技術の日立
HITACHI
THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
AUTUMN 1983
VOL.26 NO.3

目 次

報 文

抗酸菌細胞壁脂質(ミコール酸)および腫瘍細胞膜糖脂質の分析……………………………………矢野郁也… 1

ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)の励起一重項の解析……………………………會沢勝夫 大畑 進 加藤治文 早田義博 山下幹雄 小林俊介 佐藤卓蔵 嶺岸久子… 10

HPLC-ECDによる生体成分の分析法……………………………………入山啓治 岩本武夫 吉浦昌彦… 14

解 説

150-20形日立ダブルビーム分光光度計とその応用例……小森律夫 百目鬼秀子 皆川定雄 加地弘典 遠山恵夫 内野興一… 21

トピックス

IMA-3形 日立イオンマイクロアナライザ………………………………… 9
M-80B形 日立二重収束質量分析計システム………………………………… 19
Z-6000/Z-7000形日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計……………… 20
昭和58年度日本電子顕微鏡学会(学術講演会・展示会)…………………… 27
第44回分析化学討論会開催さる…… 27
昭和58年度 全国発明表彰「科学技術庁長官賞」を受賞……………… 28
臨海プラズマ試験装置JT-60周辺プラズマ空間分解測定サブシステムを受注………………………… 28

報 文

U.D.C.〔543.51:543.544.42.084.83〕:577.115.3
576.314.2.088.1:〔579.873.2+576.385.5〕

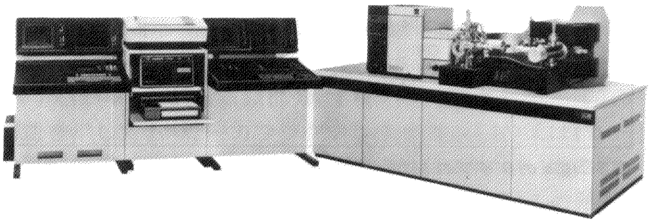
抗酸菌細胞壁脂質(ミコール酸)および腫瘍細胞膜糖脂質の分析

GC/MS Analysis of Mycolic Acids ----- Unique Components of Cell Wall Lipids in Acid-fast Bacteria and Glycolipids in Human Tumor Tissues.

矢野 郁也*

(昭和58年5月31日受理)

1. はじめに



M-80形 日立GC質量分析計

質量分析法が生物学領域に導入されてすでに久しく，その間の発展もまたまことに目ざましいものであった。その一般的な解説を述べるのは本稿の目的ではないので，ここでは著者らが行ってきた研究分野での質量分析法，特にGC/MS法の応用例を御紹介してその責任を果したい。

本稿では，結核菌を始めとする抗酸菌細胞壁の最も特徴的な成分である超高級脂肪酸（ミコール酸）の分析と生合成，それと動物細胞膜表層において極めてユニークな機能を果しているスフィンゴ糖脂質のGC/MS分析等について述べる。

2. ミコール酸分子種の構造解析と生合成

結核菌を中心とするMycobacteriaおよびその近縁細菌の最も大きな特徴は，"抗酸性"を有することであるが，その発現には細胞壁の化学構造が大きく関与しているものと考えられている。ミコール酸はこれらの抗酸菌の細胞壁に存在する超高級分枝脂肪酸で，炭素数20から90までのα分枝，βヒドロキシ脂肪酸であり(**図1**)，これらの細菌細胞壁の疎水性を保つうえで必須の成分であるばかりでなく，病原性や免疫反応とも深く関係しているものと考えられている。このような脂肪酸は，そのアルキル鎖が天然の生体膜脂質成分中では著しく長いために，構造・機能の両面で極めてユニークな成分と考えられ，その構造解析については約40年以前から活発な研究がすすめられてきた[1)~5)]。しかしながら，これらの脂肪酸は熱に対して不安定で，ガスクロマトグラフィー（GC）による分析が困難で，単一成分の解析は行われていなかった。一方，ミコール酸の構造は，菌種によって著しく異なり(**図2**)，炭素数，

*新潟大学医学部 細菌学教室 教授

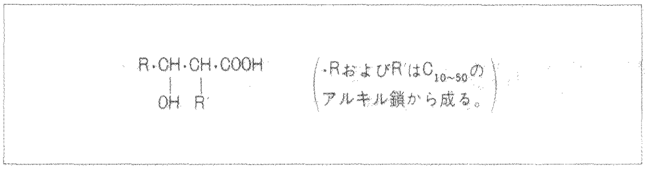


図1 ミコール酸の基本構造

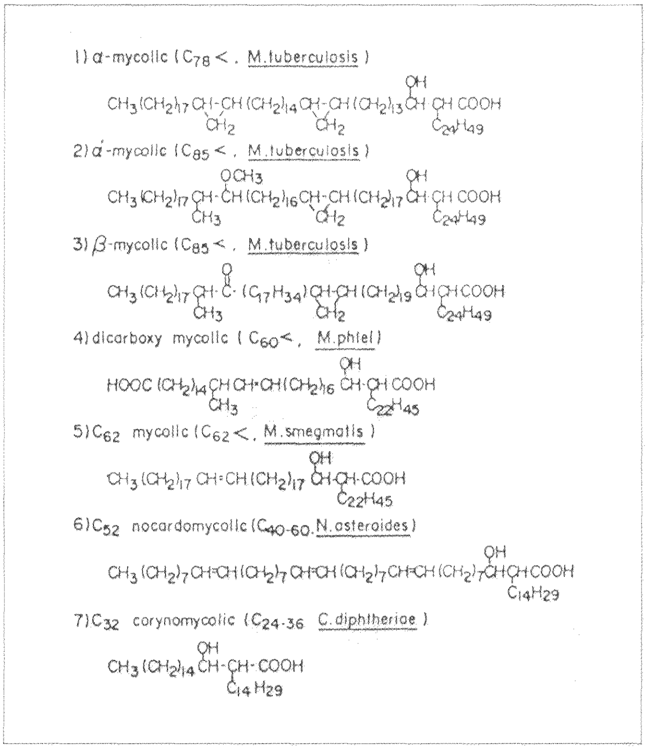


図2 種々のタイプのミコール酸

二重結合数，α側鎖の長さはもとより，シクロプロパン環，メチル側鎖，メトキシ基等を有するもの，ジカルボンミコール酸など極性の異なるものが種々知られており，"分子種"レベルでは著しく多彩な成分を含んでいる。分類学的にはミコール酸の存在が"属"の定義に必須であり，その構造が"種"により異なることから，菌種の同定にも極めて重要な項目とされている。[6),7)] そこで著者らは，ミコール酸研究のための新しい方法論を確立し，これを用いて化学分類学や生理学的研究に役立てる目的で，GC/MS法による単一分子種の分析法について研究を行ってきた。

2.1 ミコール酸構造の解析法

ミコール酸の構造解析の研究は，既に長年多数の研究者達によって行われてきたが，なかでも最も有力な方法は質量分析で，炭素数や二重結合数，カルボニル基やメトキシ基の同定には必須の方法と考えられてきた。問題点は，ミコール酸が構造上，高温には極めて不安定なことであり，250~300°CではC_2-C_3(α-β)位間で容易に開裂（熱分解）してしまうことであった。したがって，従来は"Pyrolysis product"すなわち直鎖由来のメロミコラールとα側鎖に由来するメチルエステルを分析して構造解析がなされており，その方法を発展させてPyrolysis gas chromatographyが行われてきた。[8)] けれどもこの方法では，intactなミコール酸の解析が

Mycobacterial cells
(glucose-yeast extract-peptone)
hydrolysis (10% KOH methanol for 3 hrs)
extraction of fatty acid
methanolysis (benzene-methanol-H_2SO_4 10:20:1, v/v/v)

Fatty acid methyl esters
separation by TLC (hexane-ether 4:1, v/v)
mycolic acid ester
trimethylsilylation (BSTFA-pyridine 1:1, v/v)

GC-MS analysis of TMS-methylmycolate
(2% OV-1 at 340°C)
Hitachi RMU 6 MG (Ryhage-type separator)
ionization current 60 μA
electron energy 20 eV
accelerating voltage 3.2 KV

図3 各種ミコール酸の分析法

困難であり，各分子種の定量は不可能である。そこで著者らは，ミコール酸の分子種をできるだけもとの構造のまま，簡便に，定量性よく分析したいと考えて，ミコール酸メチルエステルのTMS誘導体を調製し，これをGC/MSの試料として分析解析しようと試みた。その方法の概略を**図3**に示すが，これによるとTMS化が定量的に行えることと，TMS誘導体は高温でも安定で，調製法が簡便なことから多数の試料の分析にも適していると考えられる。またEIマスにおけるフラグメントイオンの量や内容も適度であり，C_{60}-$_{80}$程度のミコール酸までは，極めてよい再現性が得られている。[9)~12)]

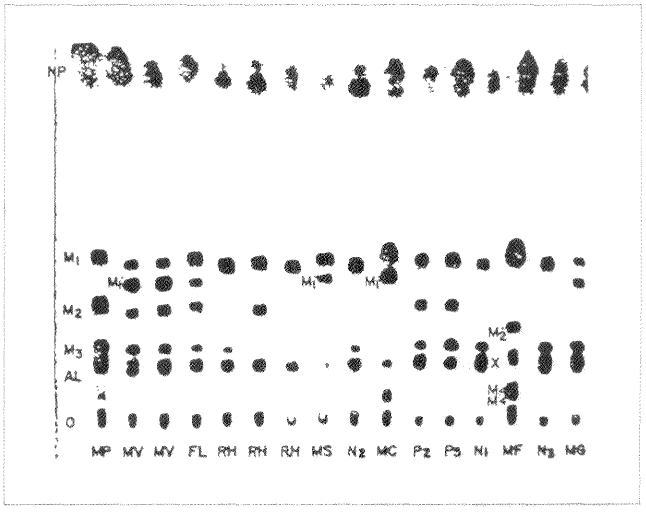


図4 各種抗酸菌菌体より得られるミコール酸メチルエステルの薄層クロマトグラム
M1，M1'，M2，M3は，各々α，α'，ケトおよびジカルボンミコール酸メチルエステルに相当する。溶媒，ヘキサン：エーテル(4:1, V/V)

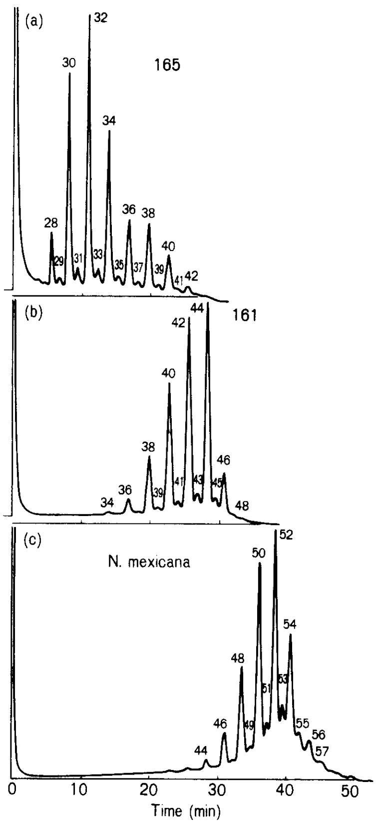


図5 各種Nocardiaおよびその類縁細菌ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のガスクロマトグラム
カラム：1% OV-17, 0.5m ガラスカラム 200°C〜300°C (3°C/min)

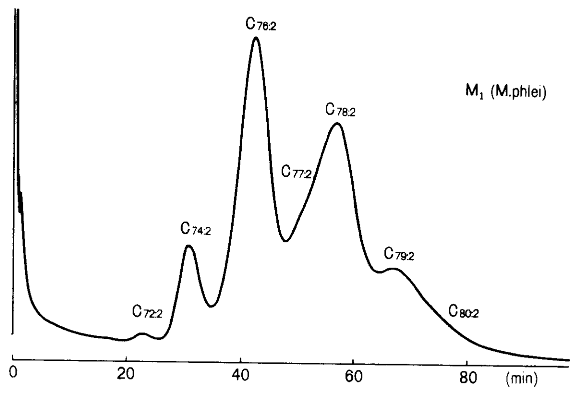


図6 M.phlei α・ミコール酸(M1)メチルエステル・TMS誘導体のガスクロマトグラム
カラム：1%OV17, 0.5mガラスカラム 340°C

2.2 ミコール酸のガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC/MS)

MycobacteriaやNocardiaの菌体を水解後，抽出して得た脂肪酸メチルエステルを，SilicagelのTLCを用いて，ヘキサン・エーテル(4：1，V/V)の混合溶媒で展開すると，非極性酸と極性酸メチルエステルが明瞭に分離する(**図4**)。これらのスポットの中からミコール酸メチルエステルを回収してTMS化を行いGC/MSを用いて分析すると，そのクロマトグラフにはCorynebacteriaではC_{32}を中心に，RhodococcusではC_{30-50}の，またNocardiaではC_{40-60}の，そしてMycobacteriaではC_{60-80}前後の主として偶数酸に相当する多数のピークが検出される(**図5**および**図6**)。これらのミコール酸メチルエステルのTMS誘導体のうちM.phleiのC_{76}および$C_{78}\alpha$ミコール酸誘導体のマススペクトルを**図7**に示す[13]。その結果，ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のEIマススペクトルでは，**図8**に示すような開裂機構によりフラグメントイオンを形成し，分子イオン$(M)^+$，$(M-15)^+$，$(M-90)^+$イオン等により，ミコール酸の総炭素数および二重結合数が決定された。これに対してフラグメントイオン(a)又は(a−90)は直鎖部分(すなわちメロミコラール)の構造を示しており，一方フラグメントイオン(b)又は(b−29)はα側鎖の解析に有用であった。M.phleiからえられる$C_{72-80}\alpha$・ミコール酸(M1)の分析結果を**表1**に示す。この結果，M.phleiのαミコール酸は，直鎖部分がC_{50-56}までのdiene(又はシクロプロパン環を含む)構造を有し，主として偶数酸からなるが，一部奇数酸も含んでいること，α位のアルキル側鎖はC_{20}又はC_{22}であること等が明らかになった[13]。これに対してNocardia asteroiclesやN.polychromogenesのミコール酸は，炭素数$C_{48}\sim_{66}$に至る偶数酸からなるが，その不飽和度(二重結合数)はMycobacteriaと比べて著しく高く，

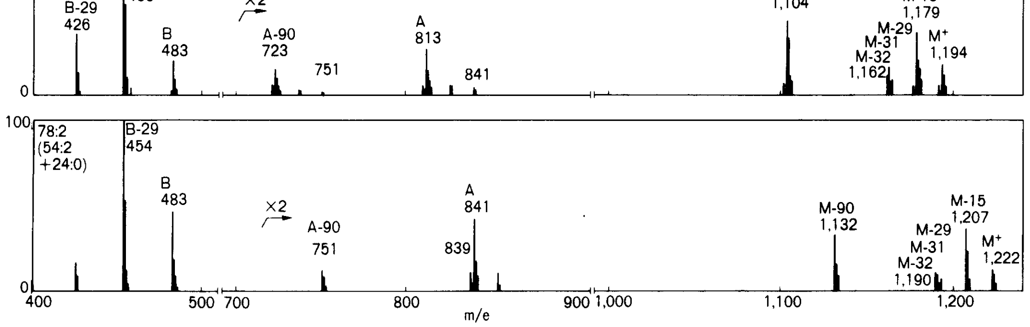


図7 M.phleiのC_{76}および$C_{78}\alpha$・ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のマススペクトル（日立M-60形装置使用）

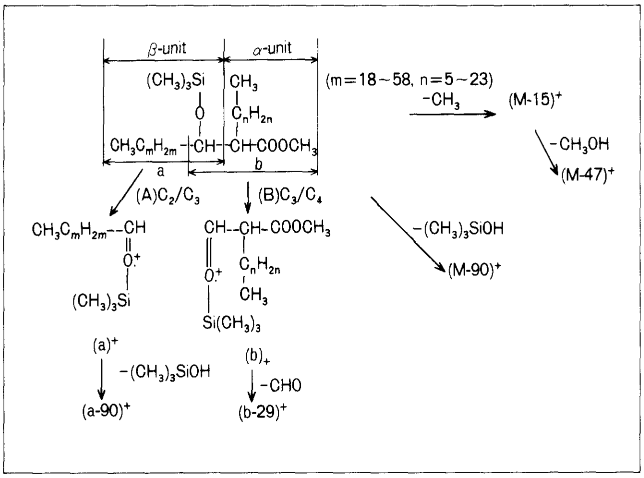


図8 ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のEI/MSにおけるフラグメントイオン形成機構

tetraene～pentaeneを有しており,[11] Mycobacteriaのミコール酸が最高dieneまでにとどまることと比べて,物理化学的性質が著しくことなることを意味している。

