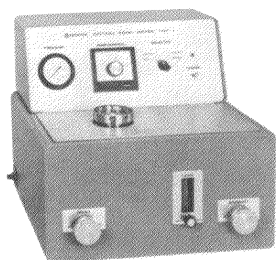
H-500形 日立電子顕微鏡



S-500形 日立走査電子顕微鏡

* 愛媛大学 理学部 生物学教室、助教授、医博

** 日立製作所 那珂工場 応用技術センタ



HCP-1形 日立臨界点乾燥装置

3. 観 察

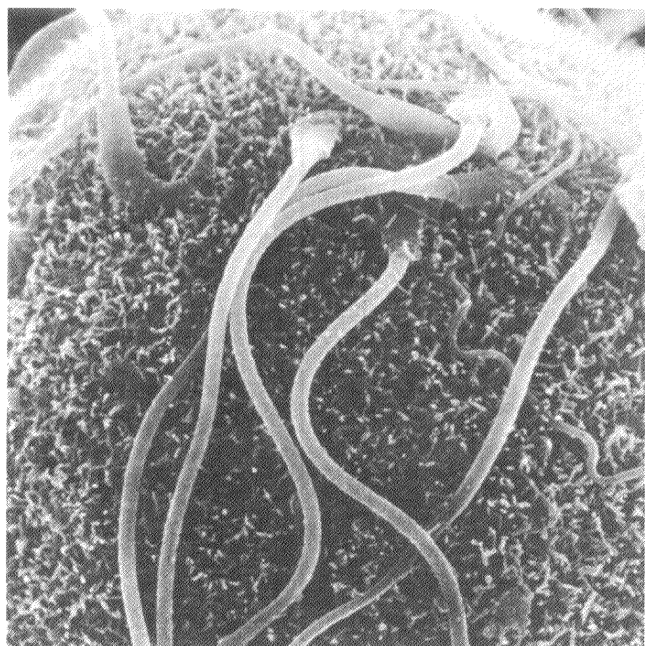
3.1 微 絨 毛

排卵された卵は、卵管膨大部に集っており、第2成熟分裂中期の状態である。卵の外側には付属物である卵丘、放射冠及び透明帯(卵膜)がある。卵の表面をSEMで観察するために、これらの付属物を除去した。

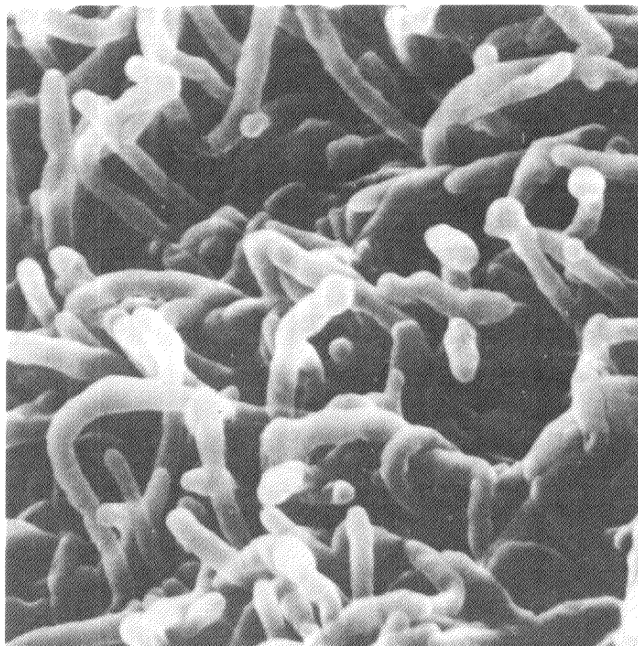
既に放出された第1極体の表面は滑らかで、微絨毛はあまり認められない。第2極体の放出予定部域の表面にも微絨毛はあまり認められず、滑らかである。これら以外の部域は微絨毛で覆われている(図1)。未受精卵の微絨毛は直径 $0.14\mu\text{m}$ あり、その先端部は少し膨らんでいる(図2)。SEM像からはその長さは計測できないが、切片像から判断すると約 $3\mu\text{m}$ はあると思われる。腸上皮に観察される典型的なものとは異なり、分枝したもの(部分的に癒合したものかもしれない)なども観察される。TEM観察によれば、微絨毛の内部には細胞質の有形成分は認められず、外側部には腸上皮の場合のようなムコ多糖類の被覆構造は認められない。

3.2 精子と微絨毛の関係

トリプシン処理して、卵膜を除去した後から加精すると、沢山の精子が卵表に接着する。あるいは、接着するというより、卵の微絨毛に捕えられると表現するのが正しいであろう(図3)。微絨毛に捕えられた精子は、鞭毛を動かし、

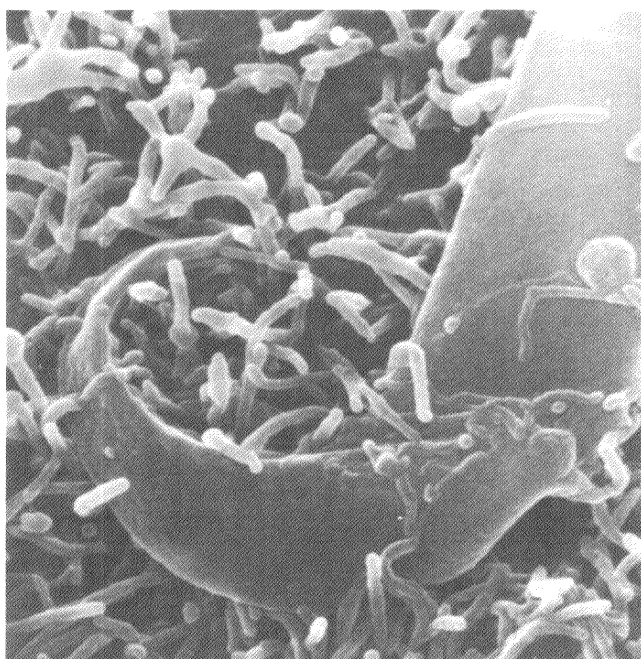
図1 卵に接着したゴールデンハムスターの精子 $\times 2,200$

で試料の乾燥、IB-1 EIKOイオンクリーナで金を被覆、S-500形日立走査電子顕微鏡で観察した。TEMはH-500形日立電子顕微鏡を用いた。

図2 未受精卵の微絨毛 $\times 25,000$

頭部をもち上げようとするが、容易に離れることができない。捕えられた精子が先体反応したものであれば(図4)、卵の微絨毛を形成している卵原形質膜と精子原形質膜との間で、直ちに膜癒合が開始される。膜癒合が開始されると、精子は動かなくなる。いつまでも鞭毛を動かしている精子は卵と膜癒合できなかったものとみなしてよい。

先体反応した精子が微絨毛に捕えられると(図4)、5分以内に膜癒合が開始される。これはSEMでは観察できない。精子において膜癒合の認められる箇所は、頭部の post-

図4 先体反応後捕えられた精子。5分後には卵との癒合が始まる。図3と比較されたい。 $\times 13,000$



nuclear cap 領域から尾部末端までで、先体膜（内先体膜）が頭部に残っている箇所では膜癒合は起こらない。膜癒合には順序があり、頭部が完了しなければ、尾部では膜癒合が起こらない。膜癒合が頭部で起こると、癒合箇所から卵の細胞質成分が頭部に流入して、精子核を被覆してしまう。Yanagimachi & Noda¹¹⁾のSEM観察によれば、精子頭部で癒合した微絨毛は次第にその形が崩れ、ちょうど砂浜に波が打ち寄せるような形を呈している。癒合後約15分経過すると、精子頭部の形は外表面から見るとほとんど崩れてしまっている。しかし、TEMで観察すると、頭部の核はま

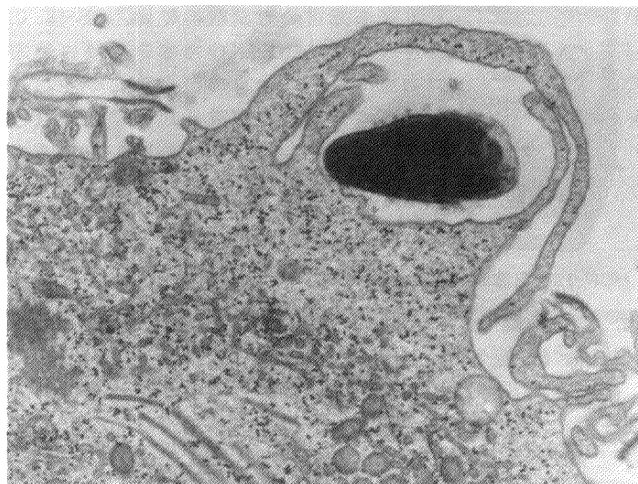


図6 図5と同じ時期、微絨毛は単なる細胞質突起に変わる ×15,500

だ完全な形を呈しており、その崩壊は認められない（図7の上、下）。膜癒合後30分経過すると、卵の表面からは精子頭部を観察することができず、尾部が卵表に残されているのみである（図7の下）。

3.3 膜癒合後の微絨毛

精子原形質膜と微絨毛の原形質膜間で膜癒合が起こると、卵表層部にある表層粒の崩壊が始まる。ウニ卵などに認められる表層反応と同じである。ウニ卵での研究が最も進んでいるが、表層粒内の物質が卵膜と結合して、余分な精子が卵膜の通過をできなくしてしまう重要な現象と考えられている。無脊椎動物卵ではこのような卵膜を除去しても正

常な状態では精子は卵内に侵入できない機構が成立しているが、ハムスターの受精卵は原形質膜レベルでの多精子受精防御機構は強くない。

微絨毛と精子頭部との間で膜癒合が開始されると、膜癒合を起こした付近の微絨毛は、未受精卵のものに比べ、その形、大きさに変化が認められ（図5、6）、単なる細胞質突起と呼ぶほうがふさわしくな