2.3 ミコール酸分子種組成の定量と化学分類学

ミコール酸は,前述したようにOrder Actinomycetalesに属する細菌の特徴的な成分であり,現在までにMycobacteria, Rhodococcus, Nocardia, Gordona, Bacterionema, CorynebacteriaおよびBrevibacteriumに存在することが知られている。炭素数は一般にCorynebacteriaのミコール酸が最も短く,C_{20-38}で偶数酸から成るのに対して,Bacterionemaでは偶数奇数多数の分子種から成る。またNocardiaではC_{52}が中心で tetraeneまでの二重結合同族体が含まれるが,Rhodococcusの各菌種は構成幅が極めて大きく,C_{30-34}(monoeneまで),C_{40-46}(dieneまで),C_{50-58}(tetraeneまで)およびC_{64-68}前後のもの(penta～hexaeneまで)等,極めて多彩である。これに対して,Mycobacteriaのミコール酸は一般に炭素数が多く,subclass組成も複雑で,菌種により著しく変化に富み,直鎖モノカルボン酸(α・ミコール酸)をはじめ種々のメチル側鎖やシクロプロパン環をもつもの,メトキシ酸およびジカルボン酸等極性の異なる同族体から成る。[14),15)] しかも前述したように,各subclass中の分子種組成が菌種によって異なること等が見出された。**図9**にMycobacteriaのα・ミコール酸(M1+M1′)の分子種組成を示す。[15)]

表1 M.phlei α・ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のGC/MSによる分析

Peak	〔M〕$^+$	〔M-15〕$^+$	〔M-90〕$^+$	〔A〕$^+$	〔A-90〕$^+$	〔B〕$^+$	〔B-29〕	β-unit	α-unit
$C_{72.2}$	1138	1123	1048	785	695	455	426	$C_{50.2}$	$C_{22.0}$
$C_{74.2}$	1166	1151	1076	813	723	455	426	$C_{52.2}$	$C_{22.0}$
				785	695	483	454	$C_{50.2}$	$C_{24.0}$
$C_{76.2}$	1194	1179	1104	813	723	483	454	$C_{52.2}$	$C_{24.0}$
				841	751	455	426	$C_{54.2}$	$C_{22.0}$
$C_{77.2}$	1208	1193	1118	855	765	455	426	$C_{55.2}$	$C_{22.0}$
$C_{78.2}$	1222	1207	1132	841	751	483	454	$C_{54.2}$	$C_{24.0}$
$C_{79.2}$	1236	1221	1146	855	765	483	454	$C_{55.2}$	$C_{24.0}$
$C_{80.2}$	1250	1235	1160	869	779	483	454	$C_{56.2}$	$C_{24.0}$

2.4 ミコール酸組成の変動と細胞壁合成の温度による調節

Mycobacteriaやその近縁細菌は,一般に宿主寄生性のものと土壌や水中に棲息するものの両者を含むが,前者の場合,その環境特に発育温度は宿主依存性のものが多く,人型結核菌は急速に冷却することにより"cold shock"を起こす。これに対してM.phleiをはじめとするsaprophyticな菌群は広範囲な温度領域に適応し,細胞壁の温度適応機構の解析には好都合である。著者らは,ミコール酸の構造が培養条件殊に温度を変化させた場合に著しく変動することを見出した。[13),16),17),18)] この現象は,抗酸菌細胞壁の温度適応現象の一つと考えられ,Mycobacteriaの場合には主として炭素

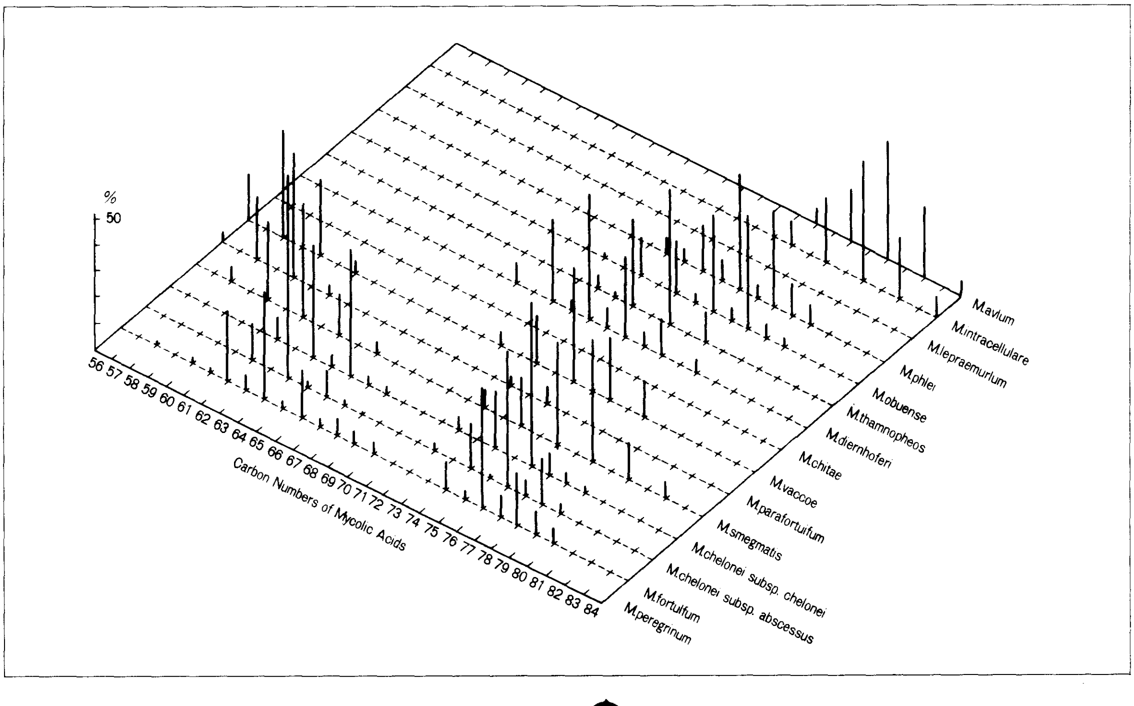


図9 Mycobacteria(Runyon Ⅳ群, Rapid growers)のα・ミコール酸(M1+M1′)分子種の分布

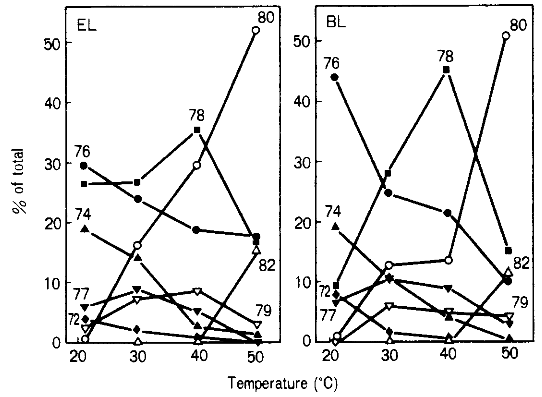


図10　M.phleiにおけるα・ミコール酸組成の温度による変化
EL：extractable lipid,
BL：cell wall bound lipid

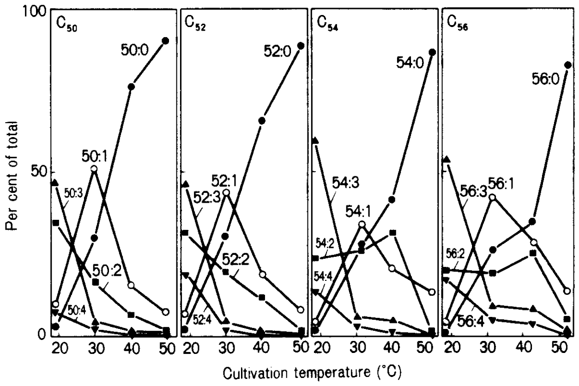


図11　N.asteroidesのノカルドミコール酸組成の温度による変動

鎖長が変化し，M.phleiの場合，20°Cと50°Cの間でα・ミコール酸の炭素鎖長の差はC_4にも達した(**図10**)。これに対してNocardiaでは，培養温度変化に際して不飽和度が変化し，低温培養時には，高度不飽和酸が，高温培養時には飽和酸が増加する。**図11**にN.asteroidesの低温および高温培養時のミコール酸組成をマスフラグメントグラフィーにより解析してえた結果を示す。著者らはまた，このような温度適応時のミコール酸構造の変化はミコール酸のα側鎖に生ずるのではなく，直鎖部分の変化にもとづくことを，マスフラグメントグラフィーによって明らかにしている。

2.5　安定同位元素を用いたミコール酸生合成の研究

ミコール酸生合成の研究は，従来，方法論的な困難さのために，特に分子種レベルでの検討はほとんど行われていなかった。著者らは，各種放射性同位元素ラベル前駆体のみならず，^{18}Oや^{13}C等安定同位元素ラベル前駆体の取り込み実験を行い，GC/MSを用いて取り込まれた同位元素を定量する方法を検討した結果，これらは，放射性同位元素と同等又はさらに詳細な情報を与えることが明らかとなった。その結果，M.phleiを始めとする発色菌群および非定型抗酸菌MAIS complexに広く分布するエステルミコール酸は，Baeyer Villiger型酸化反応により，分子状酸素($^{18}O_2$)が直接ケトミコール酸に取り込まれて生成することが明らかとなった[19](**図12**)。**図13**にエステルミコール酸由来のTMS・二級アルコールの(M-15)イオンの，^{18}O取り込みによるシフトを示す。これに対して，Nocardia rubraのミコール酸合成においては，^{13}C酢酸を用いた実験で最初C_2から$C_{14, 16}$までの脂肪酸が速やかに合成されるほか，$C_{14, 16}$脂肪酸からの伸長反応によりC_{30}〜$_{36}$までの脂肪酸が合成され，これらが中間体(メロミコール酸)となって前者との縮合，還元により$C_{40, 50}$ミコール酸が生成されることも明らかとなった[20](**図14**)。これらの結果から，ミコール酸の生合成には遺伝的および環境条件による調節機構が存在し，特に中間体合成の段階で構造が決定されることが示唆されたが，なお詳細は酵素系によって検討したいと考えている。

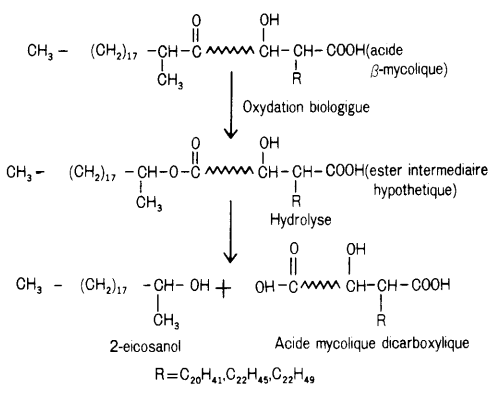


図12　M.phleiにおけるエステルミコール酸の生合成と２級アルコールおよびジカルボンミコール酸の生成

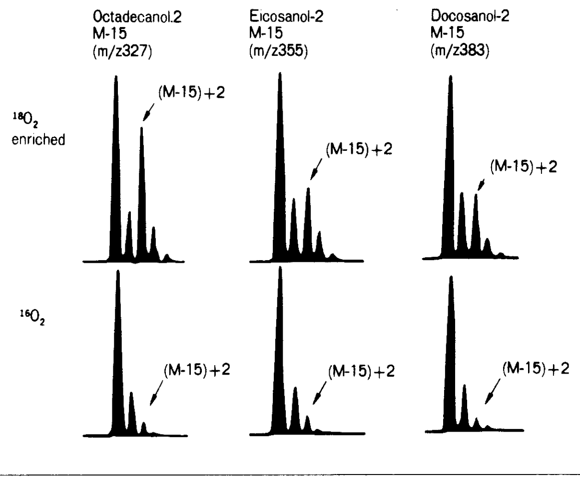


図13　$^{16}O_2$又は$^{18}O_2$気流中でincubateして得られたM.phleiエステルミコール酸由来の２級アルコールTMS誘導体における(M-15)イオンのシフト

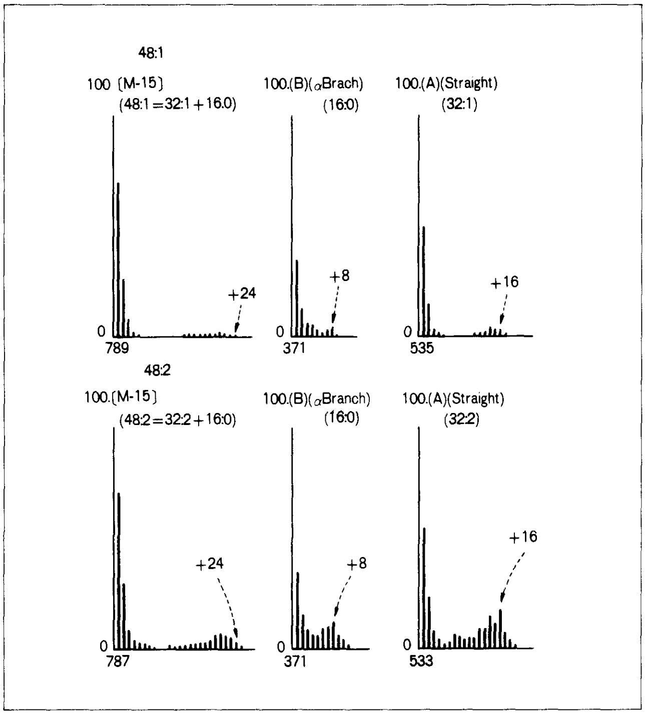


図14 Nocardia rubra菌液による2^{13}C酢酸のC_{48}モノエンおよびジエンミコール酸へのとりこみ，(M-15)イオンは+24マスのシフト，(B)イオンは+8マス，(A)イオンは+16マスのシフトを示している。
インキュベーション 4hrs.

3. スフィンゴ糖脂質のガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー

スフィンゴ糖脂質は，動物細胞膜に存在する膜構成成分で，抗原構造を担っているばかりでなく，各種毒素の受容体として，またホルモンやレクチンレセプターとして重要な生理的機能を果している。スフィンゴ糖脂質の糖鎖は，一般に分化した各臓器において特異的であり，癌化又は脱分化により変動することが知られている。従って癌細胞や悪性腫瘍，白血病等に際しての膜糖脂質の変動機構の解析は，臨床病理学的にも極めて重要である。しかるにこれらスフィンゴ糖脂質は一般に質量数も高く，難揮発性であり，特に複雑な糖鎖を有する成分の構造解析にはFD/MS，CI/MS等が用いられてきた。著者らは比較的少量の試料についてもなるべく詳細な情報を得る目的で，Ceramide oligosaccharideのintactな分子種のGC/MS解析法について検討をすすめ，Ceramide Monohexoside(CMH)のほか，Ceramide Dihexoside(CDH)およびCeramide Trihexoside(CTH)までのGC/MSが可能であることを明らかにした。[2)2)]

3.1 Ceramide monohexoside(CMH), Ceramide dihexoside(CDH)およびCeramide trihexoside(CTH)の構造解析法

主として手術切除材料から得た脂質について糖脂質の分析を行った。気管支嚢腫(Bronchial cyst)，肺葉内肺分画症(Intralobar sequestration)，奇型腫(Teratoma)等の良性腫瘍，もしくはこれに準ずる病理的変化を示す組織から，常法に従い脂質を抽出し，濃縮乾固後，脂質リン量及び糖量を定量した。総脂質を0.2N-KOHクロロホルム・メタノール(1：1，V/V)により弱アルカリ水解し，中和後，アルカリ安定脂質をSilicagel Gの薄層クロマトグラフィー（クロロホルム・メタノール・酢酸・水，100：20：12：5，V/V)により分離し，CMH，CDHおよびCTHの各々を単離した。糖脂質各成分の分析は，常法に従い，長鎖塩基，脂肪酸および構成糖の各々については，GC/MSを用いて分析した。

3.2 CMH，CDHおよびCTHのGC/MS分析

気管支嚢腫(Bronchial cyst)および奇型腫(Teratoma)脂質の特徴は，脂質リン量が少なく，これに対して中性糖脂質含量が一般に5％以上を占めていた[24)]（**図15**）。中性糖脂質としては，TLC上，既知のCeramide monohexoside(CMH)，Ceramide dihexoside(CDH)およびCeramide trihexoside(CTH)と一致する成分が多量存在することが明らかとなった。そこで各糖脂質をゲルから回収後，TMS化を行い，GC/MSに注入し，TIMによりクロマトグラフィーを行ったところ，CDHについては**図16**に示すようなピークが検出された。そこで単離した各ピークの質量分析を行うと**図17**に示すようなスペクトルが得られ，各ピークは主としてアシル基の異なる分子種，すなわちd18：1-16：0，d18：1-18：0，d18：1-20：0，d18：1-22：0およびd18：1-24：0からなることが明らかになった。その結果，CDHのTMS誘導体は，分子イオン$[M]^+$を始めとして$(M-15)^+$イオン，$(M-103)^+$イオン，$(M-237)^+$イオンおよび$(M-311)^+$イオン等から分子量が測定されるばかりでなく，fatty acid ion, ceramide ion, disaccharideの脱離とTMSの再配列による$(M-d+102)^+$イオン，およびmonosaccharideの脱離とTMSの再配列による$(M-m+102)^+$イオン等から，糖部分，長鎖塩基部分およびアシル基の構造が判明することが明らかとなった(**表2**)。(**図18**)

これに対してCTHのTMS誘導体においても，共通イオンとしてm/z 204, 217, 271, 361, 及び451(以上monosaccharide由来)，およびm/z 311(LCB由来)イオン等が検出されるほ

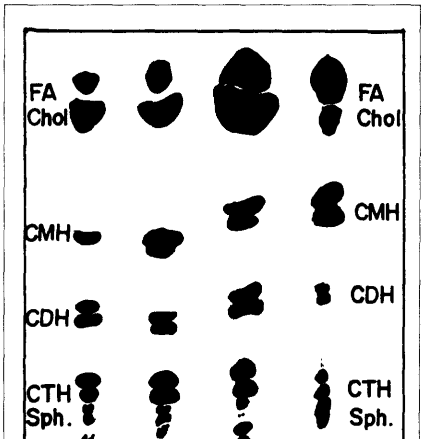


図15 気管支嚢腫(Bronchial cyst)および奇型腫(Teratoma)から得られたsphingolipidの薄層クロマトグラム溶媒：クロロホルム：メタノール：H_2O(65：25：4，V/V)

か、〔M〕$^+$、(M−15)$^+$、(M−103)$^+$、(M−237)$^+$等のイオンが明瞭に検出され、分子量が決定された。またCDHの場合と同様に、fatty acid ion, ceramide ion, ceramide＋90ion, 〔M−d＋102〕$^+$イオンおよび〔M−m＋102〕$^+$イオン等specific ionからceramideおよび糖部分が解析された。その結果CTH分子種としてd18：1−16：0, d18：1−18：0, d18：1−20：0, d18：1−22：0およびd18：1−24：0等の成分が含まれることが明らかとなった。**図19**にCTH−TMS誘導体のガスクロマトグラムを、**図20**にC16：0パルミチン酸を構成成分とするCTH−TMS誘導体のマススペクトルを示す。これらのマスフラグメントイオンの解析結果を**表3**および**図21**に示した。

従来、GC/MSによる動物sphingo glycolipid分子種の分析に関してCMHについては多数の報告があるが、CDH以上の糖鎖を有するCeramide Oligosaccharideに関する報告はみられない。著者らはGCおよびMSの各種条件を充分検討した結果、これらsphingo glycolipidを多量に含む腫瘍組織から得られたCDHおよびCTHの各TMS誘導体がGC/MSにより、その分子種レベルまで解析されることを明らかにし

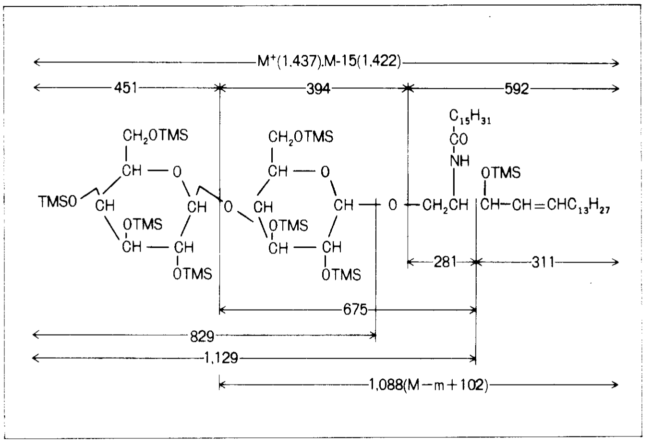


図18　Ceramide dihexoside TMS誘導体のフラグメントイオン形成機構

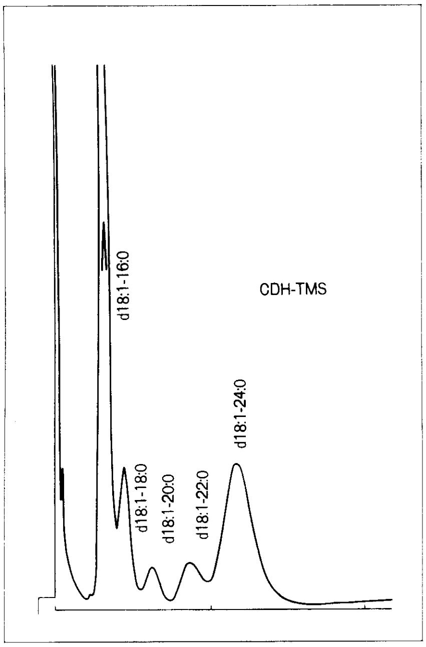


図16　奇型腫よりえられたCDH−TMS誘導体のガスクロマトグラム
カラム：1%OV−1, 0.5mガラスカラム, 320°C

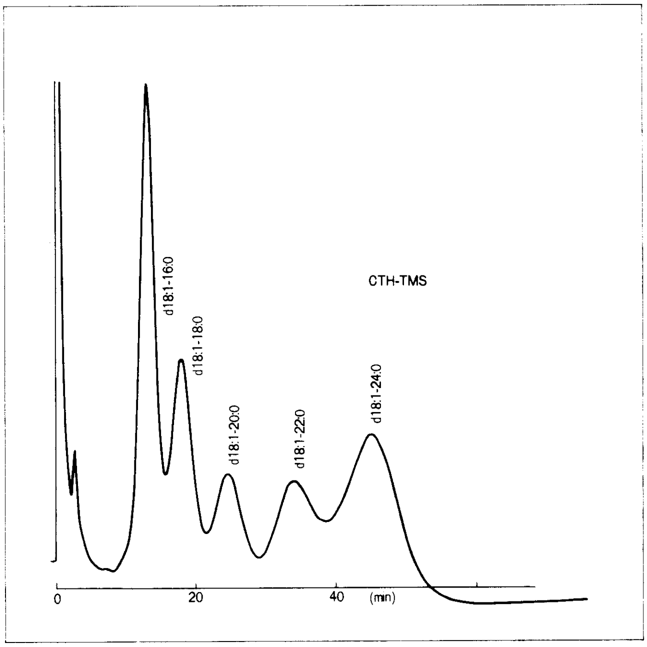


図19　奇型腫よりえられたCTH TMS誘導体のガスクロマトグラム
カラム：1%OV 1, 0.5mガラスカラム 340°C

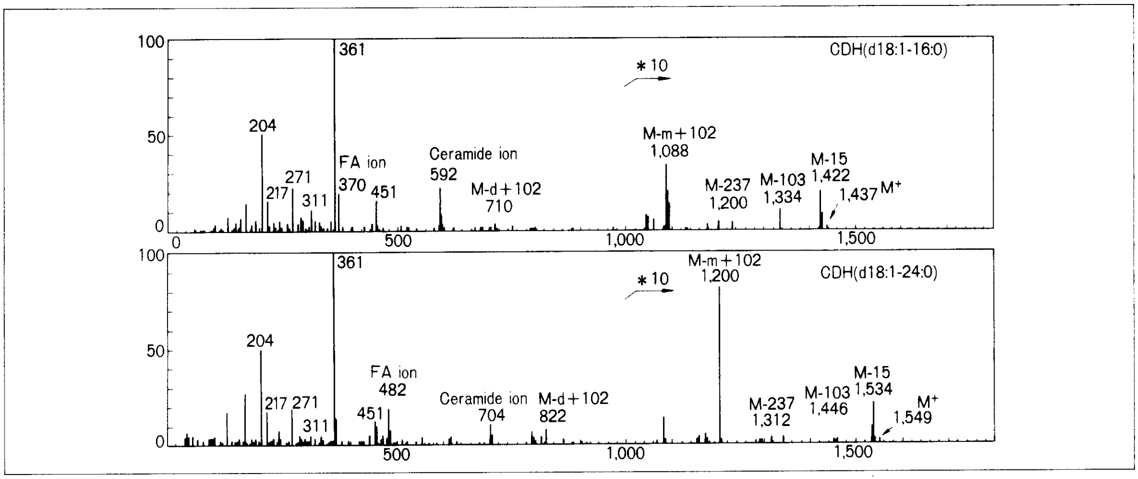


図17　Ceramide dihexo-(CDH)のTMS誘導体のマススペクトル（日立M−60型装置使用）

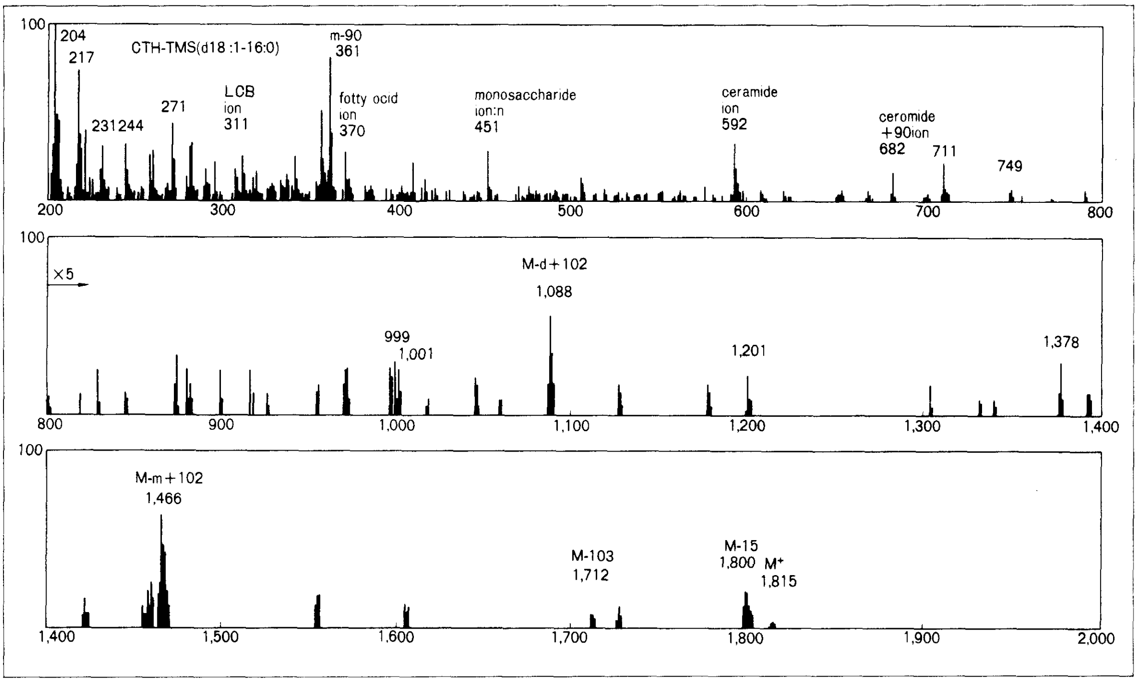


図20 Ceramide trihexoside(CTH)のTMS誘導体のマススペクトル(日立M-60型装置使用)

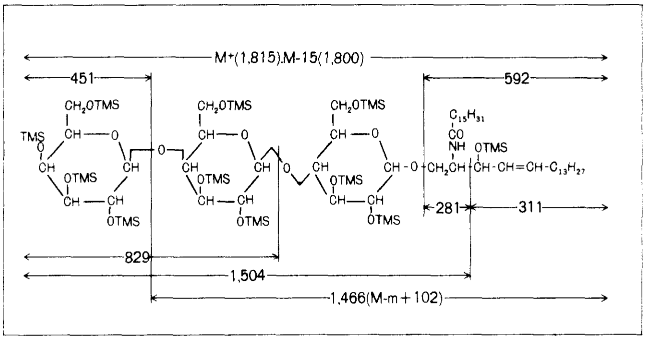


図21 Ceramide trihexoside TMS誘導体のフラグメントイオン形成機構

表2 Ceramide dihexoside TMS誘導体の各分子種にみられる主なフラグメントと同定

Common ions

204, 217, 271, 311, 361, 451 (m, monosaccharide ion) (d=829 disaccharide ion not detected)

Specific ions

molecular species	fatty acid ion*	ceramide ion	M-d+102	M-m+102	M-311	M-237	M-103	M-15	M+
d18:1 16:0	370	592	710	1088	1126	1200	1334	1422	1437
d18:1 18:0	398	620	738	1116	1154	1228	1362	1450	1465
d18:1 20:0	426	648	766	1144	1182	1256	1390	1478	1493
d18:1 22:0	454	676	794	1172	1210	1284	1418	1506	1521
d18:1 24:0	482	704	822	1200	1238	1312	1446	1534	1549
d18:1 24:1	480	702	820	1198	1236	1310	1444	1532	1547

* (RCO NHCH₂CHO TMS)

表3 Ceramide trihexoside TMS誘導体の各分子種にみられる主なフラグメントイオンと同定

Common ions

204, 217, 271, 311, 361, 451 (m, monosaccharide ion), 829 (disaccharide ion)

Specific ions

molecular species	fatty acid ion*	ceramide ion	ceramidee +90 ion	M-d+102	M-m+102	M-237	M-103	M-15	M+
d18:1 16:0	370	592	682	1088	1466	1578	1712	1800	1815
d18:1 18:0	398	620	710	1116	1494	1606	1740	1828	1843
d18:1 20:0	426	648	738	1144	1522	1634	1768	1856	1871
d18:1 22:0	454	676	766	1172	1550	1662	1796	1884	1899
d18:1 24:0	482	704	794	1200	1578	1690	1824	1912	1927

* (RCO NH·CH₂CHO TMS)

たが、さらに高級糖脂質についても検討したいと考えている。

4. おわりに

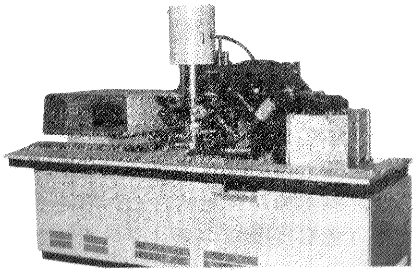
近年、質量分析が生物医学分野へ導入されるようになり、分析技術も日増しに多方面へ発展しているようである。著者らは、主として生体膜脂質成分中、質量数の高い、難揮発性成分の分析を検討してきた。生体成分は、一般の有機化合物や薬物と異なり、低分子量から高分子量まで極めて広い化合物を包含しており、しかも一般に同族体を含むことが多い。従って質量分析によって得られる構造に関する情報と、GCやLCによって得られる分離能を合せた複合分析は、今後益々バイオマス領域において発展することが予想される。