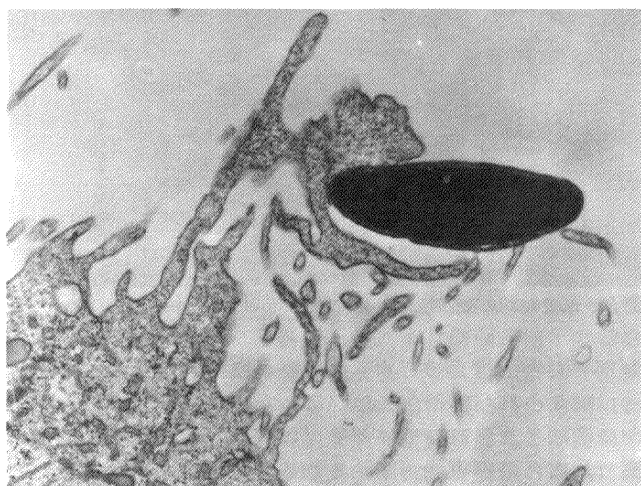


図5 受精5～10分後の卵の微絨毛と精子。微絨毛の変化に注意 ×12,400

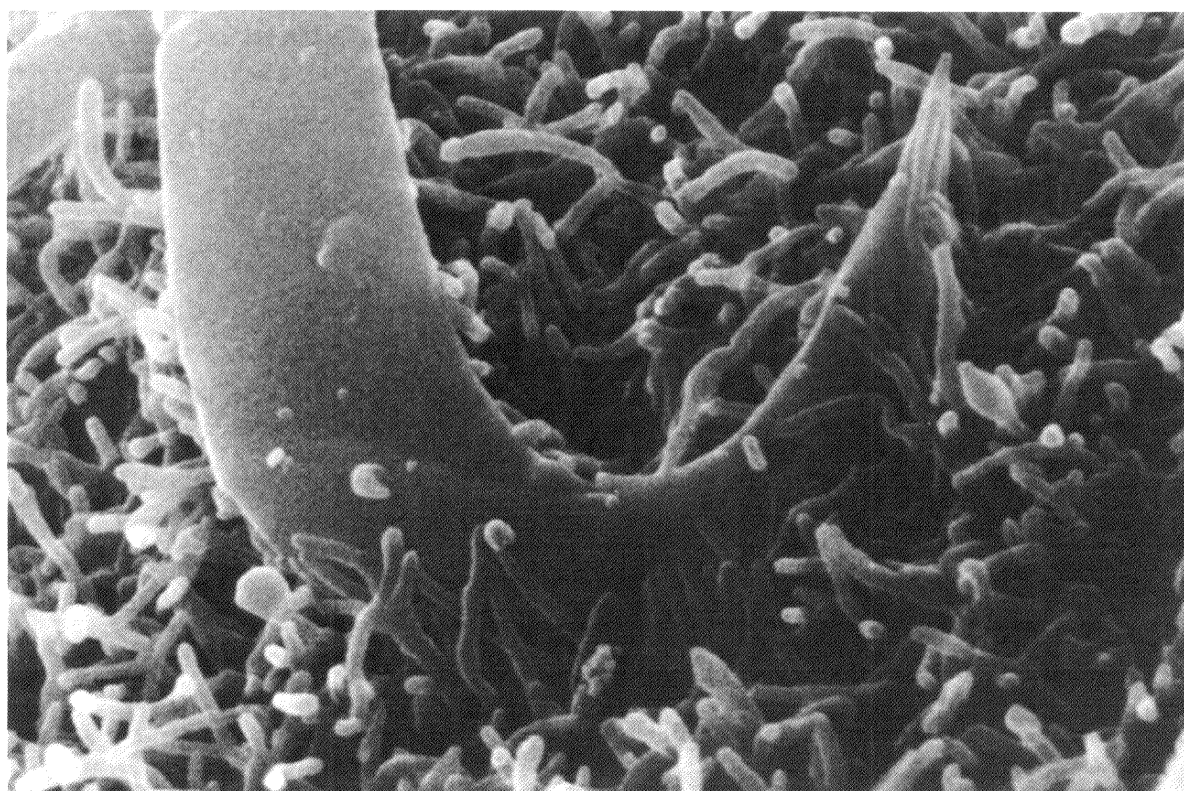


図3 微絨毛に捕らえられた先体反応をしていない精子 ×16,000

ってくる。また、TEM像によれば5～6 μm にも伸長した微絨毛も認められることがある(図5)。

4. 考 察

SEMによる卵の観察は非常に少なく、受精の際の卵表上の精子をとらえたものは、ウニでTegner & Epel¹²⁾、Schatten & Mazia¹³⁾、ウサギでGouldら¹⁴⁾、ハムスターでYanagimachi & Noda¹¹⁾の報告があるにすぎない。

哺乳類卵は1個体から採取できる数は、齧歯類で10数個にすぎない。卵の直径は約70 μm である。卵の外側には卵丘と卵膜があるために、これらを除去しなければ、直接卵の表面を観察することはできない。卵丘と放射冠はヒアルロ

ニダーゼで除去できるが、透明帯は除去できない。トリプシン処理によりその除去ができる。しかし、受精卵の透明帯の除去は困難になる。この傾向はハムスターよりもマウス卵のほうが強い。

哺乳類卵は体内受精のために精子が卵に接着した瞬間を観察することは不可能に近い。したがって、観察は、当然、体外受精の可能なものに限定される。

精子が卵に接着して、卵細胞質に侵入する過程を電顕観察するためには、一般には多精子受精をさせて研究能率を上げることが常道手段とされている。多精子受精と正常受精とは将来の胚の発生に与える影響が大きく異なるので、正常な受精を観察すべきであるという意見は十分に考慮し

なければならない。しかし、少なくとも精子が卵と膜癒合して卵内に侵入する過程は両者間に差はないということが証明されている。哺乳類の研究の場合には、体外受精を観察することに対しても疑問視する研究者もいる。Yanagimachi & Noda^{7),8)}のハムスターの体外受精の報告に対して、Zamboni¹⁵⁾が批判の論文を発表し、それに答えたYanagimachi & Noda¹⁶⁾の反論は興味深い。Zamboniグループも体外受精により、マウスの受精過程の微細構造変化を発表した(Thompsonら¹⁰⁾)。

今までに受精過程の電顕観察がなされている無脊椎動物卵の細胞質突起は短いものである。ウニは乳頭状の突起をもつにすぎない。精子は卵膜に触れると、先体反応し、種により長短さまざまであるが1本の先体突起(複数のものもある)を形成し、突起の先端部が卵の原形質膜と癒合し、精子の限界膜(原形質膜と先体膜のモザイク膜)と

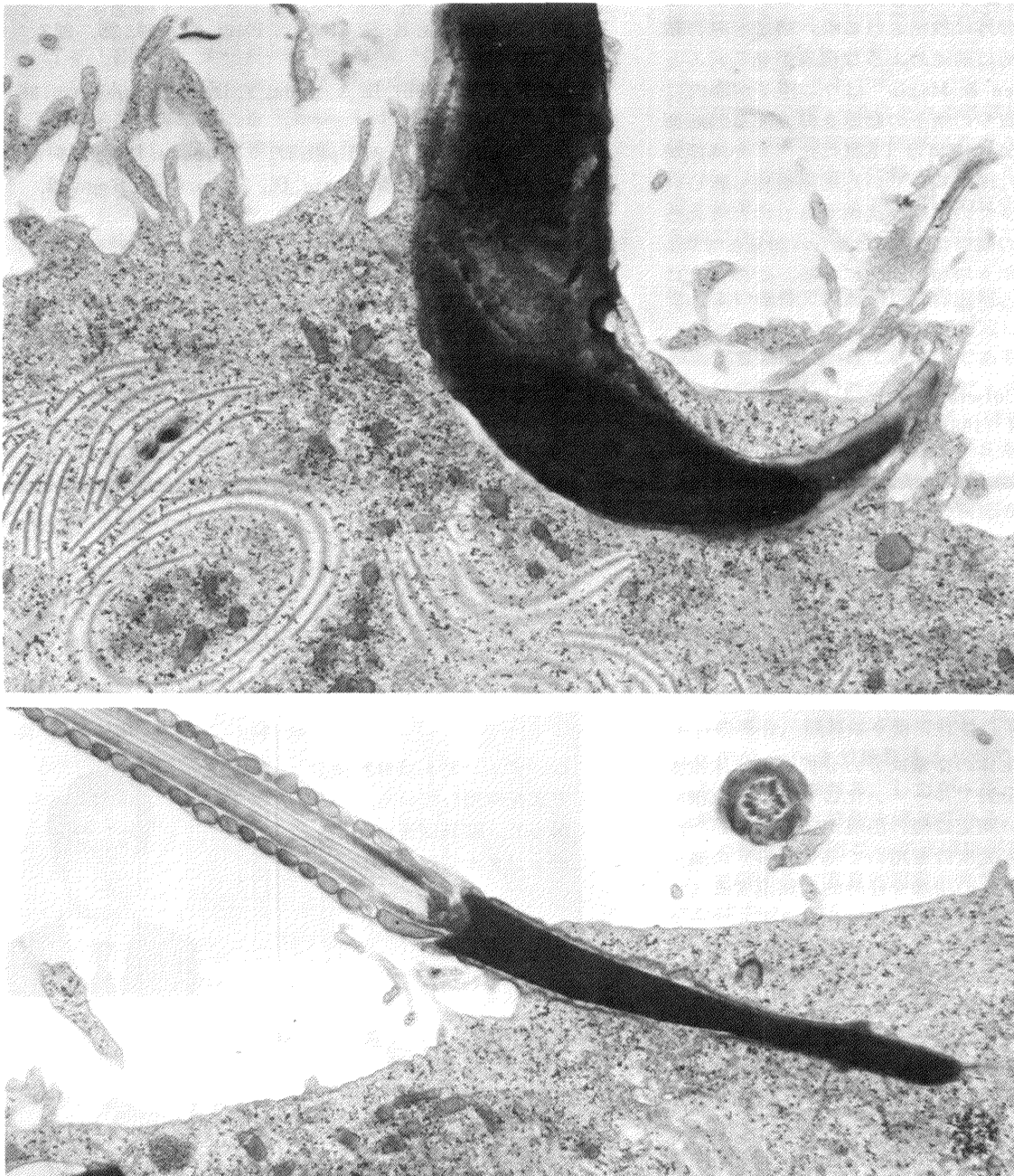


図7 受精後15分以上経過したもの。下の写真の状態になると精子頭部はSEMでは観察できない。上下とも $\times 17,000$



卵の原形質膜は一つづきになる。やがて、卵の細胞質が、精子核を取囲む。

無脊椎動物の精子は卵に対して垂直に結合する。哺乳類の場合は卵に対して横倒しの状態で卵に接着する。先体反応しても先体部は頭部から棄てられるだけで、精子は卵と接着するための積極的手段はもっていない。結局、卵の微絨毛によって捕らえられ、卵の微絨毛との間で膜癒合を行う。卵の微絨毛は精子を固定し、受精を完全に遂行するという大きな役割を演じていると考えられる。

最後に、動物の受精の研究分野におけるSEMの有用性について述べてみたい。最近、ウニの受精の際、多くの精子が卵表に接着するが、1個の精子が卵と癒合を開始すると、卵表上の余分の精子が次第に離れてゆく過程がSEMで観察された(Vacquierら¹⁷⁾)。彼らは表層粒内のプロティアーゼが表層粒崩壊に伴って卵外に放出される際、精子と卵の結合部位が切断されるために前述のような現象が見られると説明している。Schatten & Mazia¹³⁾はウニ精子が卵内に侵入する過程と卵細胞質中の精子の動態を卵表面と切断面でSEM観察をしている。SEMはTEMに比べて分解能が数段劣るが、従来の切片像に頼っていた電顕観察も新しい角度から受精の研究に多くの情報を提供するものと考えられる。動物の初期発生の観察にSEMは新しい知見を増やしてきたし、その報告は年々増加の傾向にある。このことについての考察は別の機会に譲りたい。

■参考文献

1) Colwin, L. H. & Colwin, A. L., : J. Biophys. Biochem Cytol., 10, 231 (1961)

- 2) Colwin, L. H. & Colwin, A. L., : J. Cell Biol., 19, 501 (1963)
- 3) Szollosi, D. & Ris, H., : J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 275 (1961)
- 4) Piko, L. & Tyler, A., : Proc. 5th Intern. Congr. on Animal Reproduction, Trento., 2, 372 (1964)
- 5) Bedford, J. M., : Amer. J. Anat., : 123, 329 (1968)
- 6) Bedford, J. M., : Amer. J. Anat., : 133, 213 (1972)
- 7) Yanagimachi, R. & Noda, Y. D., : J. Ultrastruct. Res., 31, 465 (1970a)
- 8) Yanagimachi, R. & Noda, Y. D., : Amer. J. Anat., 128, 429 (1970b)
- 9) Noda, Y. D. & Yanagimachi, R., : Develop. Growth Differ., 18, 15 (1976)
- 10) Thompson, R. S. et al., : Fert. Steril., 25, 222 (1974)
- 11) Yanagimachi, R. & Noda, Y. D., : Experientia, 28, 69 (1972)
- 12) Tegner, M. J. & Epel, D., : Science, 179, 685 (1973)
- 13) Schatten, G. & Mazia, D., : Exp. Cell Res., 98, 325 (1976)
- 14) Gould, K. G. et al., Arch. Gynäk., 210, 235 (1971)
- 15) Zamboni, L., : J. Ultrastruct. Res., 34, 401 (1971)
- 16) Yanagimachi, R. & Noda, Y. D., : J. Ultrastruct. Res., 39, 217 (1972)
- 17) Vacquier, U. D. et al., : Exp. Cell Res., 80, 111 (1973)

U.D.C. 577.151.036.087.5:〔681.785.423.087.9:681.322.022〕

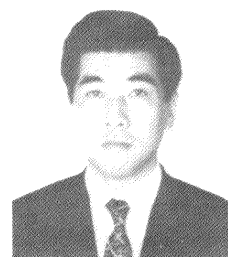
酵素反応解析における 200-20形 日立ダブルビーム分光光度計 エンザイムシステムの応用