参考文献

1） Asselineau, J. ：The Bacterial Lipids（Hermann, Paris）（1966）
2） Etemadi, A.H. et al. ：Bull, Soc. Chim. Biol.,**47**, 631,（1965）
3） Lederer, E. ：Chem. Phys. Lipids. **1**, 294,（1967）
4） Bordet, C. and Michel, G. ：Bull. Soc. Chim. Biol. :**51**, 527,（1969）
5） Clermonte,R. and Lederer, E.：C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci.,Paris **242**, 2600,（1956）
6） Rogosa, M. et al. ：Bergey's Man. Determin. Bacteriol. **8**, 599,（1974）（ed. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.）
7） Runyon, E.H. et al. ：ibid. **8**, 681,（1974）（ed. Buchanan. R.E. and Gibbons, N.E.）
8） Etemadi, A.H. ：J. Gas Chromatogr. **5**, 447,（1967）
9） Yano, I. et al. ：FEBS Lett. **21**, 215,（1972）
10） Yano, I. and Saito. K. ：FEBS Lett. **23**, 352,（1972）
11） Yano, I. et al. ：Proc. 2nd Meet. Japan. Soc. Med. Mass Spectrom. abst. 35,（1977）
12） Yano, I. et al. ：Biomed. Mass Spectrom. **5**, 14,（1978）
13） Toriyama, S. et al. ：FEBS Lett.,**95**, 111,（1978）
14） Yano, I. et al. ：Proc. 3rd Meet. Japan. Soc. Med. Mass Spectrom. abst.,169,（1978）
15） 矢野郁也，鳥山浄子，質量分析 **27**, 69,（1979）
16） Toriyama, S. et al. ：J. Biochem.,**88**, 211,（1980）
17） Tomiyasu, I. et al. ：Chem. Phys. Lipids. **28**, 41,（1981）
18） Tomiyasu, I. J. Bacteriol. **151**, 828,（1982）
19） Toriyama, S. et al. ：Biochim. Biophys. Acta, **712**, 427,（1982）
20） Tomiyasu, I. et al. ：Proc. 6th Meet. Japan. Soc. Med. Mass Spectrom. abst. 71,（1981）
21） Oshima, S. et al. ：J. Jap. Med. Soc. Interface, **7**, 67,（1976）
22） Oshima, S. et.al. ：Proc. 3rd Meet. Japan. Soc. Med. Mass. Spectrom. abst. 181,（1978）

Topics

IMA-3形　日立イオンマイクロアナライザ



イオンマイクロアナライザ（IMA）は加速されたイオンを試料に照射し，試料から放出される二次イオンを分析する装置です。IMAは他の表面分析装置（オージェ電子分光器AES, X線マイクロアナライザXMA，光電子分光器ESCA）に比べ下記のような特長を有しています。(1)検出感度が高い（～ppbオーダ）。(2)H～Uまで全元素の分析が可能。(3)同位体の分析ができる。(4)深さ方向の分析ができる。(5)分析時間が短い。

また，日立IMA-3形イオンマイクロアナライザは以下のような特長を有しています。

■ 特長

(1)　二次イオン光学系に立体二次二重収束光学系の採用

二次イオンパスにおけるイオンのロスを極力少くし，高感度，高分解化を達成します。

(2)　オイルフリーな超高真空系の採用

イオンポンプターボ分子ポンプを用いた真空系により，試料のコンタミネーションを少くし，軽元素の検出限界を下げることができます。

(3)　広範囲，高精度試料微動装置を採用

水平保持の試料台と試料微動装置により，分析領域の拡大と連続分析を可能にします。試料微動台はCPUによる自動設定も，また手動による設定も可能です。

(4)　制御装置とデータ処理装置の一体化

IMAの制御とデータ処理を１つのコンソールから行うことができます。操作性を著しく高めています。

(5)　自動排気系の採用

真空排気操作を完全自動化しました。ミス操作等を全く排除できます。

(6)　中性イオン除去光学系を採用し分析精度を一段と向上させました。

(7)　エレクトロニックアパーチァ法による高精度深さ方向分析が可能です。

■ 主な仕様

(1)　一次イオンビーム系
　イオン種：O_2^+, N_2^+, Ar^+, O^-, N^-など
　加速電圧：1～20kV（1kVステップ）
(2)　試料微動
　X, Y, Z, T方向可動ユーセントリック方式
(3)　試料
　試料サイズ：30×50mm
　試料装塡数：1～10ヶ
　試料保持：水平
(4)　二次イオン質量分析計
　立体2次2重収束質量分析計，電場半径216mm（90°）磁場半径200（90°）
　質量範囲：1～500m/Z
(5)　質量分解能：10.000以上
(6)　感　　度：0.2ppb（Si中のB）

U.D.C.547.979.733.03:〔535.342＋535.372〕:539.196.5

ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)の励起一重項の解析

Analysis of Excited Singlet State of Hematoporphyrin Derivatives (HpD)

會沢 勝夫* 大畑 進* 加藤 治文** 早田 義博**
山下 幹雄*** 小林 俊介*** 佐藤 卓蔵*** 嶺岸 久子****

（昭和58年7月22日受理）

1. はじめに

ラットの正常組織に比して，腫瘍組織はポルフィリンの赤い蛍光を強く放出していると云う報告が1942年にAuler,H.,とBanjer,G.[1]によって出された。これをきっかけに腫瘍と親和性を持つポルフィリン系物質の研究が進められた。1948年Figge,F.H.J.,等[2]は実験的に作られたマウス腫瘍を使用し，ヘマトポルフィリンが腫瘍親和性の高い事実を示した。1960年にLipson,R.L[3]はこのヘマトポルフィリンを酢酸と硫酸で処理してヘマトポルフィリン誘導体（HpD）を調製し，より高い腫瘍親和性物質とした。1961年にLipson,R.L[4]はこのHpDを静脈注射した後，人の腫瘍部位に集中してHpDが蓄積している状態を蛍光によって確認している。その後多くの人々により研究が進められてきた。HpDを静脈注射した48時間後に，このHpDが正常組織からは代謝排泄され，検出されなかったが，腫瘍部位に残存している事を内視鏡蛍光分光装置によって我々も確認している[5,6]。1975年にDougherty,T.J.等[7]はHpDをマウスに注入し，乳癌にHpDを集積させた後，HpDの吸収帯の一つである630mmの光をアルゴン色素レーザーから取り出し乳癌に照射した。その結果癌は完全に消滅し，癌の治療に成功した。

癌組織に集積したHpDが光を吸収することからはじまり，一連の光化学反応が起きる。その反応によって生成されたsinglet oxygeneが殺細胞効果を現す。Weinshaupt,K.R.[8]等は，Young,R.[9]の光酸化反応に，このHpDの働きを対応させ，癌治療法の根拠を1975年に提唱した。東京医大でも1977年よりHpDの癌に対する診断，治療の効果に注目して研究を進め，初期の癌に対し充分な診断，治療効果があった[10,11]。しかしHpDによる治療の作用機序についてはまだ完全に解明されていない。我々は殺細胞効果の機序を解明するためにHpD分子の励起エネルギーの転移を解析したので報告する。

2. 方法

2.1 実験装置

340型自記分光光度計，データ処理装置 図1
850型分光蛍光光度計 図2
アルゴン超短パルスレーザ
ストリークカメラ

2.2 吸収スペクトル測定

ヘマトポルフィリン誘導体（HpD）をリン酸緩衝塩液(pH7.2)に4×10^{-4}mol/lから8×10^{-9}mol/lにわたって溶解し試料とした。HpD溶液の濃度に応じて，100mmセル，10mmセル，1mmセルを使用し吸光度を測定した。測定条件はバンドパス2nm，室温25°Cで行った。得られた吸光度から，HpDの分子量を626.7として，分子吸光係数を求めた。

HpDのSoret帯の360nm，と395nmの吸収帯を分離するため二次微分スペクトルを測定した。またHpDのQ帯の4つの吸収ピークの分離状態を調べるため，横軸を波数（リニア）にしたときの吸収スペクトルも測定した。

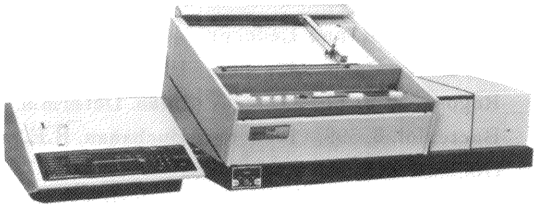


図1 キーボード付属装置を装着した340形日立自記分光光度計

図2 850形日立分光蛍光光度計

2.3 蛍光スペクトル測定と蛍光量子収率

分子吸光係数を求めたHpDの各濃度の溶液について，850型分光蛍光光度計を用い，600～750nmにおける蛍光スペクトルを測定した。その際，測定値が装置特性の影響を受けないように，副標準光源（色温度既知のタングステンランプ）を用い補正した。用いたセルは10mm角，励起光は390nm，バンドパスは，励起，蛍光側とも5nmに設定した。励起光の二次光をカットするため，蛍光側にUV-43フィルターを挿入した。

HpDの蛍光スペクトルの全ての範囲（600nmから750nm）にわたり波長を波数に変換し，各波数における蛍光強度をスペクトル全範にわたり積分し，その値をHpDのmmol当りの蛍光強度に換算した。同一条件でローダミンBのmmol当りの蛍光強度も測定した。ローダミンBに対するHpDの蛍光強度を算出し，蛍光量子収率を求める蛍光量の要素とした。

* 東京医科大学 生理学教室
** 東京医科大学 外科学教室
*** 電子技術総合研究所 レーザ研究室
**** 日立製作所那珂工場 応用技術センタ

各HpD溶液の390 nmにおける分子吸光係数を，ローダミンBの390nmの分子吸光係数で除した値を，蛍光量子収率を求めるための吸収量の要素とした。これらの条件で，ローダミンBの量子収率を0.69として，Parker,C.A.[12]の量子収率の相対値を求める法にしたがってHpDの各溶液での蛍光量子収率を算出した。

2.4 蛍光寿命の測定

HpD2.5×10^{-5}mol/lリン酸緩衝塩溶液(pH7.2)に酸素を暴気し，飽和状態にした試料およびHpD溶液を液体窒素で凍結し，陰圧のもとでガス抜き操作を5回くり返して無酸素状態にした2種類の試料の蛍光寿命を測定した。励起光としてアルゴン分離型シンクロナス受動併用モード同期CW色素(ローダミン6G)レーザー[13](最短パルス幅0.4p･sec，パルス同期12.2 nsec，波長570nm，平均出力～50mW)を使用した。励起入射光に対し90°方向の蛍光を透過バンドパスフィルター600～700 nmを通した後，レンズでストリークカメラの蛍光面に結像し，レーザの発振と同期して，SIT管(Silicon Intersifier Target)で蛍光を受光し蛍光の時間測光を行った。[14]

3. 結果と考察

ポルフィリンの吸収帯は強度の高い近紫外部にあるB帯(Soret帯)と強度の低い可視部のQ帯に大別出来る。このQ帯は長波長側から$Q_{x(0-0)}$，$Q_{x(0-1)}$，$Q_{y(0-0)}$，$Q_{y(0-1)}$の4つのピークがあることが確認されている[15]。このQ帯はメタルフリーベースのポルフィリンで，向い合せの窒素に水素が結合すると約3000cm^{-1}にわたって分裂する。[16]

図3にヘマトポルフィリン誘導体(HpD)の8×10^{-7}mol/lと，4×10^{-7}mol/lのQ帯の吸収スペクトルを，横軸を波数で示す。HpD 8×10^{-7}mol/l以上のリン酸緩衝液(pH7.2)のQ帯は，$Q_{x(0-0)}$：16400cm^{-1}，$Q_{x(0-1)}$：17700cm^{-1}，$Q_{y(0-0)}$：18600cm^{-1}と$Q_{y(0-1)}$：19750cm^{-1}があり，それらは約3350cm^{-1}の範囲に存在している。この場合，Qy帯の吸収強度はQx帯の吸収強度より高くなっている。この状態はHpD 1分子内の向いあった窒素原子に水素が結合しているばかりでなく，隣接したHpDの窒素との間にも水素が結合し，HpDが重合している様に思われる。

一方4×10^{-7}mol/l以下のHpD濃度ではQ帯は$Q_{x(0-1)}$：17700cm^{-1}と$Q_{y(0-0)}$：18850cm^{-1}の吸収帯をもつが，$Q_{x(0-0)}$：16400cm^{-1}および$Q_{y(0-1)}$：19750cm^{-1}にわずかなもり上りとして現れるにすぎない。またQxの方がQyに比して強い吸収を示した。この様な低濃度になるとHpDは隣接分子と充分に離れた状態にあり重合状態に至らない様に思われる。

Q帯の4つの吸収ピークが変化した濃度においてはSoret帯(B帯)の吸収にも変化が認められる。このSoret帯はヘマトポルフィリンのmonomerやdimerの状態を反映しており，[17] monomerで395nm，dimerで365nmにピークを持っている。[18][19]

図4にHpD 4×10^{-7}mol/lと，8×10^{-7}mol/lにおけるSoret帯とQ帯の分子吸光係数を，横軸波長で示す。

HpD 4×10^{-7}mol/l以下の濃度では390nm(25641cm^{-1})に吸収ピークを持っているが，8×10^{-7}mol/l以上の濃度になると370nm(27027cm^{-1})にピークが移動する。この事は8×10^{-7}mol/l以上の濃度でHpDが重合を始めていると考えられる。Soret帯の2つのピークは互いに重なり合って，独立したピークとして解析出来ないので，二次微分スペクトルを測定することによって，2つのピークの分離を試みた。

図5に微分スペクトルを示す。HpDの濃度の上昇に伴ってmononerの吸収帯である395nmのピークは大きな変化を示していないが，dimerの吸収帯である360nmのピークは濃度に比例して大きくなっている。

Soret帯の390nmで励起するとHpDは615nmと678nmにピークを有する蛍光スペクトルを示す。このピーク波長はHpDの濃度を変えてもほとんど変化を示さない。しかしピークの強度比は変る。615nmの蛍光強度に対する678 nmの蛍光強度比は4×10^{-7}mol/lまで0.65，～8×10^{-6}mol/lまで0.63とほぼ一定であるが，HpDの濃度が4×10^{-5}mol/l以上になると678nmの蛍光が増加し，逆に615nmの蛍光強度が減少し，4×10^{-4}mol/lでその比は8.7の値を示す。**図6**に390nm励起によるHpDの蛍光スペクトルを示す。濃度によ

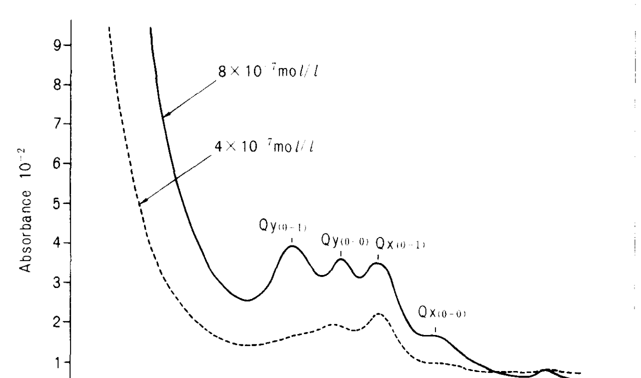


図3 HpDのQ帯の吸収スペクトル
Absorption spectra of Q band of HpD

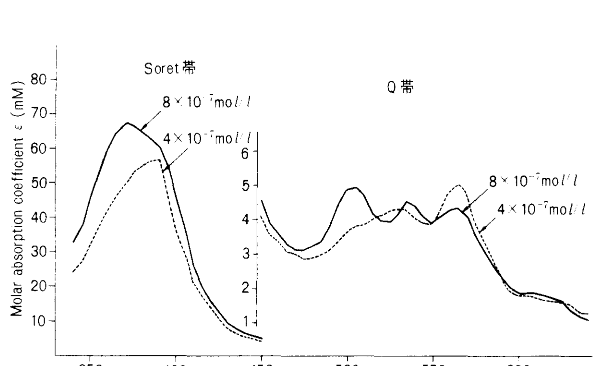


図4 HpDの分子吸光係数
Molar absorption coefficient of HpD

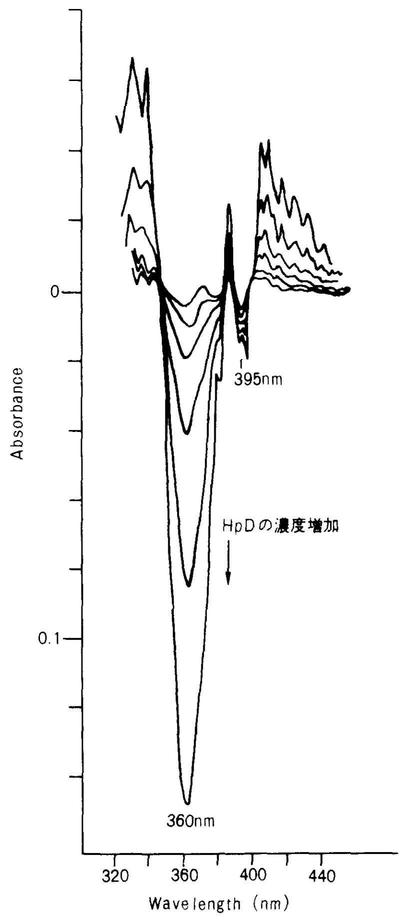


図5 HpDのSoret帯の2次微分スペクトル
2nd derivative Spectra of Soret band of HpD

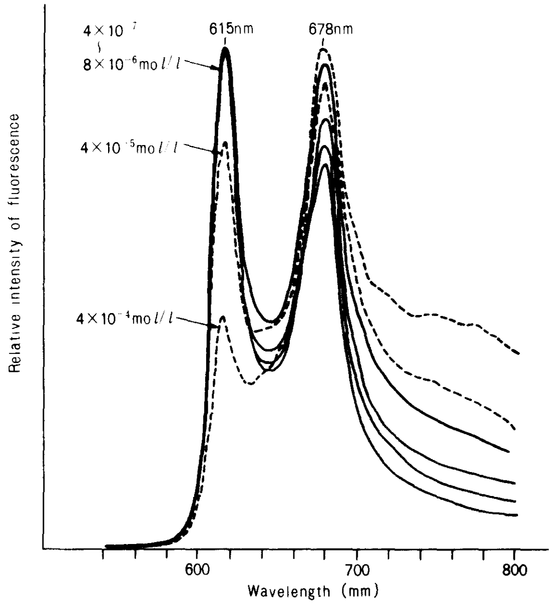


図6 HpDの濃度による蛍光スペクトルの変化
Change of the fluorescence spectrum according to the concentration of HpD