畝本 力* 林 万喜*

酵素反応の測定は、生体の微量成分の分析から臨床検査にいたるまであらゆる分野でルーチン化しており、取扱いが容易でかつ精度の高い測定器機の出現が望まれていた。多くの酵素反応は、分光光度計を用いて基質(S)の減少あるいは反応生成物(P)の増加を経時的に測定することが可能である。従来方法は、吸光度変化をまずレコーダに記録し、得られたカーブから反応の初速度を求めていた。この方法では、近似的な直線あるいは曲線から反応時間ゼロの点の傾斜を求めるために初速度の計算に多少経験が必要であり、また個人差の生じることがある。

このほど日立が開発した200-20形日立ダブルビーム分光光度計エンザイムシステム(以下「200形エンザイムシステム」という)は、酵素反応の速度の測定方法として全く新

しいデジタル積算形微分方式を採用している。したがって、結果は速度としてデジタルで記録されるた



200-20形 日立ダブルビーム分光光度計エンザイムシステム

* 千葉大学 生物活性研究所 酵素化学部、薬博

め、読取り誤差がないので、ルーチン分析に威力を発揮するばかりでなく、高度の研究用としても魅力ある機種である。さらに都合のよいことには、極めて容易に出力をコンピュータに接続できるので、データ処理が容易である。

現在、我々の研究室では酵素反応機構の解析に 200 形 エンザイムシステムと Yokogawa-Hewlett-Packard (YHP) Model-21 とを連結し、さらに厳しい測定条件下でも初速度の測定ができるように改造を加えて使用している。以下、酵素反応の初速度を測定する場合の問題点などを含めて、主に本機の研究用としての応用について述べる。

1. 酵素反応における初速度の測定

酵素反応は、基本的には次のような反応形式に従う。



ここで、E、S、P は各々酵素、基質、反応生成物を表わし、 k_1 、 k_2 、 k_3 は各々の反応ステップの速度定数である。この場合、S が分解される（あるいは P が生成される）反応の初速度 v_0 は次の式で求められる。

$$v_0 = \frac{V_m \cdot S}{S + K_m} \quad (1)$$

ここで、 $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ 、 $V_m = k_3 e_0$ (e_0 は全酵素濃度) この式は Michaelis-Menten の式と呼ばれている。

酵素の特徴を調べるには、まず K_m 及び V_m の測定が必要で、そのためには S の濃度を色々に変えた場合の v_0 の測定を行い、その値から K_m 及び V_m を計算する。このときに v_0 の測定がどの程度正確にできるかどうかは酵素反応解析の決め手となるわけである。

いま、酵素反応が開始されてから時間を追って反応速度 v がどのように変化するかを概念的に示すと、図 1 のようになる。時間に対する v の変化は、当然、酵素の種類と反応

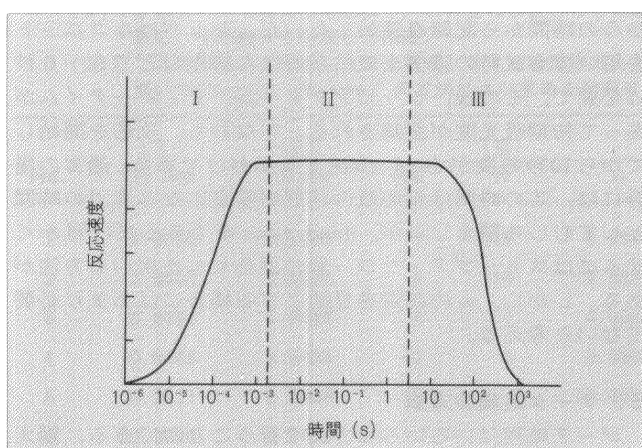


図 1 反応速度の時間的変化

条件によって異なるが、一般的には図 1 のように 3 つの領域に区分される。

第 I の領域は Transient phase と呼ばれ、酵素-基質複合体 (ES) の濃度が steady-state に到達する以前の段階で、 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ 秒の極めて早い時期での v の変化である。この領域では v と t との間に次のような関係式が成り立つ。

$$v = \frac{V_m \cdot S \{1 - \exp. [-(k_1 S + k_2 + k_3) t]\}}{K_m + S}$$

この場合の v の測定は通常の分光光度計では困難で、特に早い反応を測定できるように設計された高速度用の分光光度計が必要である。

第 II の領域は Initial-velocity phase と呼ばれ、(ES) 濃度が steady-state に達し、さらに反応の進行に伴う (S) 濃度の減少や (P) 濃度の増加が v にあまり影響を与えない範囲で、 v がほぼ一定に保たれる領域である。この場合の v は (1) 式によって示され、現在、酵素反応解析の大部分はこの領域での v 、すなわち初速度の測定によって行われている。

第 III の領域は Progress curve phase と呼ばれ、(S) 及び (P) 濃度の変化が v に影響を及ぼす領域で、最も簡単な場合には次のような式で示される。

$$v = \frac{V_m (S_0 - P)}{K_m + S_0 - P} \quad (2)$$

ここで、 S_0 は $t=0$ のときの基質濃度であるが、この式では P による酵素反応の阻害は考慮されていない。この領域では v は時間とともに減少していくが、各時間での v を測定することによってそのときの反応の初速度を計算することができる。この点については後で述べる。

2. よい条件での酵素反応の測定

我々が通常の分光光度計で測定しているのは図 1 の第 II から第 III 領域にかけての範囲である。第 II 領域の v が変化しない時間が長ければ長いほど v_0 の測定は容易となる。酵素反応を時間的に追跡すれば v は必ず小さくなっていくわけであるが、酵素の必須因子や S が十分に存在し、P がそれほど強い阻害を示さず、しかも酵素が比較的安定であるなど、酵素反応によい条件で反応を行う場合には数分間 v の変化しない条件を得ることはそれほど困難ではない。このような場合、200 形 エンザイムシステムでは v_0 の測定は時間によって変化しない部分の数字を直接読取るだけの簡単な作業となる。使用する酵素量やその他の測定条件を決める場合、どの程度少ない吸光度変化まで正確に測定できるかが重要な要素となってくるが、200 形 エンザイムシステムの場合、積算は 6 桁で行われており、表示の最小単位は 0.0001/min まで読取ることができ、S/N 比も積分回路によって改善される。したがって、通常の酵素反応測定には十分な感度と性能を備えている。

どの程度の範囲で v_0 が正確に測定されるかを確かめるには、使用する酵素量と測定される v_0 との間の直線関係を調べればよい。図 2 はその一例であるが、Vibrio alginolyticus から精製したグルコース-6-リン酸脱水素酵素を用い、酵素量と v_0 との関係を求めた。×印は低い活性値の部分拡大して示すために縦軸、横軸を各々 $1/10$ の値とした目盛で表示したが、この実験では吸光度変化量として 0.002/min から 0.12/min の間で直線関係が得られた。すなわち、60 倍以上の酵素量の変更が可能である。活性が 0.002/min 付近では記録される v_0 はかなりバラツキを示すようになるが、積算時間を 30 秒にすると一定の値を与えるようになり、測定の下限については積算時間の変更によってさらに低い活

性の測定が可能である。上限については、この実験条件では0.12/minくらいの速度からSの減少によって v は明らかに時間とともに減少して図1の第Ⅲ領域に入ってくる。この場合には、計算によって正確な v_0 を求めることが可能である（詳細は後述）。

測定条件の設定方法は、まず吸光度変化をレコーダでモニタし、その結果から、測定しようとする酵素反応や試料の特徴に応じて容易に積算をはじめるまでのラグフェーズ時間や積算時間を選択することができる。また、結果の表示についても、ファクタダイアルを備えている点はルーチン分析ばかりでなく研究用としても利用価値がある。

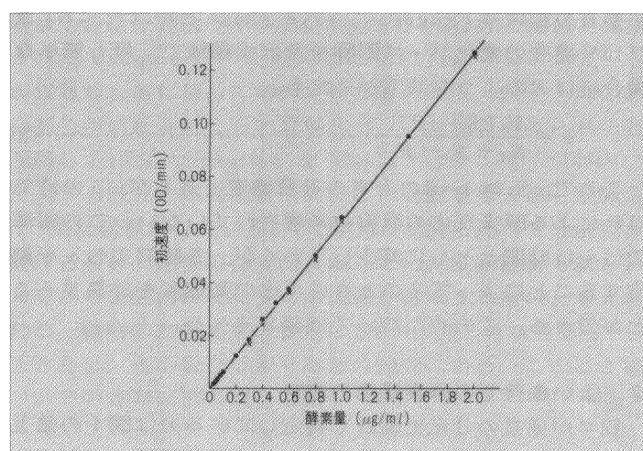


図2 酵素量と初速度との関係

測定条件は波長340nm (D₂ランプ)、スリット幅4nm、レスポンスmedium、温度30°C、ラグフェーズタイム3秒、積算時間15秒で、シッパセルユニットを使用。反応液1.0mlは0.25mM NADP⁺、2.5mM G-6-P、100mM KCl、20mM Tris-Bicine buffer (pH9.0)に図に示した酵素量を含む。×印は縦軸、横軸をそれぞれ v_0 の値とした目盛で表示。

3. 反応速度が一定である部分が少ない場合の測定

ところで、酵素の反応解析を行う場合、常に酵素反応にとってよい条件で反応を行うわけではなく、例えば、Sが K_m 以下の濃度で v_0 を求めたり、あるいは阻害剤や反応生成物の存在する条件で v_0 を測定しなければならない場合がある。このような場合には、当然 v は反応を開始してから早い時期に減少するから、反応初期のデータを多く記録することが必要となる。200形エンザイムシステムでは、記録が開始されてから最初の v が打出されるまでに、最短の積算時間15秒を用いても少なくとも35秒以上を必要とする。そこで、30秒以内の吸光度変化の情報をより多く得るために次項に述べるような改造を行った。

4. 200形エンザイムシステムの改造点

標準の200形エンザイムシステムを基本としているが、エンザイム演算器に1.5秒間積算した吸光度の平均値を3秒ごとに連続的にプリント記録できるような改造をもらい、さらに演算器からの出力はYHPモデル21パーソナルコンピュータに直結して容易にデータ処理ができるようにした。この連続吸光度記録方式でのタイムチャートは図3に示すとおりである。

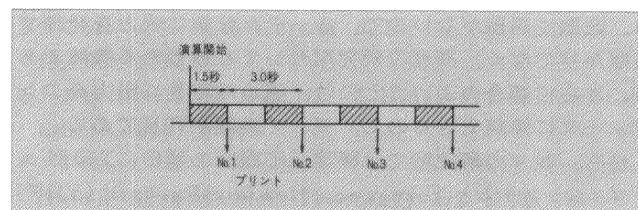


図3 連続吸光度記録方式におけるタイムチャート

この改造によって、測定を開始してから初期30秒以内の吸光度変化を記録することが可能となった。これらのデータを用いて直結したコンピュータで適当なプログラムによってデータ処理を行えば、 v_0 を求めることができる。

この方法により、考慮すべき2, 3の問題点が明らかとなった。第1には、3秒ごとの記録であるために、その時間内の吸光度変化が少なければ同じ値の記録が続くことになる。吸光度の最小表示単位は0.001であり、したがって少なくとも0.001/3秒、すなわち1分間に0.02以上の吸光度変化が必要である。この点については、表示桁数をふやすか、あるいは分光光度計からの出力を増幅してから演算器に入力する（例えば、0.1吸光度を1.0Vとする）ことによって解決できることがわかった。

第2には、記録される吸光度は1.5秒間積算の平均値であり、単に吸光度変化を連続的にデジタルに変換しているのとは異なるが、いずれにしても積算形微分方式はとれないのでS/N比の改善は犠牲にしなければならない。この点については、分光光度計本体が安定で、ノイズレベルが低いことが必要であるが、200形日立分光光度計はその目的に合うように設計されている。3秒ごとの記録がある程度のバラツキをもっている場合でも、データ処理の段階で統計処理がとれるので、正確な v_0 の測定は可能である。