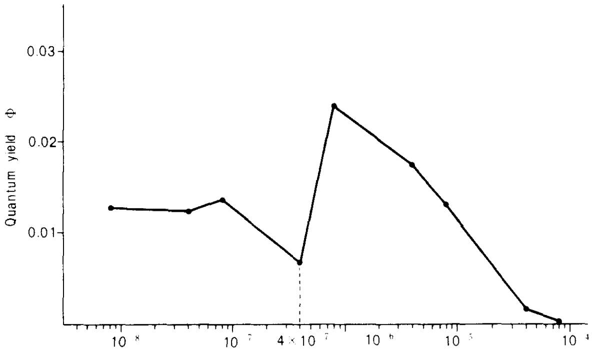


図7 HpDの各濃度に対応する量子収率
Relationship between guantum yied and concentration of HpD

って全体の蛍光の強度が大きく変るので最高ピーク値を一定の高さにそろえて示す。

HpDの各濃度に対応した蛍光量子収率を**図7**に示す。HpD濃度が10^{-7}mol/lまで蛍光量子収率は0.012～0.014とほぼ一定の値を示しているが，4×10^{-7}mol/lで0.006と低い値を示す。しかし，8×10^{-7}mol/lで0.024と高くなり，以後濃度の増大に伴って減少していく。量子収率の低下が見られる4×10^{-7}mol/lの390nmにおける分子吸光係数ε（mM）は50.13であり，HpD濃度の値とほぼ同じである。しかし量子収率の低下が見られるHpDの濃度は，前述のQ帯の吸収スペクトルが変化した濃度と一致している。したがってQ帯の4つのピーク，$Qx_{(0-0)}$，$Qx_{(0-1)}$，$Qy_{(0-0)}$，$Qy_{(0-1)}$が形成される時，蛍光量子収率は低下するのではないかと思われる。HpDの濃度を上げていくと，蛍光量子収率は8×10^{-7}mol/lで0.024と上昇後，4×10^{-6}mol/lで0.0175，8×10^{-6}mol/lで0.0132，4×10^{-5}mol/lで0.0017，8×10^{-5}mol/lで0.0002と急速に減少している。この減少はdimer形成，増大によるHpD自体による消光現象によると考える。

HpDはSoret帯390nmの励起により励起一重項状態のエネルギーレベルに上る。このエネルギーが基底状態に蛍光を伴って落ちる割合を蛍光量子収率で求めた。また，この励起一重項状態のエネルギーの，励起三重項状態への無輻射遷移レートは蛍光量子収率と蛍光寿命から求められる。蛍光量子収率(Φ_{FM})と蛍光寿命(τ_M)の測定値から輻射寿命(τ_{FM})を$\tau^{-1}_{FM}=\tau^{-1}_{M}\cdot\Phi_{FM}$式から求める。次に無輻射遷移レート($K_{IM}$)は，蛍光寿命と輻射寿命から$1/\tau_M=K_{IM}+1/\tau_{FM}$式(20)で求める。

2.5×10^{-5}mol/lHpDリン酸緩衝溶液(pH7.2)の蛍光減衰曲線を求めた(**図8**)。これより蛍光寿命を測定する。このHpD溶液に酸素を飽和させると蛍光寿命は176p.secとなり，また酸素を取り除いた場合333p.secとなる。この濃度でのHpDの蛍光量子収率は0.0029であるので，この値と酸素飽和状態の蛍光寿命τ_M=176p·secから輻射寿命は60.69nsecとなり，無輻射遷移レートK_{IM}は5.67×10^9·sec^{-1}となる。

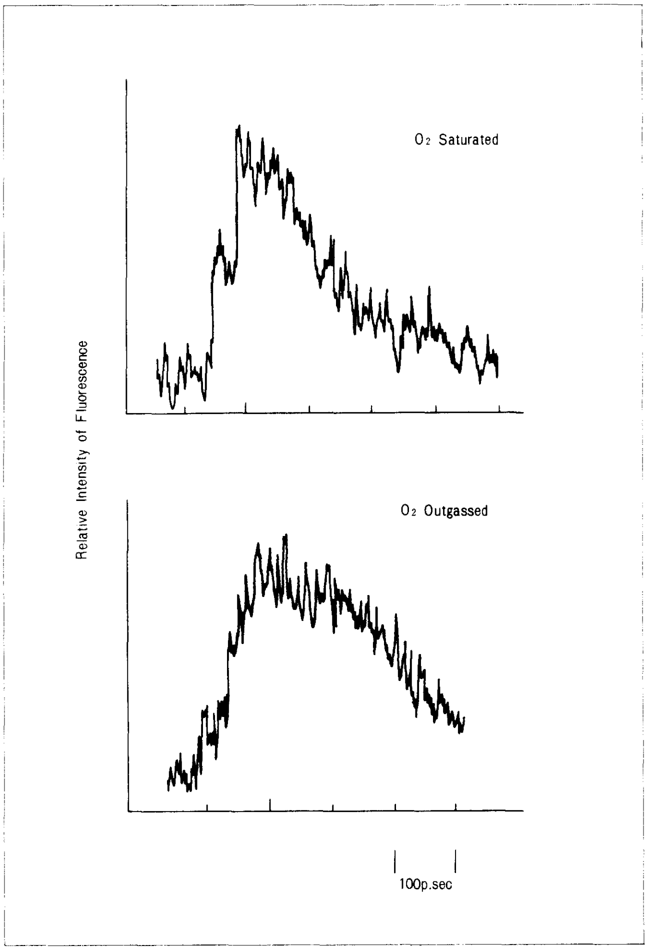


図8 HpD(2.5×10^{-5}mol/l)の蛍光減衰曲線
(電子技術総合研究所製作の装置による。)
Decay curves of HpD(2.5×10^{-5}mol/l)
by the apparatus of Electro-technical
Laboratory,Ministry of International
trade & Industry

酸素除去状態でHpDの蛍光寿命τ_M=333p·sec, 輻射寿命τ_{FM}=114.83nsec.となり, 無輻射遷移レート$K_{IM}=2.99\times10^9$ sec^{-1}となる。この様に励起一重項からの無輻射遷移レートは, 酸素飽和溶液中の方が無酸素状態のHpDより約2倍高かった。HpDの励起一重項のエネルギーが酸素によって消光を起していることは, Dougherty,T.J.[7]やWeinshaupt,K.R.[9]が提唱した, HpDの光化学反応によるSinglet Oxygen形成により腫瘍組織の殺傷効果に充分な可能性のあることを示している。

研究は昭和57年度科学技術総合研究委託費によった。

4. 結　論

リン酸緩衝溶液(pH7.2)中のHpDの濃度を変化させた時の吸収スペクトル, および蛍光スペクトルを測定した。

4×10^{-7}mol/lHpD溶液では$Qx_{(0-1)}$と$Qy_{(0-0)}$に吸収ピークを観測され, 8×10^{-8}mol/lでは$Qx_{(0-0)}$, $Qx_{(0-1)}$, $Qy_{(0-0)}$, $Qy_{(0-1)}$の4本の吸収ピークが形成された。

このQ帯の吸収スペクトル範囲は3350cm^{-1}の幅に存在していた。

Q帯の変化に対応しSoret帯のmonomerを示す吸収ピーク(395nm)は, dimerの吸収ピーク(365nm)に移動していた。

HpD2.5×10^{-5}mol/lリン酸緩衝溶液中で蛍光量子収率と蛍光寿命を測定した。この結果から励起一重項からの無輻射遷移レートを算出した。

酸素飽和状態のHpDは無酸素状態のHpDに比し無輻射遷移レートは約2倍高かった。

参考文献

1) Auler, H., and Banzer, G., *Z. Krebstorsch*, **53**, 65 (1942).
2) Figge, F.H.J., and Weiland, G.S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **68**, 640 (1948).
3) Lipson, R.L., Mastar's Thesis, Univesity of Minesota, 1960.
4) Lipson, R.L., Baldes, E.J., and Olsen, A.M., *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**, 1 (1961).
5) 會沢勝夫, 大畑進, 大多和正樹, 西宮克明, 沢裕幸, 小野寿太郎, 小中千守, 会田征彦, 加藤治文, 早田義博, *J.J. Cancer Therapy*, **3**, 790 (1983).
6) Aizawa, K., Kato, H., Ono, J., Konaka, C., Kawate, N., Yoneyama, K., Otawa, M., Shinohara, H., Saito, M., Takahashi, H., Nakamura, H., Yamada, T., Sakai, H., and Hayata, Y., 印刷中 (1983).
7) Dougherty, T. J., Grindey, G.B. and Fiel, R., *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 115 (1975).
8) Weishaupt, K.R., Gomer, C.J., and Dougherty, T. J., *Cancer Res.*, **36**, 2326 (1976).
9) Young, R., Wherly, K. and Martin, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5744 (1971).
10) Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C., Ono, J., and Takizawa, N., *Chest*, **81**, 269 (1982).
11) Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C., Ono, J., Matsushima, Y., Yoneyama, K., and Nishimiya, K., *Chest*, **82**, 10 (1982).
12) Parker, C.A., and Rees, W.T., *Analyst*, **85**, 587 (1960).
13) Yamashita, M., Sato, T., Aizawa, K., and Kato, H., "Picosecond Phenomena III," ed by Eisenthel, K.B., Hochstrasser, R.M., Kaiser, W., and Laubereaw, A., Springer-Verlag (1982), pp. 283-301.
14) Yamashita, M., Honda, T., Sato, T., and Aizawa, K., *IEEE Transactions Instrumentation and Measurement*, **32**, 124 (1983).
15) Rimington, C., Mason, S.F., and Kennad, O., *Spectrochim. Acta*, **12**, 65 (1958).
16) Simpson, W.T., *J. Chem. Phys.*, **17**, 1218 (1949).
17) Gallagher, W.A., and Elliott, W.B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **206**, 463 (1973).
18) White, W.I., "The Porphyrins," ed by Dolphin, D.; Academic Press (1980), vol.V, p.310.
19) Fajer, J., Borg, D.C., Forman, A., Dolphin, D., and Felton, R.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3451 (1970).
20) Parker, C.A., and Rees, W.T., *Analyst*, **85**, 587 (1960).

U.D.C.〔543.544.42.084.82:541.138.2.08〕:547.952.06

HPLC-ECDによる生体成分の分析法

Methods for the Analysis of Biomaterials by HPLC-ECD

入山 啓治* 岩本 武夫** 吉浦 昌彦***

(昭和58年7月25日受理)

1. はじめに

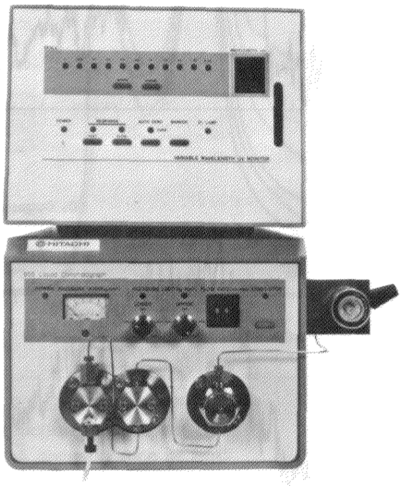
カテコールアミン(CA)の分析は, CAが陽分極下で酸化電流を示すというCA固有の性質と, CAの量と酸化電流の量とが比例関係にあるということを利用し, クロマトグラムを電気化学的にモニターするとpgオーダーまで簡単に再現性よく定性定量分析できるので, HPLC-ECDシステムによって達成されることが多い。ECD[1]とはelectrochemical detection(電気化学検出)の略で, その機能を有する装置をelectrochemical detector(電気化学検出器)という。我々の経験からすると, 蛍光検出器でモニターするよりか, 電気化学検出器でモニターする場合の方が, CAのルーチン定性定量分析手法としてはるかに優れていると結論している。例えば, CA固有の発蛍光能を利用してクロマトグラムをモニターする自然蛍光法では, CAの割合い多い尿中のCAの定性定量分析するのがようやっとで,[2] 血清中のCAの分析となると, バックグラウンドの蛍光を低下するのに特別の注意を払い, ようやくシグナルを得たという始末で, ルーチン分析手法として適さない。THI法[3]のように, CAを化学修飾して発蛍光能を向上させて検出感度の向上に成功しているが, その程度の検出感度はHPLC-ECD法を採用すれば容易に達成できる。国際的には, CAの定性定量分析は, HPLC-ECD法が多用される理由である。

我々は, CA,[4-6] HVA(homovanillic acid)やVMA(vanillylmandellic acid)のようなCAの代謝生成物[7] および尿酸(UA)[8-11]のHPLC-ECDシステムによるルーチン分析法の最適化又は開発を意図し, 数pgのオーダーでルーチン分析をこなし初期の目標を達成している。分析システムの性能の向上の結果, 試料採取法, 試料の前処理法から生ずる誤差が露骨にめだち, これら手法の開発も併せて行なっているが[2),3)-11)] 本稿では, これら分析手法について総括的に報告する。

2. HPLC-ECDシステム

最近では, 輸入品ばかりでなく国産品も性能の良い電気化学検出器が市販されている。どの組み合わせが最も良いか結論を得てないが, **表1**に示したシステムIとIIもまた好成績を与えている。発表論文の分析に用いたのはシステムIIである。充塡剤#3057はKK日立製作所からの試供品で粒子径が3μmで, 従来のSILC$_{18}$(粒子径10μm)に比べ, 他のHPLCの条件が同一なら2倍程度感度が向上することが分かった。

* 東京慈恵会医科大学 共同利用研究部分析機器室 室長, 理博
** 東京慈恵会医科大学 共同利用研究部分析機器室 研究技術員
*** 東京慈恵会医科大学 共同利用研究部分析機器室 理博



655形日立液体クロマトグラフ

TABLE I HPLC-ECD system used in this study

	System I	System II
Solvent delivery system	Hitachi 655 Liquid Chromatograph	Model TRIROTOR III (JASCO)
Electrochemical detector	Model ECP-I (Kotaki)	Model ECP-I (Kotaki)
HPLC colum	#3057, 150×4.6mm I.D. (Hitachi)	SIL C18, 250×4.6mm I.D. (JASCO)
Column temperature	25±1°C or room temperature	40°C

3. 分析条件の決定

3.1 電気化学検出器

分析対象物質ができるだけ大きな酸化電流を示す陽分極下でモニターすれば, それだけ検出感度は向上するのだが, カーボン電極の保護, 雑音の減少, 分析非対象物質のクロマトグラムからの抹殺を意図すると, それ程大きな陽分極下での分析は望めない。ECP-1型で用いられているグラッシーカーボン電極は1.5Vになると電極そのものがいたみ, 我々のHPLC条件下では1.2V以上になると雑音が多くなる。更にクロマトグラムから微量非分析対象物質のピークを除くとなると, 少し感度を落として0.8V程度の陽分極の下で分析するのが良いということになる。**Fig.1**にCAのボルタモグラムを示す。ノルエピネフリン(NE), エピネフリン(E), ドーパミン(DM), そしてドーパ(Dopa)も, 0.8Vで大きな酸化電流を示すことが分かる[5)] UA[9)]もHVAやVMA[11)]も, 0.8Vの電位をかけると比較的大きな酸化電流を示す。例えば, 血清中のVAの分析の場合, 感度を落とすと, 血清を除蛋白しただけでHPLC-ECDシステムにinjectionする

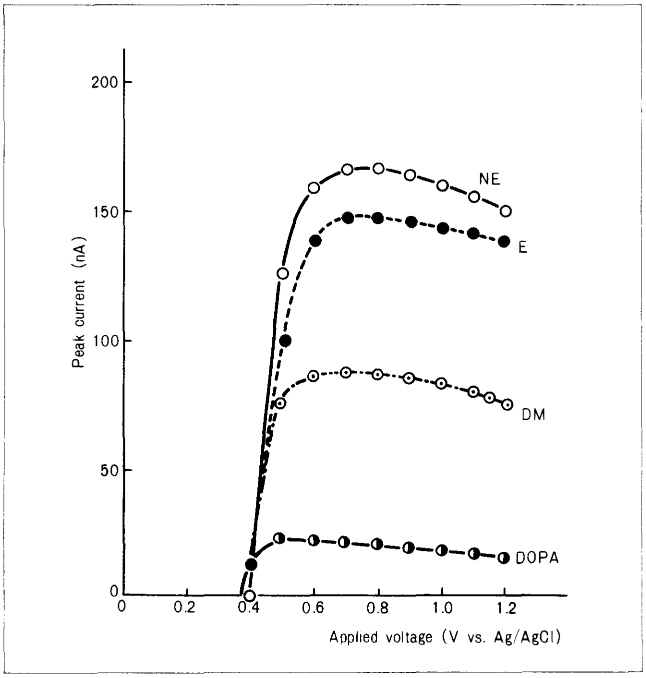


Fig. 1. Hydrodynamic voltammograms for norepinephrine (NE), epinephrine (E), dopamine (DM), and DOPA. The curves were obtained on the chromatographic System II (see Table I) by repeated injection of each catecholamine solution at a different electrochemical detector potentials. The mobile phase used in this study was 0.1 M phosphate buffer (KH_2PO_4-H_3PO_4 pH 2.0).