第3は、サンプリング・システムについてであるが、特に初期のデータを重視する場合には酵素を反応液に加えてからの時間から記録を開始したいが、シッパセルユニットを用いても試料の吸引までにかくはん操作などで5～6秒は必要で、その後、シッピングタイム、ディレータイムがあって初期吸光度が記録される。すなわち、反応を開始してから10秒程度がdead timeとなるわけである。通常の場合には、この時間は反応液の状態が安定になるまでの時間としてむしろ望ましいが、dead timeをできるだけ短くするにはストップド・フロー形の混合セルを用いる方法がある。しかし、 v_0 の測定を目的とする場合にはあまり必要でないと考ええる。

5. データ処理の方法

データ処理はいろいろな方法で行うことができる。例えば、吸光度の変化量が十分に大きい場合には、3秒ごとあるいは3秒の n 倍の間隔で吸光度の差を計算し、1分当りの吸光度変化として表示する最も単純な方法がある。あるいは、200形エンザイムシステムの演算器の方法に準じて、各時間区分（3秒あるいはその n 倍）ごとに吸光度を積算し、その積算値の差から v を計算する方法もある。これは前者に比べると吸光度の変化量が少ない場合にも適用することができ、ノイズの影響もある程度平均化される。しか



し、いずれにしても、3秒ごとの吸光度測定を行うのは時間とともに v が減少していく場合であるから、図1の第Ⅲ領域のデータから v_0 を求める方法を用いるのがよい。この方法については、Cornish-Bowden¹⁾によって詳細な検討が行われている。以下、簡単にその方法を紹介する。

いま、(2)式を積分すると、次の式が得られる。

$$V \cdot t = P + K \ln [P\infty / (P\infty - P)] \dots\dots\dots(3)$$

ここで、 P は時間 t における反応生成物の濃度、 $P\infty$ は $t = \infty$ (あるいは $v = 0$)のときの P の濃度で、反応が完全に進む場合には S_0 (基質の初濃度)に等しい。いま、酵素反応の測定点の一組として (t_i, P_i) 、 (t_j, P_j) をとると、この値を(3)式に代入して V_{ij} 、 K_{ij} を計算することができる。したがって、この一組の測定値から初速度 v_{ij} が次の式で計算される。

$$v_{ij} = \frac{V_{ij} \cdot P\infty}{K_{ij} + P\infty}$$

このようにして測定点の各々の組から初速度を計算する。例えば、測定点が N 個あれば各々の組合せから $N(N-1)/2$ 個の初速度が計算される。これらの値の中から中央値を選ぶと、その値が統計的に最も真の値に近い初速度となる。

この方法の特徴は、(2)式からも明らかのように、反応中の基質の減少を計算に組入れているために反応が50%くらい進むまで適用でき、 $P\infty$ の推定誤差や酵素失活、あるいは反応生成物による阻害などによってもさほど影響を受けずに初速度が計算できる点である。計算方法もそれほど複雑でなく、プログラムしておけば、極めて容易に結果を得ることができる。

一例として、 v が時間とともに減少していく測定条件で行った実験の結果を表1に示す。この実験では、分光光度

表1 直線性が得られない場合の初速度の測定

- (I)：標準仕様で積算時間を15秒として記録した速度 (OD/min)
 (II)：3秒モードで吸光度を記録し、これを15秒区分ごとに積算し、その差から計算した速度。
 (III)：3秒モードで記録した吸光度を、 $3 \times n$ 秒間隔で n 個用いてCornish-Bowden¹⁾の方法により求めた初速度。

No.	(I)	(II)	(III)		
	15 sec	15 sec	sec	N	v_0
1	0.0520	0.0520	3	10	0.0533
2	0.0503	0.0496	6	10	0.0534
3	0.0481	0.0488	9	7	0.0540
4	0.0449	0.0456	12	5	0.0533
5	0.0421	0.0408	15	5	0.0532
6	0.0396	0.0400			

計からの出力を2台の演算器に接続し、一方は標準仕様で15秒の積算時間を用い、他方は3秒ごとに吸光度を連続的に記録させた。一見して明らかのように、速度が一定である部分がなく、この条件では、積算時間15秒で得られる値(I)から v_0 を読取ることはむずかしい。3秒ごとの記録でも、吸光度変化が少ないために単なる吸光度の差の計算か

らではよい結果は得られない。また、参考までに、3秒ごとの記録を用いて15秒区分ごとに吸光度を積算し、その差から v を計算すると、表1の(II)に示すように(I)と極めてよい一致を示している。しかし、演算器を用いた場合には S/N 比が改善されているので、(II)に比べ(I)のほうが明らかにバラツキが少ない。

3秒ごとの吸光度記録を用いて、前述のプログラムにしたがって v_0 を計算すると、表1の(III)に示すようにいずれの時間間隔でも同じような値を示した。この値は、積算時間15秒で得た値(I)をグラフにプロットして $t = 0$ の v を外挿した値とよく一致する。また、このプログラムを少し変形して、各時間ごとの吸光度の代りに演算器から打出される速度を用いても、同様のプログラム処理で正確な初速度を求めることができる。例えば、(I)の値から $N = 5$ で15秒間隔として計算すると $v_0 = 0.0533$ となる。

これらの結果から、 v が一定している部分の短い反応に對しても、3秒ごとの吸光度連続測定方法あるいは演算器の15秒積算時間で得た値をプログラム処理することによって、反応初速度が容易に計算できることが明らかとなった。

6. 演算器の汎用性

演算器は、200形分光光度計ばかりでなく、他の分光光度計に対しても出力を調整すれば容易に接続できる。我々は現在、356形 日立2波長分光光度計 (以下「356形」という)にも演算器を接続して使用しているが、極めて良好に作動している。また、356形の場合には吸光度のフルスケールのダイヤルを切換えるだけで出力が増幅され、特に3秒ごとの記録では容易に有効桁数をあげることができる。演算器の有効な使用方法は、その他にも色々考えられるであろう。

7. パーソナル・コンピュータについて

我々の目的は酵素反応機構の解析であるために、それを行うに十分な容量をもち、かつプログラム作成が容易なYHP Model 21を選択した。単に v_0 を求めるための計算だけであるならば、容量はそれほど必要でなく、前述のプログラムは100のデータを記憶させるとしても、 $N = 10$ までならば220レジスタ (= 880ワード)程度の容量で足りる。我々の研究室では、Clelandの方法²⁾に従い S 濃度を種々変えて測定した v_0 を直ちに統計計算を行って、 K_m 、 V_m 及びそのStandard errorを計算し、この結果をプロットを用いて作図させるプログラムを使用している。酵素反応に2つの基質が関係している場合に、各々のKinetic parameterを得るためには、Model 21で900レジスタの容量が必要である。直ちにこのようなデータ処理ができるのは、酵素反応の研究には大変有用で、研究上大きなメリットとなっている。

■参考文献

- 1) Cornish-Bowden, A. (1975) Biochem. J. 149, 305-312
- 2) Cleland, W. W. (1967) Adv. in Enzymol. 29, 1-32



解 説

“IN BEAM” 電子衝撃法によるマスペクトロメトリ

菱田真三郎* 佐藤 弘*

1. はじめに

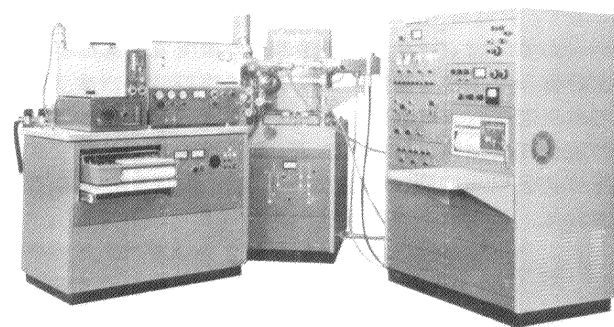
ガスクロマトグラフィ／マスペクトロメトリ（以下GC／MSという）は、医学、生化学、薬物代謝などの研究において、その有用性が高く評価されている。小形電子計算機によるデータ処理を含めたGC／MS／CPUシステムはGC／MSの実用価値を一段と高めた。

イオン化法についても、電子衝撃法（Electron Impact: 以下EIという）の短所、例えば、分子イオンを検出ににくいことなどを補うものとして、化学イオン化（Chemical Ionization: 以下「CI」という）も利用され、GC／MSの有用性はますます高くなってきた。しかし、ガスクロマトグラフィ、EIまたはCIはいずれも試料が安定に気化することを前提としている。特に、ガスクロマトグラフィにおいては、吸着、熱分解を避け、試料がカラムを安定に通過するように安定な揮発性誘導体に導くことが重要な課題となる。

生体成分、薬物及びその代謝物は一般に極性の高い化合物で、気化しにくいことが多い。また、安定な揮発性誘導体に導くことが困難であったり、誘導体生成の過程で構造上の変化を伴ったり、あるいは分子量の多大の増加をもたらしたり、測定を困難にすることが多い。本質的には、できるだけ、無修飾のまま測定することが望ましい。この点にGC／MSの限界があり、難揮発性物質の分析に再び直接試料導入法（Direct Inlet: 以下「DI」という）によるマスペクトル測定が注目されるに至った。

イオン化に試料の気化を必要としない電界放射形イオン化法（Field Desorption: 以下「FD」という）が注目される理由である。しかし、FDはスペクトルの再現性など測定上にやや難点があること、フラグメントイオンがほとんどないことによる情報不足など、FDのルーチン分析への利用には今しばらく時間を必要とする。FDの価値は試料を気化させる必要がないことであるが、反面ガスクロマトグラフィの高分離能と、GC／MSにおける分離と分析の同時化の利点を捨てることになる。極性物質の無修飾分離に適した液体クロマトグラフィとFDとの併用が注目されるのもその点にある。

FD測定には、特別のイオン源、エミッタの処理を必要とする他に、測定条件の設定にも煩雑な点が多い。そこで、従来のEIあるいはCIにより難揮発性物質を無修飾のまま簡単にマスペクトルを得るための試みが行われている。最近、注目されている“IN BEAM”電子衝撃法（以下「IB-EI」という）もその一つである。



RMU-6 MG形 日立質量分析計

小穴に入れられた試料がヒータにより加熱され、気化してイオン化室に導入され、熱電子線によってイオン化される。難揮発性の物質はこの過程で大部分熱分解して、試料自体のマスペクトルが得られない。安定な気化がむずかしい物質の場合、気化からイオン化までの距離、時間を短くし、熱分解を最少にとどめ、試料自体のマスペクトルを得る目的で、EIの変法が報告されている^{1)~5)}この方式は図2に示すように、電子線のごく近くに試料を挿入し、気化と同時にイオン化を行うものである。

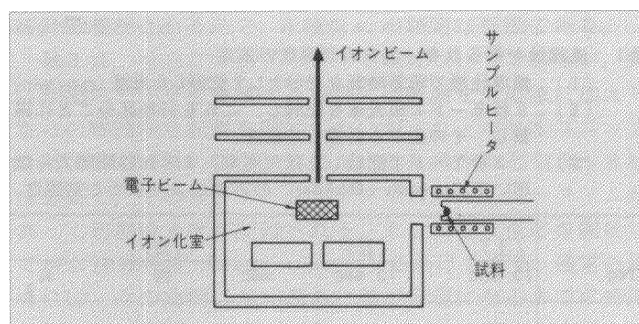


図1 通常の直接導入法

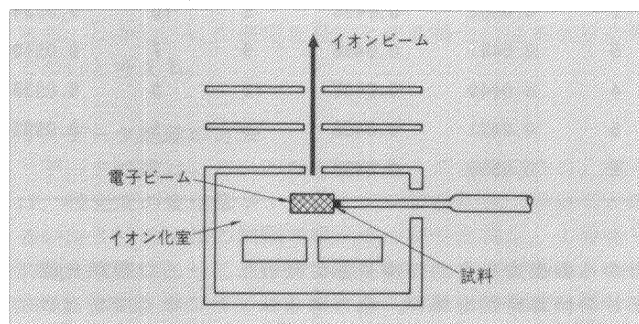


図2 “IN BEAM” 直接導入法

2. “IN BEAM” EI法

EIにおける通常のDIは図1に示すように、試料管先端の

*日立製作所 那珂工場応用技術センタ



装置及び測定法

日立RMU-6 MG形質量分析計(以下「RMU-6MG」という)の直接試料導入装置の試料管出し入れ機構のストロークを長くし、長い試料管の出し入れができるように改造した(図3)。石英製試料管は図4に示す寸法の大きさで、先端付近の表面を摺って凹凸をつけ、試料が付着しやすいようになっている。