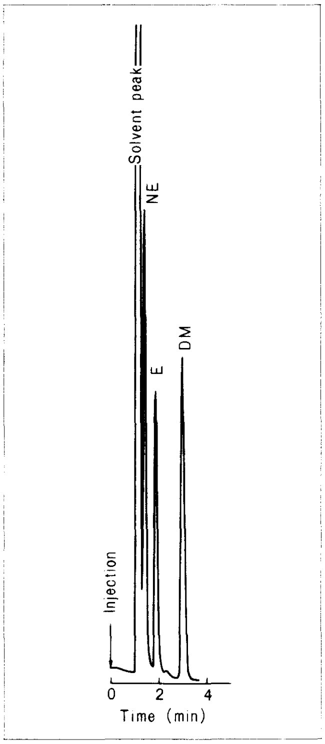
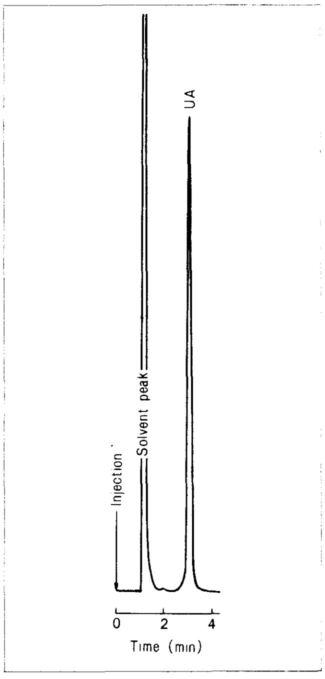


Fig. 2. High-performance liquid chromatogram of the sample solution containing norepinephrine (NE), epinephrine (E), and dopamine (DM). Ten microliters of the sample solution was injected into a column (♯3057, 150× 4.6mm I.D., Hitachi) by using a microsyringe. The eluent was 0.2M phosphate buffer (KH_2PO_4-H_3PO_4, pH 2.0). The column temperature was 25±1°C. Eluate from HPLC was electrochemically monitored by aid of an electrochemical detector under the potentiostatic condition (+800mV vs. Ag/AgCl). The flow rate was 1 ml/min. As described above, the chromatographic separation was carried out by the System I (see Table 1).

Fig.3. High-performance liquid chromatogram of a standard uric acid solution (1 μg/ml). Ten microliters of the uric acid (UA) solution wa injected in the chromatographic System I (see Table I). The chromatographic conditions were the completely same ones as used in Fig.2. The standard UA solution was carefully prepared. An aliquot (0.05ml) of 0.05 N NaOH solution was dropped into 10 mg of UA for dissolving it completely because of its low solubility in pure water. A 0.1N HCl (9.95ml) was added into the alkaline UA solution. The stocKsolutions were stored at 4°C. Appropriate dilution of each stock solution was done with water just before use. Hydrodynamic voltammgram for UA is shown in Ref. 9.



と，UAのピークだけがクロマトグラムに生じ，血清中のUA量の絶対値に近いものが測定できる。[10]感度を向上すると，UAの分析は不能となるがCAの分析が可能となる。

3.2 充塡剤と展開溶媒と流速と

ここでは，ODS系（逆相クロマト用）の市販品，♯3057（粒子径3μm）とSILC18（粒子径10μm）について実施した。同じODS系でも分離条件が微妙に異なり，各々についてその最適化を計らねばならない（本音をいうなら，充塡剤，クロマト管も含めた国際的規格化を切望したい。メーカー毎に規格が異なるので混乱する）。システムIIでは，充塡剤としてSIL C18(粒子径10μm)，展開溶媒として0.1M又は0.2Mリン酸緩衝液(KH_2PO_4-H_3PO_4，pH2.0)を使用することにより，CA[2),4)~6)] HVAとVMA[7)] UA[8)~11)]の分離に好成績を得た。システムIでは充塡剤として♯3057を用い，システムIIと0.2Mの同一溶媒系でCAの分離を実施したところ，検出感度の2倍程度の向上と，分析時間の短縮が達成できた。**Fig.2**に標準試料(NE，E，そしてDMを含む。)の分離実施例を示す。**Fig.3**にUA標準試料の**Fig.2**と同じ条件下でのクロマトグラムを示す。この条件下ではUAとDMのピークのretention timeが全く同じで，NE，E，DMとUAを含んだ標準試料をinjectionすると，**Fig.4**に示すように，UAとDMのピークが重なり，みかけ上DM又はUAの量が増加した如くになる。ODS系の充塡剤の場合，このようなことがしばしば起る。ここで注目すべきは，CAの分析のため生体試料をアルミナ処理する場合，UAもCAとともにアルミナに吸着する[8)]という事実である。従来，この事実に十分注意が払われていなかった。システムIIによる分析では，UAは独立なピークとして分離していた。使用する充塡剤，展開溶媒系によってかなり分離の様子が異なってくる一例である。ところがシステムIで，展開溶媒として0.1Mリン酸緩衝液(KH_2PO_4-H_3PO_4，pH3.0)に8mg/lのSPSを加えたものを用いたところ，**Fig.5**で示すような好結果を得た。SPSの添加により，分析時間は長くなるが，それでもシステムIIによる分析時間は短縮されている。

我々は，展開溶媒は廃液処理のことを考えて，なるべく

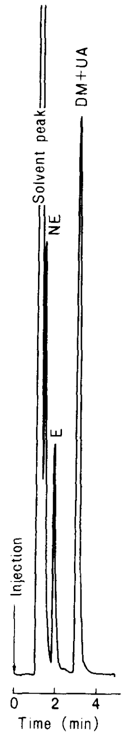


Fig.4. High-performance liquid chromatogram of the sample solution containing 1 μg/ml of each catecholamine and of uric acid (UA). Ten microliters of the sample solution was injected in the chromatographic System I (see Table I). The chromatographic conditions were the completely same ones as used in Figs. 2 and 3. The chromatographic peaks of UA and DM were completely overlapped as shown in this figure.

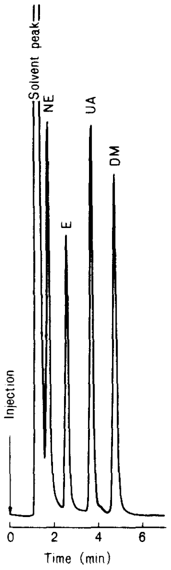


Fig.5. High-performance liquid chromatogram of the same sample solution as used in Fig. 4. The mobile phase used was 0.1 M phosphate buffer (KH_2PO_4-H_3PO_4, pH 3.0) containing SPS (8mg/l). Any other chromatographic conditions were the completely same ones as used in Figs. 2, 3, and 4. As shown in this figure, the complete separation among each component in the sample solution was achieved uhder the present chromatographic conditions. See also Fig. 4.

廃液処理の簡単な展開溶媒系の使用ですますことを考えている。よく使用されているアセトニトリルはこんな訳で使用の対象外としている。イオンペアーとしてSDSが良く使用されているが，SDSはODS系の充填剤の劣化を促進するので，その使用をさけている。数回で高価なカラムが使用不能になることもある。リン酸緩衝液の濃度を大きくすると，保持時間が長くなり，分離が向上する。このような訳で，尿中のCA代謝物の分離には，0.1Mの代りに0.2Mのリン酸緩衝液を使用したのである[7] しかし，その濃度が大きくなりすぎると，緩衝液成分が結晶析出し，トラブルの原因となる。このトラブルを防ぎ保持時間を長くして分離を良くするために，イオンペアーの使用が考案された。展開溶媒のpHは，ECD法により分析する限り，高い方が好ましいのだが，CAの化学的安定化のためには低い方がよいということで，pH 2からpH 3のものを使用している。

4. 前処理法

標準試料の分析は達成できたが，生体試料の分析となるとなかなか目的とする分析結果が得られないということをよく耳にする。この中には，区別されるべき大きな2つの要因がある。1つは検出感度であり，もう1つは再現性である。血清中のCAは通常低レベルなので，血清を除蛋白しただけで分析にかけるとなると，極めて難しい作業となる。HPLC-ECDシステムの検出感度は，システムIとIIでは，pgオーダーがぎりぎりのところである。従って，維持しやすい検出感度のところで分析しようとすると，アルミナ処理法[12]に代表される生体試料中のCAの濃縮・精製操作が要求され，その分だけ試料の量が多く必要となってくる。検出感度が向上すれば，患者からの採血量が少量ですみ患者の負担が軽くなるし，組織中の微小特定部分中のCAの定性定量分析も可能となる。最高感度のところでようやく分析できたとしても，その維持が出来ないとルーチン分析手法としては適さない。次に再現性について考察してみる。HPLC-ECDシステムの提案により，数pgのCAの定性定量分析が再現性良く達成できるようになったので，分析結果のバラツキは，主として試料採取からその前処理操作に起因すると考えられる。特に試料が微量又は試料中のCA量が極めて少ないものについて，CAレベルの微妙な変動に関する情報を得たい場合，仮に一例一例のCAの分析が達成されても，前処理操作までの再現性が悪いと，分析結果がバラツイて，なにがなんだか分からなくなってくる。

我々のところは，学術的価値（臨床的価値のみでない。）ある分析結果を，ルーチンサービスすることを使命としている。分析依頼者に対しては，試料の採取条件を一定にするよう要望し，試料採取してからすぐに前処理操作に入り（少なくとも3分以内を原則とする。），引き続いてHPLC-ECDで分析することにより，好成績を得ている。試料採取法，前処理法はいろいろと提案されているが，どれが最も良い手法か筆者らは結論を得ていない。試料の種類，試料中のCAの量，試料採取の地理的要素などを勘案して，case by case で処理している。再現性の良い分析結果を得るには極めて重要な操作過程であるが，一般論があるようでないので，本稿ではこれ以上言及しない。

5. 生体試料中のCA, HVA, VMA, UAのHPLC-ECDによる分析実施例

この章で示すクロマトグラムは，特記しない限り，システムIの使用により得られたものである。

5.1 CAとUAの分析

Fig.6に，**Fig.5**と全く同じクロマト条件下でのCAとUAの検量線を示す。

Fig.7に，**Fig.8**に示す前処理法で処理したラット脳内のCAとUAの分析実施例を示す。**Fig.7**の中で，XとYの未知ピークが生じ，Xが多い試料（例えば脳）ではNE，Yが多い試

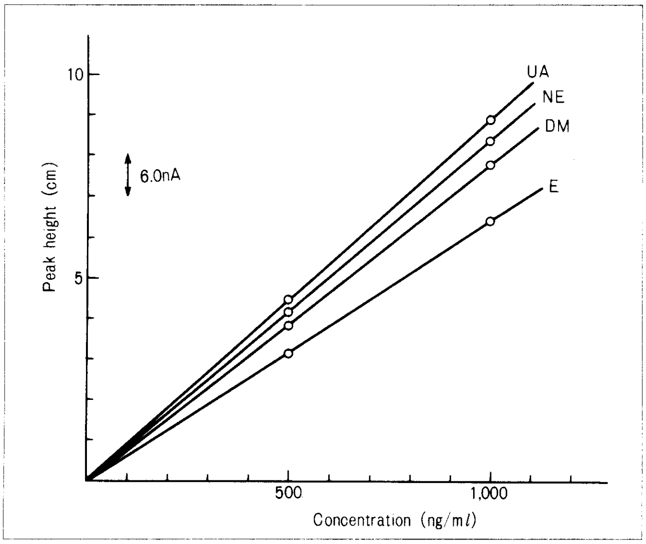


Fig.6. Calibration curves for UA, NE, DM, and E under the chromatographic conditions used in Fig. 5. The minimum detectable quantity of each material was 5 pg under the best chromatographic conditions.

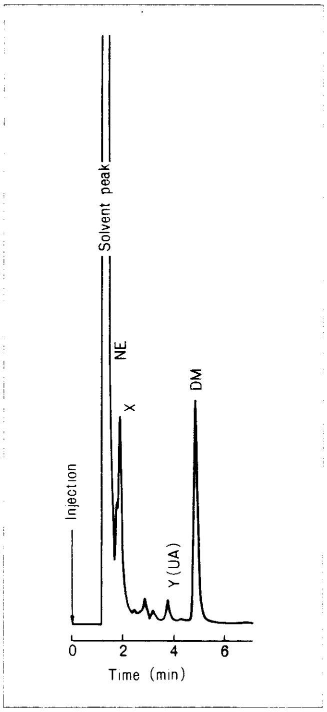


Fig.7. High-performance liquid chromatogram of the catecholamines and UA extracted from a rat whole brain tissue and then concentrated by the procedure illustrated in Fig. 8. Ten microliters of the HCl layer (see Fig. 8) was injected into the chromatographic System I (see Table I). The chromatographic conditions employed were the completely same ones as used in Fig. 5. The chromatographic peaks of NE and DM were observed as presented in this figure. In addition, two unidentified peaks (Peak X and Peak Y) were observed. The peak Y was found to represent UA (see Ref. 8). The peak X component has not yet been determined. Under the present chromatographic conditions, presence of the Peak X in a chromatogram tends to disturb the quantitative determination of NE. For the good separation of rat brain catecholamines, see Ref. 8.