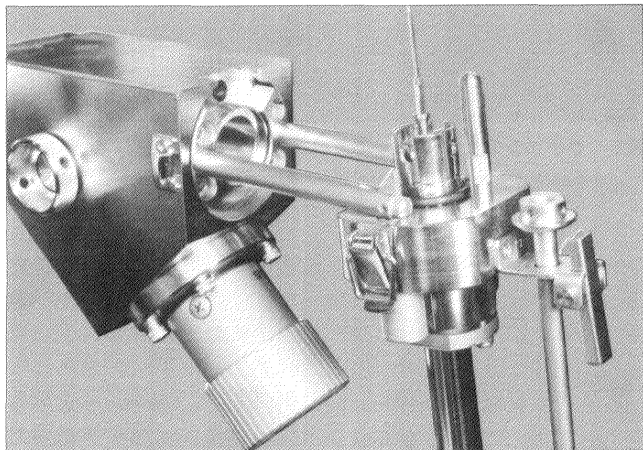


図3 IB法直接試料導入装置

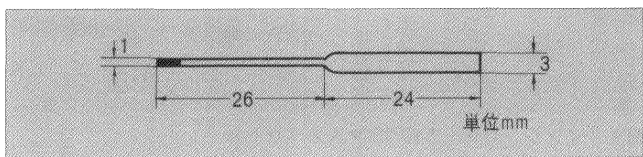


図4 “IN BEAM”用石英試料管 (mm)

試料を適当な溶媒に溶かした溶液を試料管の先端につけ、溶媒を蒸発させて試料を付着させるか、あるいは試料管の先端に直接固体試料をこすりつける。イオン化室への挿入は、通常の直接試料導入装置の場合と全く同様に操作する。微動機構によって試料管の先端を電子線に近づけると、ある点(電子線の中心より数mm手前)で、急激にイオン量が増加するので、すばやくスペクトルを測定する。この際、先端を完全に電子線内に入れるとイオン量は急激に減少する。

後述の測定例においては、

イオン化電圧: 10 eV, 20 eV, 70 eV

エミッション電流: 70 μ A

イオン加速電圧: 3.2 kV

イオン化室温度: 160~200°C

サンプルヒータ温度: 80~90°C

の条件で測定を行った。

3. 測定例

3.1 糖 類

大橋ら⁵⁾は、ペントース、ヘキソース、サッカロース、グルコサミン酸などの糖類を“IN BEAM”法(以下「IB」という)で測定し、 $(M+1)^+$ の観測を報告している。一例としてグルコースのEI, CI, IBのスペクトルを図5に示す。

大橋ら⁵⁾の報告によれば、グルコースのIBスペクトル測

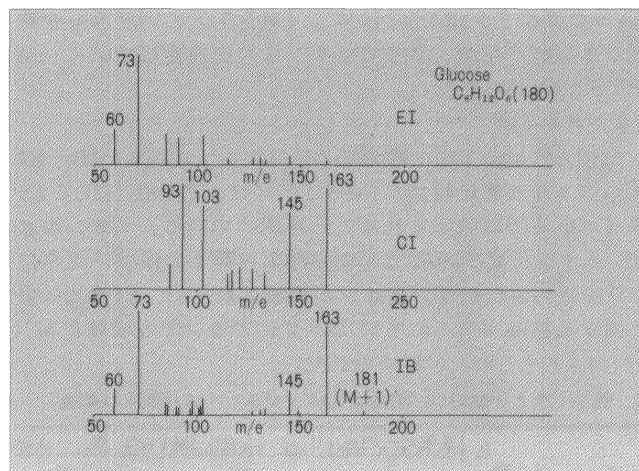


図5 グルコースのEI, CI, IBマスペクトル

定において、試料導入後一定時間ごとに測定(70 eV, イオン源温度 150°C)すると、順次 $(M+1)^+$ イオンが減少し、これと平行して熱分解が激しくなる。

イオン化電圧の増加に対しては、 $(M+1)^+$ イオンの強度は1.5% (10 eV), 0.43% (20 eV), <0.2% (40 eV, 70 eV)と減少する。以上のことから、イオン化電圧10 eVで測定開始直後において $(M+1)^+$ が最も大きいスペクトルが得られる。表1に各種糖類のIBマスペクトルの $(M+1)^+$ の相対強度を示す。

表1 DI⁺/IBによる $(M+1)^+$ イオンパターン係数

化 合 物	測定法	イオン化 電圧(eV)	イオン源 温度(°C)	基準ピーク (m/e)	$(M+1)^+$ (m/e) (%)
D-リキソース	DI IB	10	200 190	73 [*]	— 151 0.3
D-キシロース	DI IB	10	220 215	73	— 151 0.2
D-リボース	DI IB	10	210 220	73	151 0.4 151 1.3
L-アラビノース	DI IB	10	200 180	73	— 151 0.8
D-グルコース	IB	10	180	73	181 1.5
D-マンノース	IB	10	200	73	181 0.4
D-フコース	IB	10	180	143	165 1.6
2-デオキシ-D-グルコース	IB	10	205	86	165 +**
2-デオキシ-D-ガラクトース	IB	10	200	103	165 +
サッカロース	IB	10	240	163	343 0.6
グルコサミン酸	DI IB	10	250 190	140 99	— 196 39
グルコサミン塩酸塩	DI IB	20	200 180	(36) 72	180 + 180 0.7

注 * DIの場合 M^+ は全く観測されない。

** +は存在は認められるが、強度が極めて小さいことを意味する。

また、大橋ら⁵⁾は、擬二糖類のネアミン、ネブラミン、4'-デオキシネアミンをIB法で測定し、DI($(M+1)^+$ が得られる)⁶⁾に比べて $(M+1)^+$ のパターン係数が数倍から数十倍大きいことを見出した。

擬三糖類のカナマイシンA、カナマイシンB、トブラマイシン、リボスタマイシン、キシロスタチン、4'-デオキシ



-キシロスタチンはDIでは M^+ 、 $(M+1)^+$ のいずれもが観測できなかったが、IB法ではすべての化合物について $(M+1)^+$ が確認された。

3.2 アミノ酸

大橋ら⁴⁾は、アミノ酸類のDI-EIスペクトルとIB-EIスペクトルとを比較し、 $(M+1)^+$ イオンの強度がIB-EIスペクトルでは強められることを述べている。イオン源温度、イオン化電圧20eVでの測定結果を表2に示す。従来はFD法でのみ $(M+1)^+$ イオンが観測され、CI、EI法では M^+ に関する情報が得られていないクレアチンでも明確にM及び $(M+1)^+$ イオンが認められた。

表2 アミノ酸のDI/IBによる M^+ 、 $(M+1)^+$ のパターン係数

アミノ酸	基準ピーク(m/e)		M^+ 、 $(M+1)^+$ %			
	DI	IB	M^+		$(M+1)^+$	
			DI	IB	DI	IB
グリシン	30	30	9	17	—	4
アラニン	44	44	—	0.3	—	1
バリン	72	72	—	—	—	3
スレオニン	75	75	—	—	1	5
イソロイシン	87	87	0.3	0.3	1	5
アスパラギン酸	88	88	—	—	1	8
フェニールアラニン	74	74	3	3	1	19
メチオニン	131	150	29	9	4	100
オキシプロリン	86	86	0.6	—	1	76
クレアチン	113	113	2	3.5	—	4

また、アミノ酸のIB-EIスペクトルで $(M+1)^+$ イオンが強調されることから、約10倍量の NH_4Cl を加えて測定したところ、 $(M+1)^+$ イオンが消失し、DI-EIスペクトルと酷似するスペクトルが得られた。この現象について考察が述べられているが、尚今後の検討が必要であろう。

3.3 Nucleosides

ヌクレオシドは、一般にDIによっては分子イオン M^+ または $(M+1)^+$ イオンを観測しにくい化合物であるが、IBによれば M^+ 、 $(M+1)^+$ を十分に観測することができる。ただし、リン酸エステルとなったヌクレオチドはIBによっても熱分解が大きく、明確なマススペクトルを得ることはできなかった。

図6にアデノシン、図7にグアノシン及び図8にイノシンのEI、CI、IBスペクトルを示す。

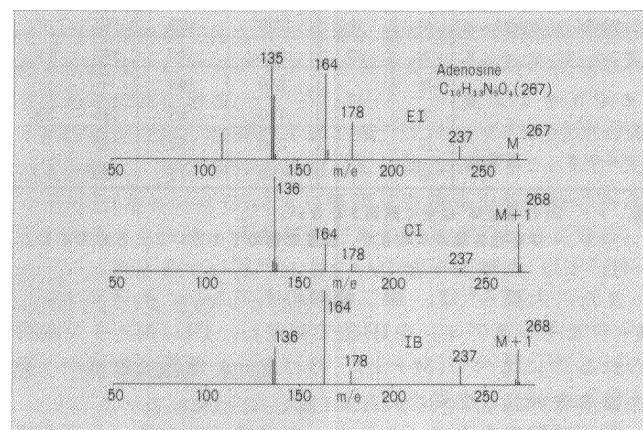


図6 アデノシンのEI、CI、IBマススペクトル

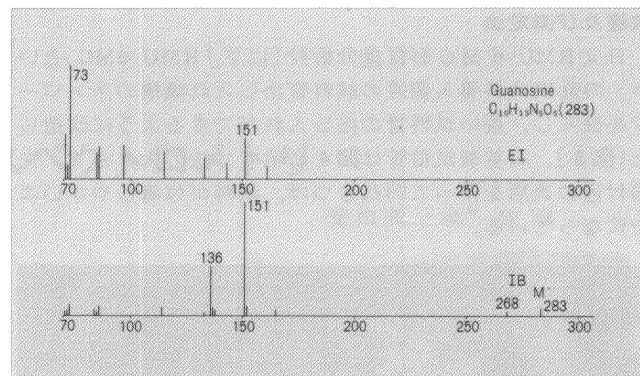


図7 グアノシンのEI、IBマススペクトル

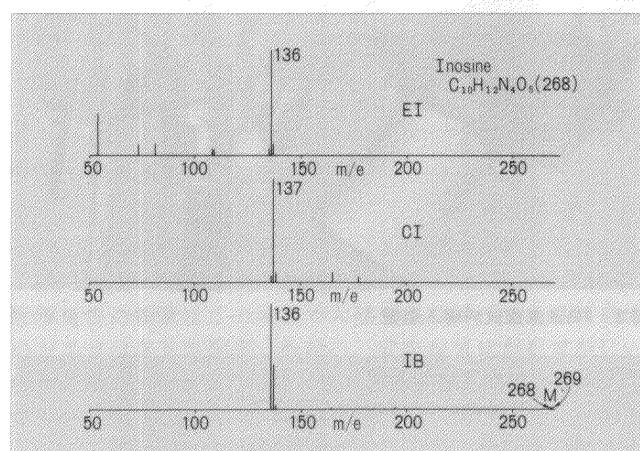


図8 イノシンのEI、CI、IBマススペクトル

3.4 その他

エフェドリンは、EIでは分子イオンが全く観測されず、CIによって $(M+1)^+$ イオンが明りように観測されることは、CIの有用性を示す代表例である。エフェドリンをIB-EIで測定すると、CIよりも簡単な $(M+1)^+$ とm/e 58の2本のピークのスペクトルとなる(図9)。また、類似構造をもつノルアドレナリンは、エフェドリンと異なり、DI-EIでも M^+ が観測されるが、そのIB-EIスペクトルはDI-EIスペクトルと酷似する(図10)。

ステロイドは、一般にDI-EIでも分子イオン(M^+)が

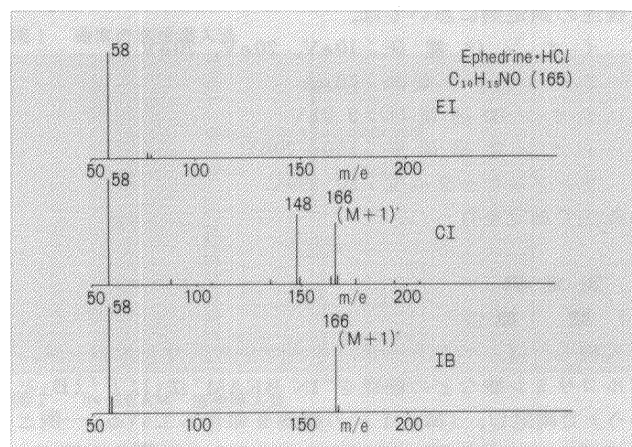


図9 エフェドリンのEI、CI、IBマススペクトル

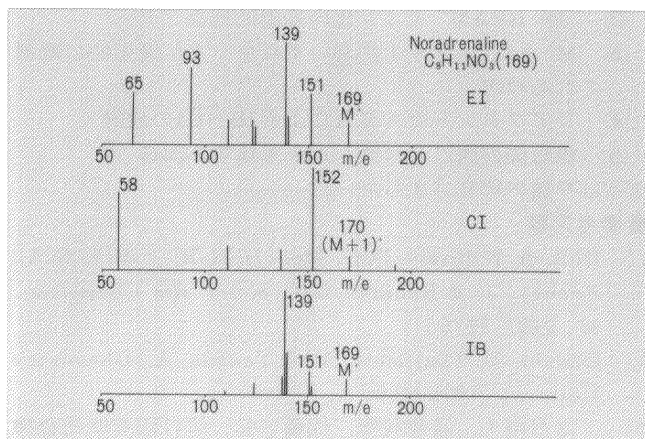


図10 ノルアドレナリンのEI, CI, IBマスペクトル

容易に観測され、特にCIを必要としないことが多い。また、IB-EIで測定すると、 M^+ あるいは $(M+1)^+$ がDI-EIに比べてパターン係数が大きくなる程度で、DI-EIとほとんど差がない。その一、二の例を図11～図13に示す。 M^+ になる場合と $(M+1)^+$ になる場合とがあるが、試料の蒸気圧、試料量その他の測定条件の差も介在するので、構造上の差と関係づけることはできない。

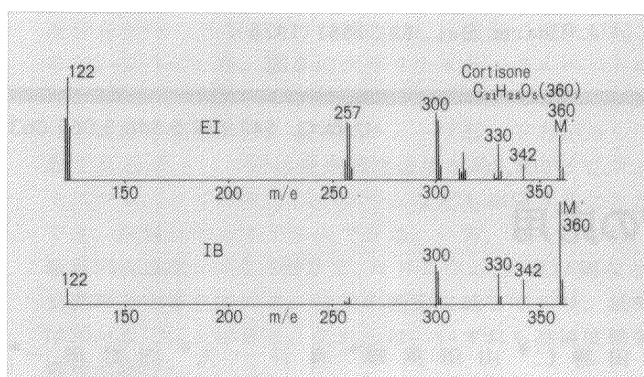


図11 コルチゾンのEI, IBマスペクトル

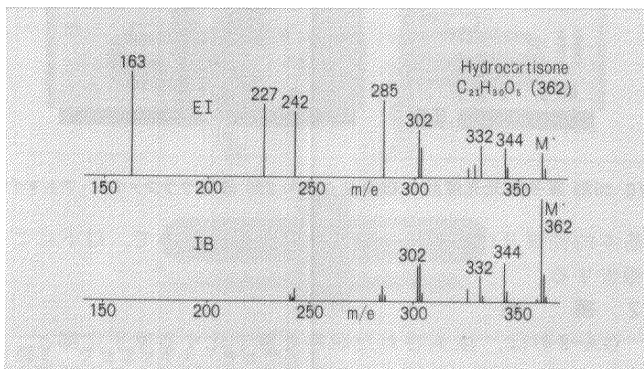


図12 ヒドロコルチゾンのEI, IBマスペクトル

二之宮ら³⁾は、IB法のカルボン酸への応用例として、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)及びその二ナトリウム塩をIBで測定し、それぞれ M^+ m/e 292及び M^+ m/e 336を観測している。また、クエン酸も M^+ を与えることを報告している。

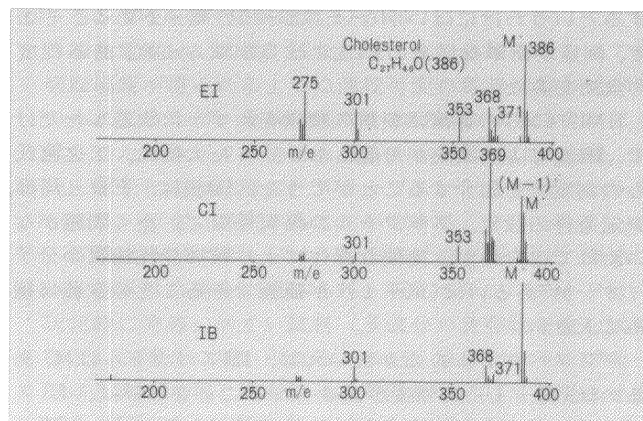


図13 コレステロールのEI, CI, IBマスペクトル

さらに、二宮ら³⁾は、CarbidopaのIB-EI測定に際して、データ処理システム(日立RMU-6MG/002B)を使用し、スペクトルの経時変化を調べた。試料導入後、直ちに繰返し磁場掃引を行い、記憶された多数のスペクトルを図14のように表示し、 $(M+1)^+$ イオンに限られた時間に強く出現することを確認した。その後で出現する分子イオンより高質量域のピークは、おそらく試料の熱分解を示すものであろう。

なお、大橋ら⁵⁾もグルコース測定で報告しているように、IB法において、どの時点でのスペクトルが試料自体のスペクトルであるかの判断には注意が必要である。酸化に問題のない試料のDI-EI測定時にも、繰返しスキャンによるスペクトル収集を行うと、上記の例のように顕著ではないが、時間とともにパターン係数が変化する(試料圧の変動に伴うものではない)ことはしばしば経験するところである。

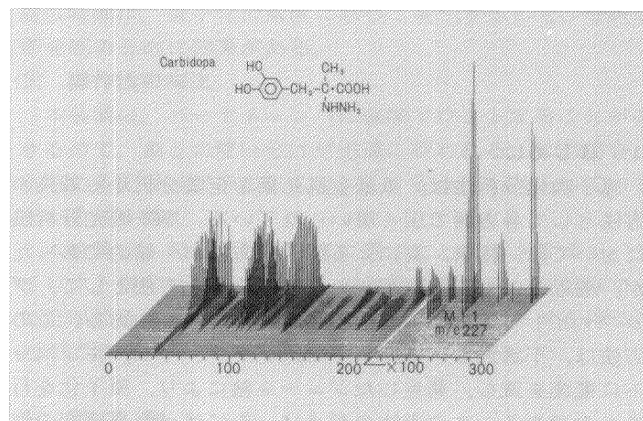


図14 カルビドーパIBマスペクトルの変化

4. まとめ

従来、熱に不安定な難揮発性物質のマスペクトルを得ることは極めてむずかしいとされ、半ばあきらめていた面もあった。しかし、Beckey, SchultenらによりFDの開発が進むとともに難揮発性物質のマスペクトル測定も可能となってきた。しかし、FDの測定には、従来の装置をかなり変更しなければならないこと、エミッタの製作などが煩雑なこと、測定上にも未知の要素もあって、簡単に測定



するというわけにはいかない、といった難点がある。そこで、測定が簡単な従来のEI法の改良が試みられ、ある程度の成功をみた。

RMU-6MGの直接試料導入機構をわずかに改造しただけで、IB法による測定が可能となり、また大橋氏、二之宮氏らの測定例を紹介することができた。IB法は、FDと同様、測定条件の設定、スペクトルの再現性など、全く問題がないわけではないが、簡便な操作により難揮発性物質の分子イオン M^+ あるいは $(M+1)^+$ が観測できることの意義は極めて大きい。

マスマスペクトルの面からいえば、IBスペクトルは M^+ あるいは $(M+1)^+$ の強度が大きくなることを除けば、EISスペクトルとほとんど変わらない。フラグメントイオンが現われることはスペクトルの与える情報が多いことを意味し、未知物質の同定、推定には有利である。

Kuhlmannら⁷⁾は、従来のDI法測定に当り、イオン化室を密閉形として、試料分子と生成したイオンとの間にイオン-分子反応を行わせ、CIとEIの重畳したマスマスペクトルを得、情報の質的向上を図っている。

特殊な装置を必要としないことと簡単な操作性を考えると、IB法の将来性は高いものと予想されるが、IB法の現状から見て、次のようにまだ検討すべき問題も多いと思われる。

(1) 適用範囲の拡大

- (2) “IN BEAM”イオン化の基礎的把握
 - (3) M^+ または $(M+1)^+$ のいずれか一方が優先的に観測される理由
 - (4) リアクタントガス導入によるIB-CIの検討
 - (5) 短時間の間にスペクトルが変化する問題
- などは今後の研究にまちたい。

■ 参考文献

- 1) Dell, A. Williams, D. H. Morris, H. R. Smith, G. A. Feeney, J. & Roberts, G. C. K.; J. Am Chem Soc. **97**, 2497 (1975)
- 2) Ohashi, M. Tsujimoto, K. & Yasuda, A.; Chemistry Letters; (1976)439
- 3) 二之宮昭夫, 岩井利明, 佐藤 弘; 第11回有機化合物のマスマスペクトロメトリ討論会, 講演予稿集 121ページ (野田, 1976)
- 4) 大橋 守, 中山 登, 辻本和雄; 同上討論会, 講演予稿集 124ページ
- 5) 山田修三, 工藤 均, 大橋 守; 同上討論会, 講演予稿集 127ページ
- 6) 長縄 博, 高橋良和, 酒井郁男; 第9回有機化合物のマスマスペクトロメトリ討論会, 講演予稿集 106ページ (仙台, 1974)
- 7) Kuhlmann, G. F. Chang, T. L. & Nelson, G. L.; J. Pharm. Sci., **64**, 1581 (1975)

U.D.C. 543.422.5:546.3.062.063

GA-2形日立グラファイト・アトマイザの応用

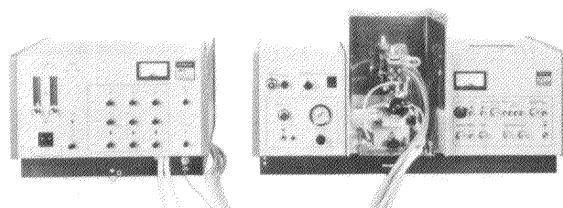
1. はじめに

原子吸光分析法は、微量金属元素を定量分析する最良の方法として各方面で広く用いられている。原子吸光分析法においては、従来、炎による原子化方法が一般的であったが、最近、より高感度測定のための原子化方法として、グラファイト・アトマイザ法の利用が拡がりつつある。この方法は、不活性ガス雰囲気中で、グラファイト・キューベットに電流を流し、発生したジュール熱により、原子化を行うものである。この方法の利点は、先に述べた高感度の他に、次のことがあげられる。

- (1) グラファイト・キューベットに流れる電流を制御することにより、乾燥、灰化、原子化の温度プログラムを組むことができ、試料の前処理を簡略化する。
- (2) 試料量が10 μ lですみ、微量試料の測定が可能である。