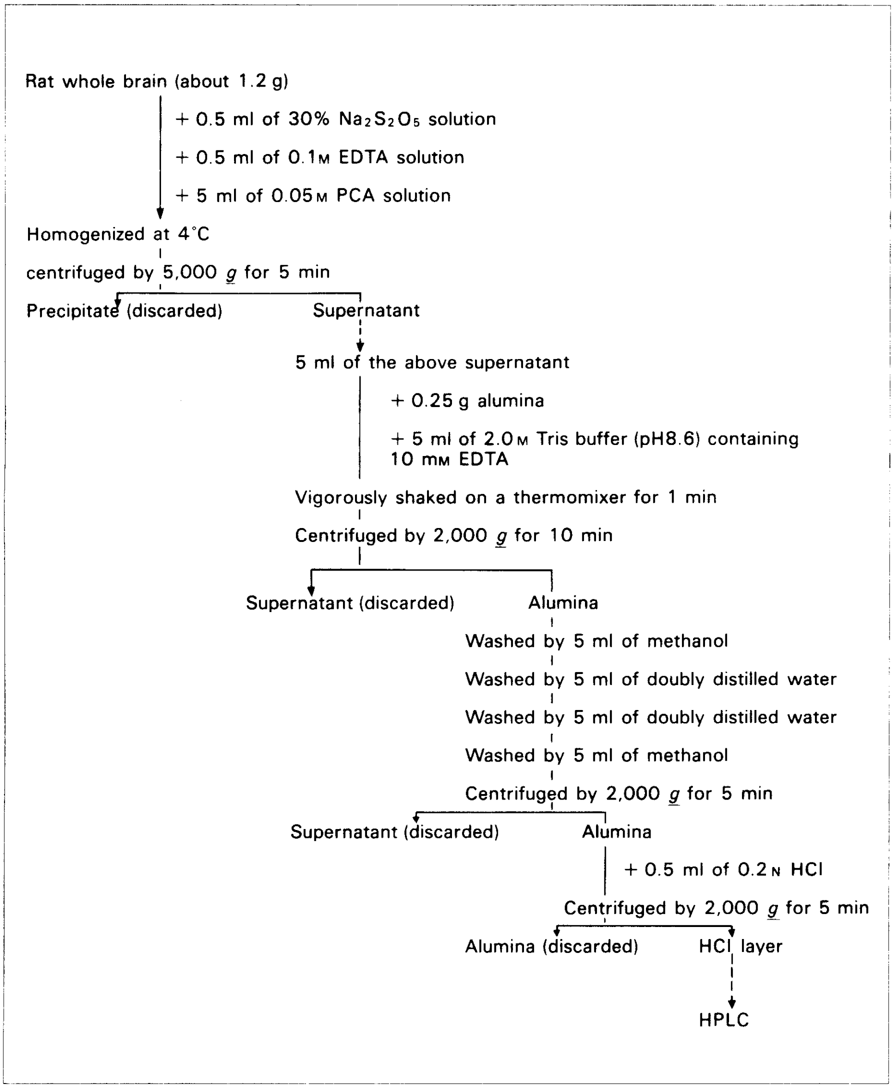


Fig.8. Flow sheet of the alumina procedure for extraction and preliminary purification of catecholamines and uric acid in a rat whole brain tissue. Ten microliters of the HCl layer was injected into the chromatographic System I (see Table I). The alumina procedure was conducted at 4°C. An alumina preliminary treatment procedure, a routine method for the determination of catecholamines in biological materials was re-examined, by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (see Refs. 2, 4-6, and 8). A detailed investigation of the factors affecting the alumina and HCl solution in the procedure in relation to recoveries of catecholamines and uric acid in biological materials. For example, when more or less than the optimum alumina amount was used in the procedure, the recovery of each catecholamine and uric acid from biological materials became steeply less than the maximum under the present experimental conditions. Liberation of catecholamines and uric acid from the catecholamine and uric acid-adsorbed alumina was conducted by addition of HCl into the alumina. The desorption efficiencies are independent of the initial catecholamine and uric acid concentrations in biological fluids or extracts as well as the HCl concentrations in the acidic solutions, but dependent on the amounts of the HCl solutions added into the catecholamine and uric acid-adsorbed alumina for the liberation of catecholamine and uric acid. When liberation of catecholamines and uric acid was conducted by addition of perchloric acid (PCA) solution, the appearance of a negative peak (the so-called solvent peak) near the void volume disturbed the qualitative analysis of NE (see Ref. 5). The use of the HCl solution gave good results in the quantitative determination of NE by the chromatographic System II (see Table I).

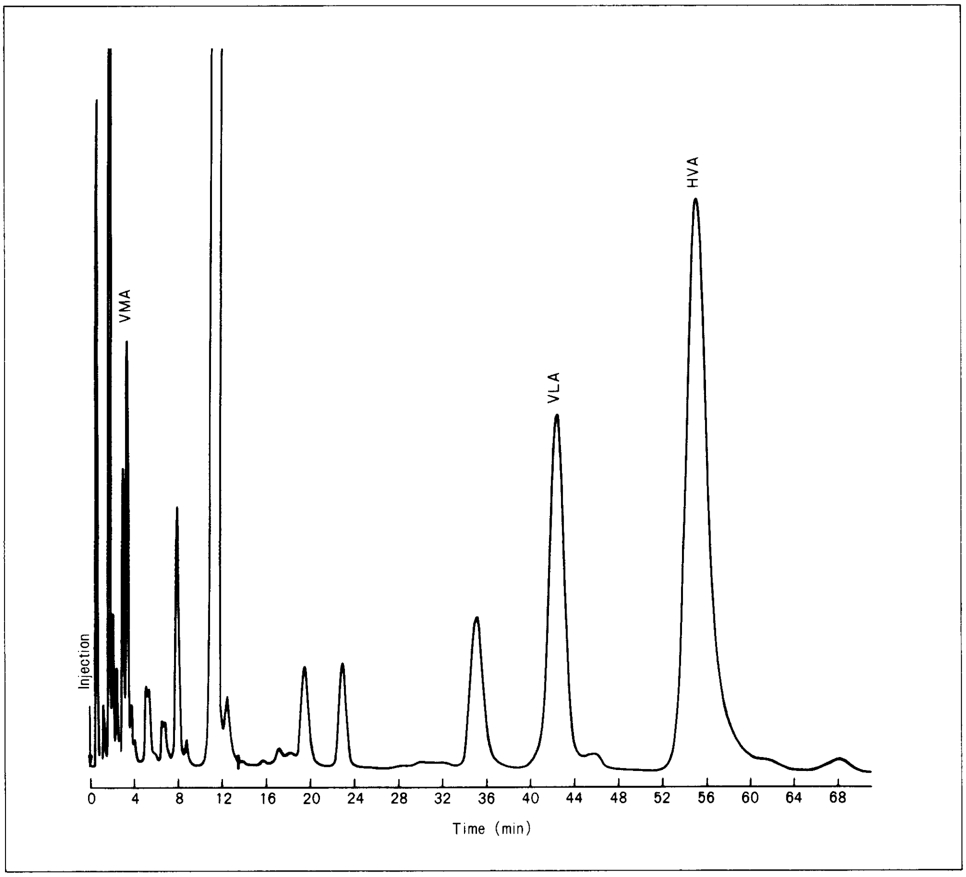


Fig.9. High-performance liquid chromatogram of the ethyl acetate-extract from urine of a patient with neuroblastoma before operation. Ten microliters of the HCl solution (see Fig.10) was injected into the chromatographic System I (see Table I). The mobile phase was 0.2 M phosphate buffer (KH_2PO_4-H_3PO_4, pH 2.0). The flow rate was 2 ml/min. Any other chromatographic conditions were also the same ones as used in Fig. 2.

料（例えば血清）ではDMの定性定量分析をさまたげる。YがUAと同定された。[8] システムIで展開溶媒中にSPSを加えずに分離すると，クロマトグラムでDMとUAのピークは重なってしまった。UAの多い試料では，電気化学検出器の感度を落とすことにより，例えば血清中のUAの分析の目的では，クロマトグラム上UAのピークしか見い出せない[10]のは先に記した通りである。

5.2 HVAとVMAの分析

Fig.9に，Fig.10の前処理操作で処理した神経芽細胞腫(Neuroblastoma)の患者の尿のクロマトグラムを示す。このクロマトグラムは，新しいNeuroblastomaの診断の標的物質を探索することを意図したので，分析時間を意図的にに長くしている。展開溶媒は，0.2Mリン酸緩衝液(KH_2PO_4 H_3PO_4, pH2.0)であった。図中，HVAとVMA以外にNeuroblastomaの診断の指標となると考えられているVLA(Vanillyllactic acid)のピークも示してある。

6. おわりに

以上，我々の経験を中心にHPLC-ECD法による分析手法について記した。これらいずれの手法も，我々のところで，ルーチン分析サービスに採用し好成績をあげているものである。[13] 高感度分析をルーチンにするという視点から記したので，実にたくさん提案されている関連の分析手法を紹介することは，誌面の都合ということもあって省略した。我々がここで紹介した手法を最適化又は開発する際の前提条件として，誰がやっても(イ)簡単に，(ロ)再現性良く，(ハ)高検出感度で，(ニ)短時間に，(ホ)無公害的に，しかも(ヘ)「安

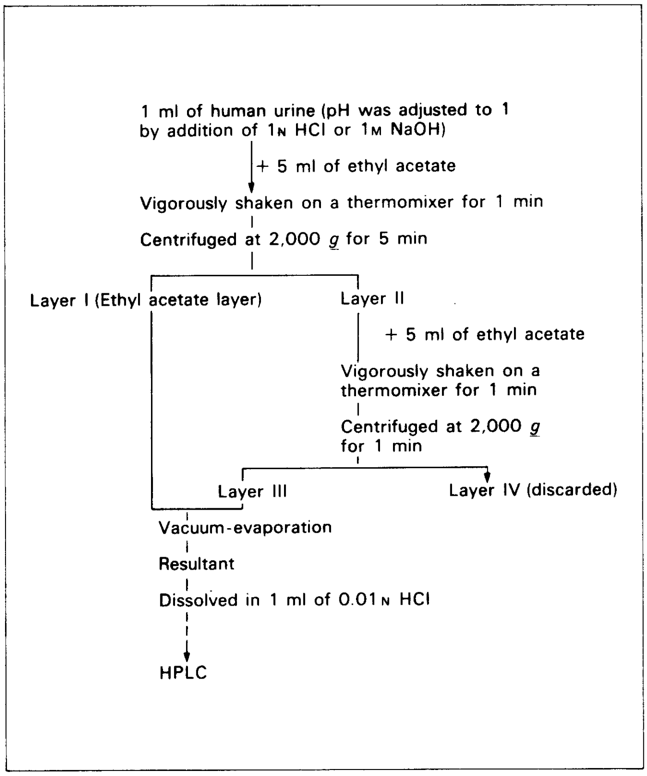


Fig.10. Flow sheet of the extraction procedure of VMA and HVA from human urine with ethyl acetate. The final recovery of each of three catecholamine metabolites was found to be about 100%.

く」分析できるということを考えた。ここで紹介した手法は，これら前提条件をほぼ満足していると思っている。

HPLC-ECDシステムによる分析可能な物質は，陽（陰）分極下で酸化（還元）電流を示す全てのものである。文献14にそれら分析対象物質の例がいくつか表示してある。分析実施例はますます多くなっているが，これらの具体例の紹介は別の機会にする。

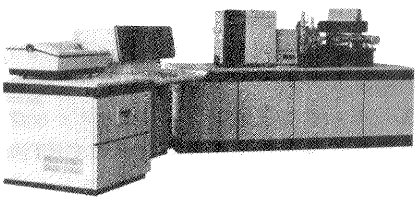
尿のようなものは別として，血液や脳内のCAレベルの変動を把握する目的には，HPLCによる分析は有利な手法とはいえない。もし仮に，血管中に微小電極をさしこんで，連続的にCAの定性定量分析が可能になれば，より厳密にCAレベルの変動が直接把握できるようになる。最近になって，動物の脳内に微小カーボン電極をさしこみ，CAの連続的定性定量分析に成功している[15]ようやくシグナルが得られたというのが現実であるが，将来有望な手法となることが予想される。また，組織中のCAの分布を目で観察しながら把握する手法として，蛍光電顕法や免疫電顕法が有力な武器となってきている[16]いずれの手法も試みの段階をようやく越えたところであるが，HPLC-ECD法と相補的共存共栄し得る手法と思われる。RI法は，検出感度は極めて良く，多用されてきたが，分析結果の信頼性（再現性）を考慮に入れると，実用的検出感度はそれ程でない。廃棄物処理のことなど問題があるので，微量成分の代謝過程を追跡する場合や前処理の際の回収率を求める場合とか，どうしてもRI法を使用せねば目的が達成できない場合に限定して使用されるべき手法であろう。

参考文献

1） ECDについての詳しい解説書はないが，例えば次の文献が参考になる。P.T.Kissinger, Anal.Chem., 49（1977）447A
2） T.Iwamoto, M.Yoshiura, Y.Ozaki, and K.Iriyama, Jikeikai Med. J., **29**（1982）361.
3） For example, Y.Yui, M.Kimura, Y.Itokawa, and C.Kawai, J.Chromatogr., 177（1979）376.
4） T.Aoki, M.Yoshiura, T.Iwamoto, Y.Ozaki, and K.Iriyama, Jikeikai Med.J., **29**（1982）385.
5） K.Iriyama, M.Yoshiura, and T.Iwamoto, Jikeikai Med. J., **30**（1983）35.
6） T.Iwamoto, M.Yoshiura, and K.Iriyama, Jikeikai Med. J., **30**（1983）123.
7） M.Yoshiura, T.Iwamoto, K.Iriyama, T.Tokoro, Y.Eto, and K.Maekawa, Jikeikai Med. J., **30**（1983）in press.
8） T.Iwamoto, M.Yoshiura, and K.Iriyama, Jikeikai Med. J., **30**（1983）177.
9） T.Iwamoto, M.Yoshiura, and K.Iriyama, J.Chromatogr., in press.
10） K.Iriyama, M.Yoshiura, T.Iwamoto, T.Hosoya, H.Kono, and T.Miyahara, to be published in J.Liquid Chromatogr.
11） M.Yoshiura, T.Iwamoto, K.Iriyama, T.Kanki, Y.Kato, H.Sekino, and N.Nakamura, Jikeikai Med J., **30**（1983）in press.
12） For example, A.H.Anton and D.F.Sayre, J.Pharmacol. Exp. Ther., **138**（1962）360.
13） 我々の既発表論文中では，システムIIを用いた分析例のみを示している。
14） W.P.King and P.T.Kissinger, Clin. Chem., **26**（1980）1484.
15） For example, P.M.Plotsky, W.J.de Greef, and J.D.Neill, Brain Res., **250**（1982）251.
16） For example, H.Schröder, K.Lackner, and Ch.Heym, J.Neurosci. Methods, **6**（1982）281.