我々は、これらの利点を有するGA-2形日立グラファイト・アトマイザ（以下「GA-2形」という）を用いて、その

原田勝仁* 山田英雄* 森谷一夫* 内野興一*



170-50形 原子吸光度計と組合せたGA-2形 日立グラファイト・アトマイザ

基本的性質及び応用について検討を行ったので、以下にご報告する。

2. 構 造

GA-2形は、注入された試料を原子化する原子化部と、原子化部に供給する電力や不活性ガスを制御する電源部とから成っている。図1に原子化部の断面図を示す。本装置は、特に測定精度、安全性及び操作性の向上について十分注意して設計製作された。以下にその概要を記す。

(1) 測定精度の向上

(a) 均一加熱方式

* 日立製作所 那珂工場 光学装置設計部

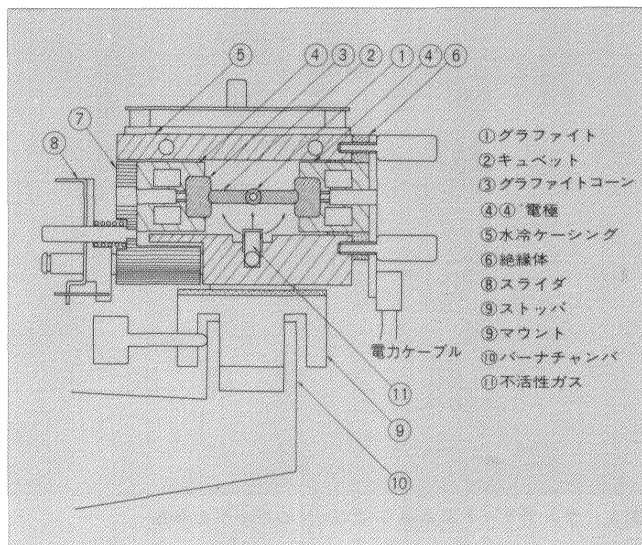


図1 原子化部の断面

有機物を多量に含む試料を分析する場合、灰化段階に多量の煙が発生する。光軸方向に低温の部分が存在すると、その部分に煙が凝縮し、原子化段階に再蒸発して測定精度を低下させる。

本装置ではグラファイト・キュベットの光軸方向の温度分布が均一となるような構造とし、前記の現象が起こらないようにした。図2にグラファイト・キュベットの外形を示す。図2に示すように、グラファイト・キュベットには2種類あり、上方がチューブ形、下方がカップ形である。チューブ形は最高到達温度が約2,800℃で、アルミニウム、ケイ素及びバナジウムなども測定することができ、試料は20 μ lまで注入できる。一方、カップ形は、最高到達温度が約2,500℃で、カドミウム、鉛及び銅など、公害源となる危険の多い元素の測定に適しており、試料は50 μ lまで注入できる。これらは、いずれも高純度精製処理が施されている。

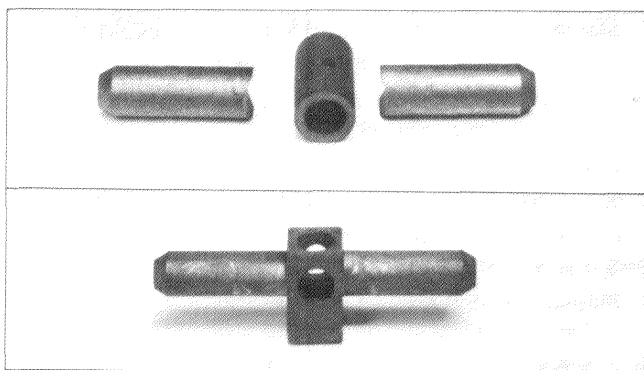


図2 グラファイト・キュベット

b) 定電流制御回路

サイリスタによる定電流比例制御方式を採用しており、電流値を常に安定に保つことにより、グラファイト・キュベットの酸化消耗による抵抗値の変化や接触部の抵抗の変化が測定に及ぼす影響を最小に抑えているから、精度の高い分析を行うことができる。

(c) ランプモード(傾斜加熱モード)

加熱電流は、乾燥、灰化、原子化の各段階において適切な温度が得られるように連続可変の電流設定方式が用いられているが、急激に温度をあげるよりも、徐々に上昇させたほうがよい場合もある。本装置には、乾燥、灰化、原子化の各段階に、ステップモードとランプモードがあり、任意に選択することができる。

乾燥のランプモードは、乾燥時に泡立ったり、突沸しやすい試料の場合に用いられ、灰化のランプモードは、灰化時に突沸しやすい試料(多成分の共存物を含む試料など)の場合に用いられる。また、原子化のランプモードは、測定元素と共存物とを時間をずらして蒸発させる場合(灰化で共存物を除去できない場合)に用いられる。

このステップモードとランプモードを組合せて、温度をプログラムすることにより、試料に最も適した測定条件で分析することができる。

(d) オートクリーニング機構

原子化終了後、約3秒間、原子化電流の2割増の電流が流れ、残留物を除去し、残留物による分析精度の低下を防ぐオートクリーニング機構が装備されている。

(2) 安全性の向上

装置の安全性を確保するため、不活性ガスの流し忘れによるグラファイト・キュベットの消耗を防ぐ不活性ガス圧力監視、冷却水の流し忘れによる原子化部の過熱を防ぐ冷却水圧力監視、原子化部の異常加熱を防ぐケーシング温度監視及び電源部内部の異常を検知する電源異常監視などがあり、安心して使用できる。この他に、キュベットが冷却する前に試料を注入すると、試料が無駄になるばかりでなく、ビベットの先端を溶かす場合があるが、このようなミスを防止するため、冷却する時間がランプで表示される。表示時間は、原子化の温度に応じて変化するので、分析効率を高めるのに効果がある。

(3) 操作性の向上

本装置は、パーナチャンバに直接マウントすることができるので、炎との使い分けが迅速に行われる。この場合、炎用の各配管は従来のままでよく、安全性も向上している。

(4) その他

本装置は、記録範囲を任意に選ぶことができるほか、ダイレクト信号とピークホールド信号のどちらかを記録することができる。これにより、わかりやすいデータを得ることができる。

3. 測定例

以下の測定には、170-10形及び170-50形 原子吸光光度計を使用し、不活性ガスにはアルゴンを用いた。

3.1 原子化温度と感度の関係

Al, Cd, Cu, Ni, Cr, Pbについて、原子化温度と感度の関係を調べた。キュベットはチューブ形を用い、アルゴンガス流量は2l/minとした。試料注入量は10 μ lである。その結果を図3に示す。これより、Al, Ni, Crは2,800℃、Cuは2,700℃、Pbは2,200℃、Cdは1,800℃が最適温度であることがわかる。

3.2 不活性ガス(アルゴン)流量と感度の関係



前記と同じ試料について、アルゴン流量と感度の関係について調べた。キュベット、試料濃度及び試料注入量は、3.1の場合と同じである。その結果を図4に示す。図4から、アルゴン流量は2～3 l/minが適当である。

3.3 ランプモードの使用例

原子化のランプモードを用いて、測定元素と共存物のピークを分離する例を図5に示す。測定元素にCdを選び、NaClを1,000 ppm共存させた。原子化が開始して、 t_1 時間後にCdが、 t_2 時間後にNaClのピークがあり、CdとNaClのピークが時間的にずれていることがわかる。

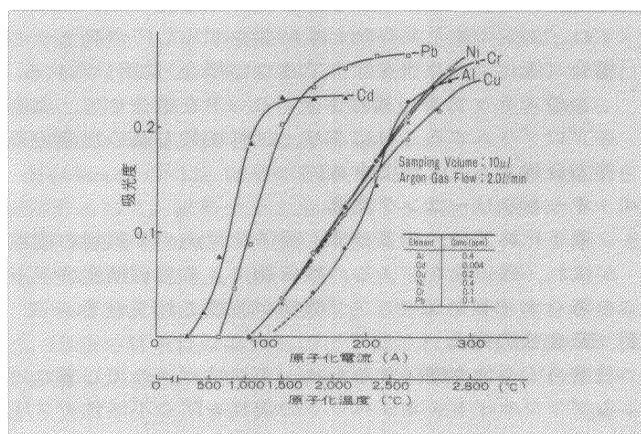


図3 原子化温度と感度との関係

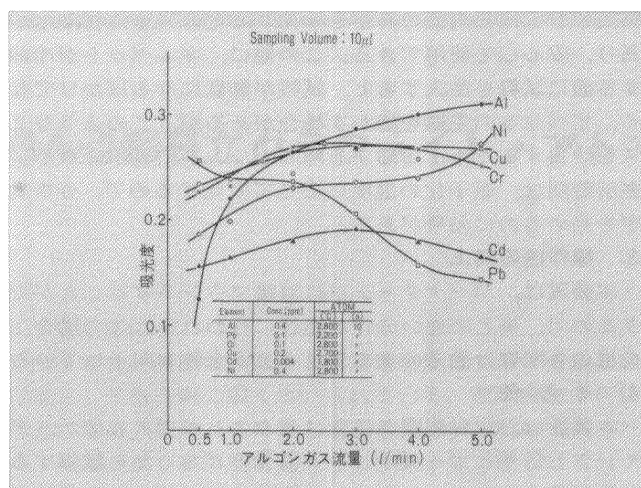


図4 アルゴン流量と感度との関係

3.4 高感度分析の例

グラフアイト・アトマイザを用いると、炎を用いた場合より、一般に感度が向上する。図6にCdの検量線を示す。

3.5 果樹葉の分析

NBSの標準試料 (SRM-1571) 中の鉛とカドミウムについて測定をし、表示値とのクロスチェックを行った。

よく乾燥した試料0.5gをビーカー中で硝酸と蒸留水を加え、約250℃のホットプレート上で加熱分解し、その後、全体を蒸留水で25mlとし、これを試験液とした。また、試料を加えずに、硝酸と蒸留水を同量とり、同じ操作を行って空試験液とした。測定法は標準添加法により、キュベットはチューブ形を用いた。

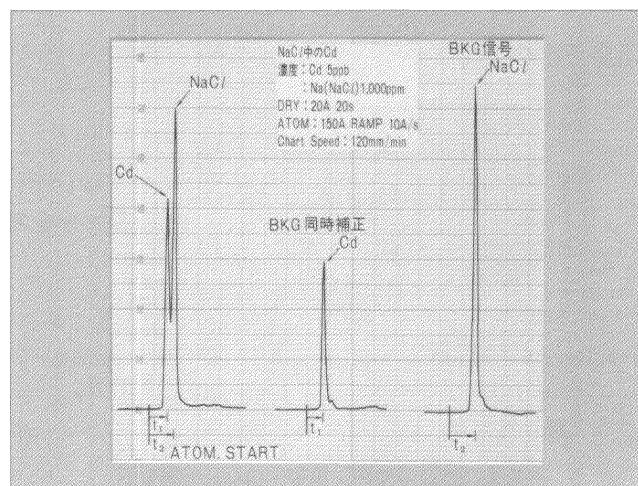


図5 ランプモードによるCdとNaClのピークの分離

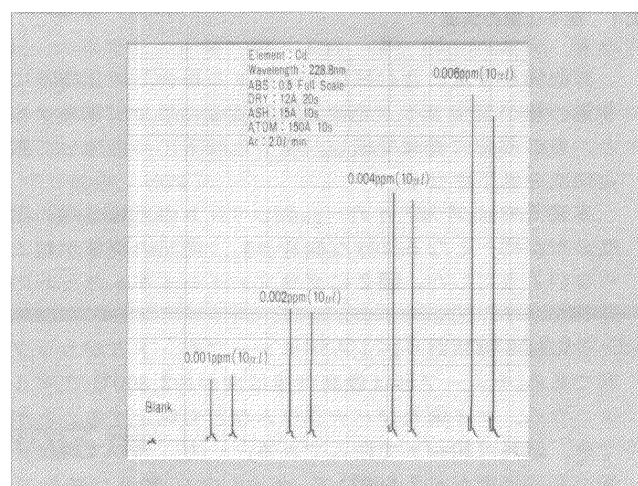


図6 Cdの検量線

3.5.1 鉛の分析

試験液を20倍に希釈し、鉛標準液を0, 0.05, 0.10 ppmになるように添加した。測定結果を図7に示す。測定の結果、NBSの表示値45±3ppmに対し、44ppmと得られた。

3.5.2 カドミウムの分析

試験液を4倍に希釈し、カドミウム標準液を0, 0.0005, 0.001, 0.002ppmになるように添加した。バックグラウンド同時補正を用いて測定を行った。その結果を図8に示す。測定の結果、NBSの表示値0.11ppm±0.02ppmに対し、0.105ppmが得られた。

4. おわりに

以上述べたように、GA-2形を用いることにより、試料中の金属を精度よく定量することができる。また、バックグラウンド同時補正が可能な装置 (例えば、170-50形原子吸光光度計) を用いることにより、測定時間の短縮ばかりでなく、分析精度を向上することができる。

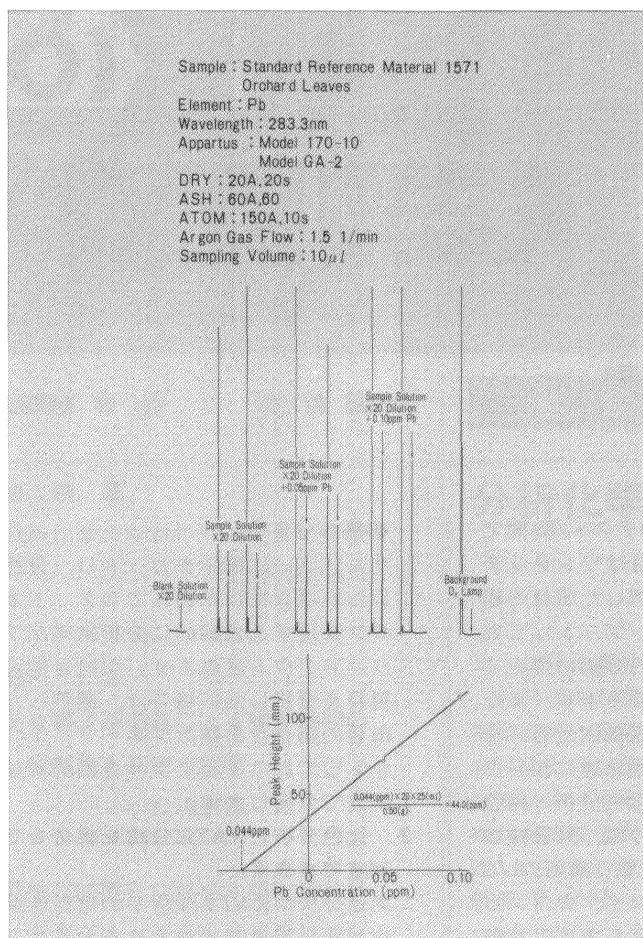


図7 果樹葉中のPbの分析

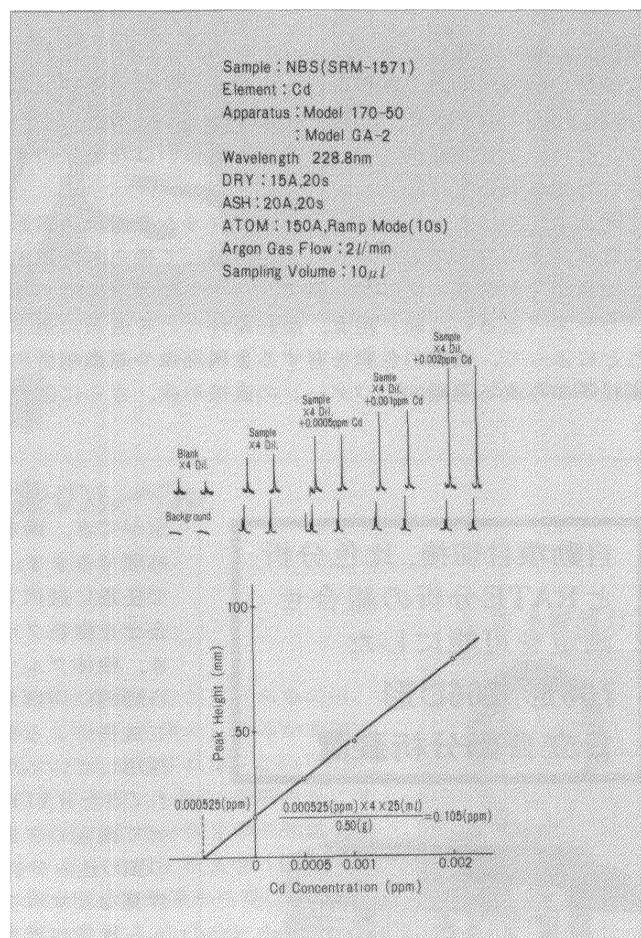


図8 果樹葉中のCdの分析

Topics

光照射によりガラス表面に析出する金属銀粒子と金属画像

丸野重雄*

カルコゲナイドガラスへの金属の熱拡散や光ドーピング現象が報告されているが、われわれはそれとは逆に、銀を多量に含有するカルコゲナイドガラス及び薄膜に、ガラスの固有吸収端よりも短波長の光を照射することによって、ガラス内部の銀イオンがガラス表面に金属銀として析出する現象 (Metal Photosurface Deposition; 以下「PSD」という) を見出し、析出銀粒子による金属画像の直接形成が可能であることを明らかにした。PSD現象は、過剰の銀を含有するガラス(あるいは非晶質)特有の現象と考えられ、析出銀粒子の粒径、形態及び表面分布は、ガラス組成、照射光の強度、波長及び雰囲気などによって影響される。

図1は、鏡面に研磨したAs-S-Ag系バルクガラス板に水銀灯光を照射して、比較的大きな金属銀粒子が、そのガ

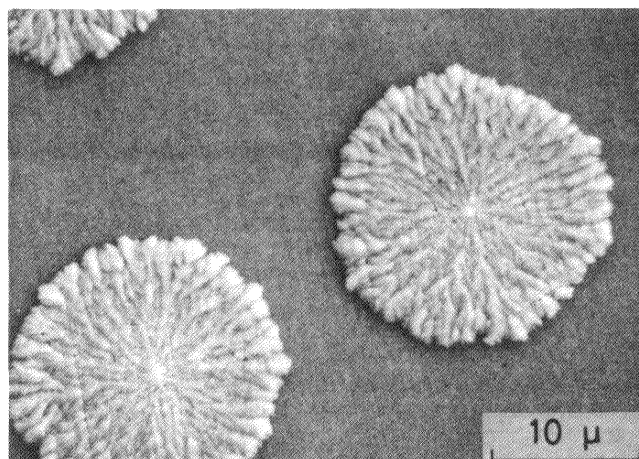


図1

* 名古屋工業大学 材料研究所 助教授



ラス表面に析出・成長した場合の走査電顕写真である。金属銀の結晶核と思われる芯 (core) を中心として、放射状に伸びた樹枝状結晶が脈理をもって接合し、二次元球状晶 (cylindrite) の形状に、直径約14 μ mの大きさに成長している。なお、光学顕微鏡下では、円盤状あるいは花卉状の美しい外観を呈している。

図2は、各パターン(文字)のポジフィルムをガラス表面に置き、そのフィルムを通して光を照射して得られた析出金属銀粒子から成る文字の一例で、バックはガラスである。

ガラス(あるいは膜)組成、照射条件などを適当に選ぶことによって、適度の色調を有する金属画像や超微細析出銀粒子から成る連続的なパターンの直接形成、さらに像の

定着(固定)、消去及び再生が可能であることから、新しい機能材料としての応用が種々検討されている。

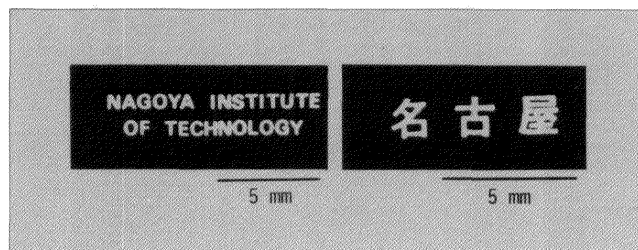
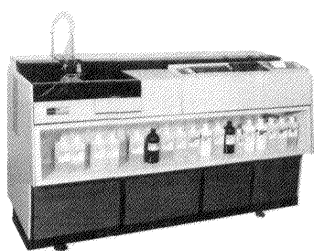


図2

自動項目切換, 比色分析 とRATE分析の組合せ 測定を可能にした

706形/706D形 日立自動分析装置



706D形日立自動分析装置

さきに、臨床検査室の御要望に応え、400形、500形、716形日立自動分析装置を発売しユーザの方々より格別な御愛顧をいただいておりますが、このたび、これら自動分析装置の安定した性能と豊かな経験を生かしたシリーズ製品として、706形/706D形日立自動分析装置を発売しました。706形は最大6項目、706D形は最大12項目までの測

定ができ、両者とも240テスト/時間で処理できます。分析項目はワンタッチで任意に選択でき、選択した項目の組合せを複数グループインプットしておき、検体グループごとの分析に合せて自動的に切換えて測定できます。また、二波長による反応容器直接測光方式を採用しているため、最近急速に注目されてきたRATE分析も比色分析と組合せて測定できます。その他、緊急検体の割り込み分析、検量線曲り補正、A/G計算などすべて内蔵のマイクロコンピュータで処理され、測定もすべて自動化されています。さらに、外部のコンピュータシステムと接続して分析データのオンライン処理、集中管理も可能です。本装置はこのような機能を備え、少数検体で多項目処理を必要とする中、小病院でのルーチン検査、検体数の多い大病院、検査センターでのサブルーチン検査用、または生化学の研究用として最適な装置です。

■特長

1. 分析項目はワンタッチで任意に選択でき、選択した項目の組合せは、検体グループごとに次々と自動的に

切換わります。

サンプラーに検体をセットし、分析したい項目だけを選んでスタートボタンを押すと自動的に分析結果がプリントアウトされます。引続き他の項目を分析したい場合は、選択した項目の組合せを複数グループインプットしておくことにより自動的に切換えて分析します。

2. 比色分析とRATE分析を組合せて測定できます。

比色分析かRATE分析かの情報を操作パネルでインプットしておくことにより、測定が始まると自動的にマイクロコンピュータが判別し対応した演算処理を行います。

3. 緊急検体の割り込み処理ができます。

緊急検体を分析する必要が生じた場合、測定中の検体順序を乱すことなく容易に割り込ませることができます。

4. マイクロコンピュータの内蔵により測定がすべて自動化されています。

5. 信頼性の高いコンケーブグレーティングを分散素子として用い、すぐれた二波長測光方式を採用していますので安定した測定値が得られます。

〈編集後記〉

■本号の巻頭言は、波多野先生にお願しました。分析化学における測定対象のレベルと分析法との関係を明らかにしながら、ご専門の立場から、今後の分析化学のテーマと方法論について述べて頂きました。

■本号の報文では、畝本先生に、200-20形エンザイムシステムによる酵素反応解析及びデータ処理について、詳細に報告して頂きました。

■本号の解説では、IB-EI法の必然性とその詳細、並びに応用例について解説いたしました。

した。

■本号のトピックスでは、丸野先生より、金属学会賞に輝く金属銀粒子のSEM像(シルバースラワー)と金属画像についてご提供いただきました。

本NEWSに関するお問合せは、下記へご連絡ください。

日製産業株式会社 精機部
東京都港区芝西久保桜川町2 第17森ビル
〒150 TEL (03) 501-5311

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
SPRING 1977, Vol. 20 No. 1

発行 昭和52年4月1日

(年4回 発行)

発行人 湯川 清

編集人 菱田眞三郎 岩井孝之

発行者 株式会社 日立製作所 計測器事業部
東京都港区芝西久保桜川町2 第17森ビル
〒105 TEL (03) 501-7201

印刷所 日立印刷株式会社