Topics

M-80B形 日立二重収束質量分析計システム



質量分析の急速な進歩，応用分野の拡大は，得られるデータ量の膨大化をもたらすと共に，測定操作の複雑化を余儀なくさせています。本システムにより，多量のデータを短時間に，より高度なデータに変換する事は勿論，MF，リンクドスキャン，FD等質量分析計本体をより積極的に制御し，高度なデータを簡単な操作で，収集から出力まで一括して効率良く行うことができます。

■特　長

(1) 制御部とデータ処理部の一体化による効率の良い操作

質量分析計の制御と取得データの処理をCRT対話で同じ操作パネルから行え，操作性が一段と向上しました。制御パラメータをプリンタへ出力することも可能です。

(2) 多数のCPUを配置した高性能システム

中央にシステムを統括するCPUを配置し，周辺に高速高性能データ収集専用CPU，MS制御CPU，出力制御CPUを置き，システム全体で最も効率が向上するように構成されています。このため，制御，データ収集，データ処理，データの出力の4重の多重処理が実現できます。

(3) 信頼性の高い大容量記憶装置

塵埃に強い密閉形の磁気ディスクを採用しました。容量は40M Byteで検索用データであれば約5万スペクトルが一度に収納可能です。更に取得したデ

ータを編集保管するのに便利で，かつ保管場所を余りとらない容量20M Byteの小形磁気テープ装置が標準装備されています。

(4) 豊富なファンクションキーによるジョブ指定とカーソル機能

CRT対話とファンクションキーを組み合わせたジョブ指定方式を採用しました。誰もが簡単な操作でシステムの持つ能力を自由に引き出すことができます。また作図の座標指定，拡大，縮小範囲の指定等がカーソルキーで自由に設定できます。

(5) 豊富なプログラミング機能とユーザー指定のファンクションキー

ユーザーの方々があらかじめ定められたサブルーチンを組み合わせることにより，BASIC風にCRT/キーボードから直接プログラムし，固有のジョブを作成することが可能です。しかも，そのジョブをメニュー方式で自由に選択できる様に，ユーザーの専用ファンクションキーを用意致しました。このプログラミング機能を利用して，システムを自動，無人運転，処理へも発展することができ，使用効率の大幅アップが可能となります。

■ 主な仕様

(1) 分解能　25,000　10%

(2) 感　度　GC-MS測定

メチルステアレート0.5×10^{-10}gをGCへ注入し，分子ピーク(298)をS/N比，10以上で検出

(3) 質量範囲

m/E I ～1500/3kV，1～1800/2.5kV
1～2250/2kV，1～3000/1.5kV
の4段階切替

(4) イオン源

Ei/Ci共用形，予備イオン源付

(5) パラメータ表示

スキャン速度，質量数，マスレンジ，フィルター，マルチプライア電圧，リテンションタイム，サンプルNo，スキャンNo，ディスク使用量，検索用データ数などがCRT上に表示されます。

■ 主な構成

(1) GC-MS本体

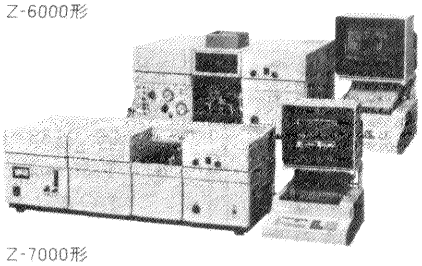
(GC，Ei/Ciイオン源，PFK導入系，直接導入系付)

(2) 制御，データ処理部

12″CRT×2，キーボード，磁気ディスク装置，磁気テープ装置，プリンタプロッタ

Z-6000形/Z-7000形 日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計

Z-6000形



Z-7000形

日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計

原子吸光分光光度計とは，試料中の金属元素を炎あるいは電気炉の熱で原子化し，光源(ホローカソードランプ)からの光がその原子に選択的に吸収される現象(原子吸光)を利用し，この吸光度から金属を定量するものです。しかし，実際の分析を行なう場合，原子吸光以外に光源からの光を減光するものが存在することが多々あり，それ等は，測定誤差となることが既に知られています。従来より使用されているフレーム法およびグラファイトアトマイザ法の原子吸光光度計では，D_2ランプ等の連続光源を用い，それらの誤差要因を補正することを行なっていますが，機構上の理由から有機溶媒使用時やスケール拡大時，測定精度が低下するという傾向があります。また，二つの光源はスペクトル幅が異なり，誤差要因(バックグラウンド信号)の補正を完全に行なうことは難しく，試料によっては大きな測定誤差が含まれる欠点がありました。

これらのバックグラウンド吸収を完全に補正し，測定精度を向上させるために偏光ゼーマン法が開発されました。

偏光ゼーマン法は，光源が一つで，それを偏光子により2つの異なった偏光特性を有する光束とし(ダブルビーム)，バックグラウンド信号の補正をします。従来のバックグラウンド補正用のD_2ランプを用いる必要がなく，そのためのやっかいな光軸合わせや光量合わせという作業が省略されます。また，同時にベースラインの変動(ドリフト等)を補正するダブルビーム測光法になりますので，精度の高い測定ができます。

日立では，この偏光ゼーマン法を応用した装置として既に180-60形，-70形および-80形を販売しておりますが，さらに，機能向上，低価格化をはかった汎用機種Z-6000形，Z-7000形を開発しました。Z-6000形はフレーム分析専用機であり，比較的試料量の多い分野に適しています。Z-7000形はグラファイトアトマイザ専用機で，試料量が少なく，より高感度分析が望まれる分野に適しています。

■ 主な特長

(1) 偏光ゼーマン法を採用しており，ベースラインの変動を抑えます。また，高精度のバックグラウンド補正ができます。

(2) 豊富な機能を持つマイコン内蔵データ処理装置(グラフィックCRT付)が演算および制御を行ないます。

i) 12インチの大形CRTを備えており，ワンタッチキーボードとの組合せで操作が簡単です。

ii) CRT上に各元素の標準測定条件がメモリされています。

iii) CRT上に原子吸収とバックグラウンド吸収がリアルタイムでグラフィック表示されます。

iv) 検量線用の標準試料点数が7点までセット可能であり，また検量線用関数が8種類用意されているので，最適な検量線を選択することができます。

v) 統計演算(平均値，標準偏差および相対標準偏差)などの演算機能を有しています。

vi) マイコンによりグラファイトアトマイザの温度プログラムを制御します。

各元素の標準温度プログラムがメモリされており，読み出すとただちに実行することができます(Z-7000形)。

vii) CRT上に現在進行中のステージ温度(設定温度)および吸収信号が同時にモニタでき，カウントダウンタイマにより，そのステージの残り時間が一目でわかります。

(3) データ処理組込みのグラフィックプリンタにより，任意の時にCRT画面のハードコピーが得られるとともに，記録計としても使用でき，アナログレコーダが不要となります。

U.D.C.681.785.423.42/.52.087.9:681.323-181.48

解　説

150-20形日立ダブルビーム分光光度計とその応用例

HITACHI Model 150-20 Double Beam Spectrophotometer and Its Apllications.

小森　律夫*　百目鬼　秀子*　皆川　定雄**　加地　弘典**　遠山　惠夫**　内野　興一*

（昭和58年7月29日受理）

1. はじめに

日立製作所では，およそ20年前に124形ダブルビーム分光光度計を開発して以来，200形，220A形，228形の各種普及型ダブルビーム分光光度計をシリーズ化し発売してきた。

吸光分析方法のなかで圧倒的に利用度の高いのは，紫外可視分光光度計（波長範囲190～900nm）である。近年の趨勢として，吸収スペクトルも記録できるダブルビーム形がシングルビーム形の需要に迫りつつあり，この傾向は今後一層顕在化する兆しがある。

このような時勢を踏まえて長年の実績をもとに，今回150-20形日立ダブルビーム分光光度計（以下，150-20形と略す）を製品化した。

近時，新素材開発など高度な研究内容に伴い品質管理やルーチン分析の分野でも測定値には高精度化，高い再現性，安定性など厳密さが求められる。このため，従来の高級機に匹敵する性能，機能が要請される場合が多い。150-20形は，取込んだデータの二次処理や分析条件の記憶など，CRT画面を主体に据えて，これらデータを加工，選択しグラフィックプリンタに描写する方式を主眼とした。

2. 装置の概要

図1に装置の機能系統図を示した。分光器には日立自製による収差補正凹面グレーテングを用いた瀬谷-波岡マウントで，低迷光かつ明るい光学系を採用した。このため迷光量は0.03%以下（220nm, NaI 10g/l）と普及形としては優れた値が得られている。検知器により電気信号に変換された光信号はプレアンプにより増幅後，直ちにA/D変換され，以降は全て制御ユニット内部の演算プログラムにより演算処理される。

この制御部は，特に分光光度計用に設計されたもので必要な項目ごとに明示し，操作性のよいタッチキー方式を採用した。また操作手順は対話方式としてある。

POWERスイッチをONにすると，まずイニシャライズを終了後，CRT画面上に測定項目選択画面（I画面と言う）が現われる。**図2**には，画面の種類について示した。その内最も多用するSPECTRUMについて**図3**に実例で示す。[I]画面で2をENTERするとSPECTRUM測定条件設定画面（O画面と言う）が現われる。各々の項目について希望の数値を入力して制御部のFWDキーを押しSTARTすれば[G]画面がCRT画面上に描画される。

なお，本例は過マンガン酸カリウム・クロム明ばん硝酸

150-20形　日立ダブルビーム分光光度計

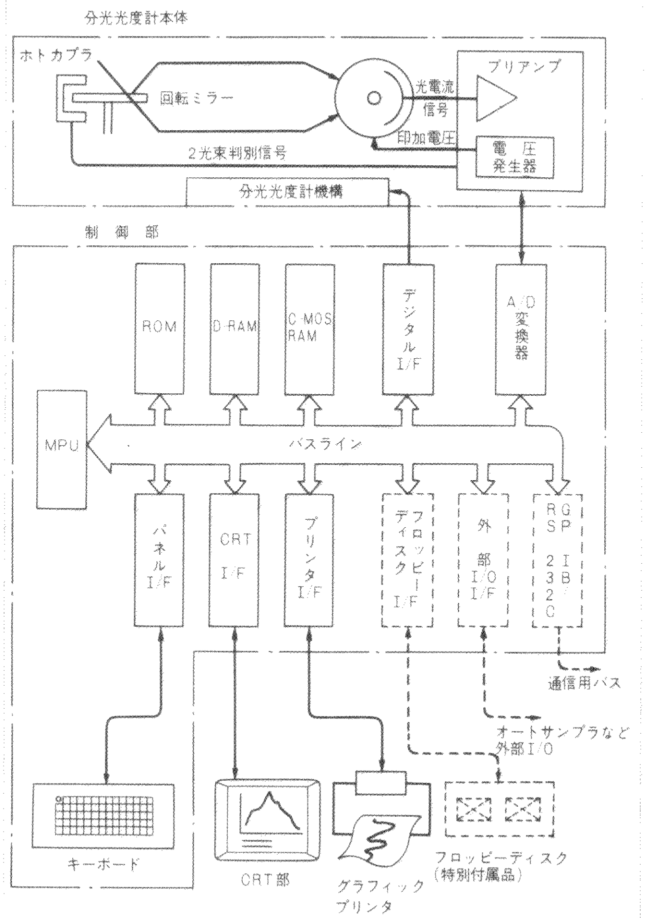


図1　150-20形の信号処理系統と制御系
Signal Processing System and Control System of Model 150-20.

*　日立製作所那珂工場　応用技術センタ
**日立製作所那珂工場　光学装置設計部

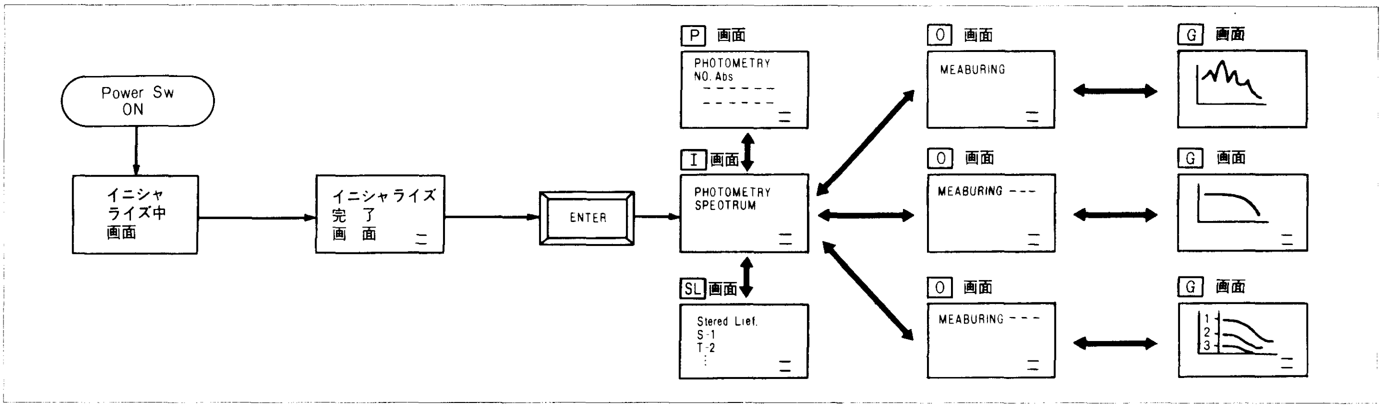


図2 画面の種類 Display Available.

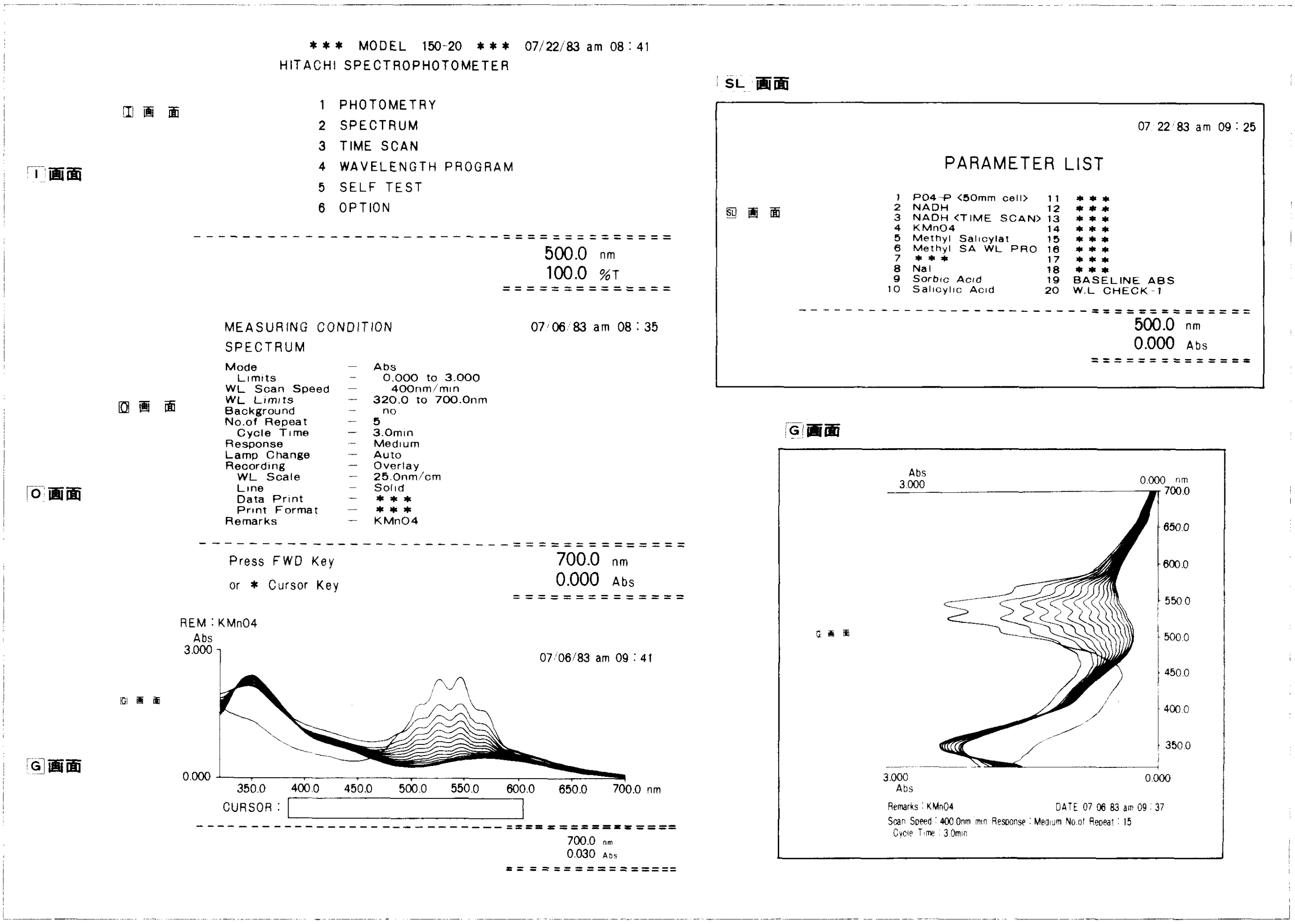


図3 画面の推移 Operation Procedure.

溶液を50℃に加温した場合の吸収曲線の変化を重ね書きの機能を使用して記録した例である。上段のG画面はCRT上で重ね書きした後，グラフィックプリンタ上にハードコピーしたものであり，下段の例はグラフィックプリンタに同時記録した例である。

既に分析条件が明らかな場合は，PARAMETER LIST画面（SL画面と言う）に記憶させておけば，[RECALL]キーを押すだけで，[I]→[SL]画面に転写され，測定しようとする分析条件にただちに設定される。本機能は，測定条件設定画面を20画面まで記憶保存できる。これによって，保存された条件設定画面はPOWERスイッチを切っても消滅しない。

日付入力をすることによって，それを表示及び印字できる。また，アナログ信号が得られるので従来の記録計と併用できる。

3. 測定例

(1) リン，サリチル酸による測定

リン酸イオンのモリブデン青法による吸収曲線をグラフィックプリンタに記録した例を**図4**に示した。リンは湖沼の富栄養化など環境化学の面から正確な定量が重要視されている物質で，その吸収ピークは880nmと長波長側にある。普及形の分光光度計としては，守備波長範囲ぎりぎりの位置にある。150-20形では吸光度2付近までは充分な直線性が得られており，0.02～0.60 ppmの広範囲にわたり測定が可能である。**図5**には検量線を示した。

また，**図6, 7**には紫外領域におけるサリチル酸塩酸溶液の吸収曲線と検量線を示す。波長300nmにおける濃度と吸光度の関係は，ほぼ吸光度3近くまで直線性を保持している。

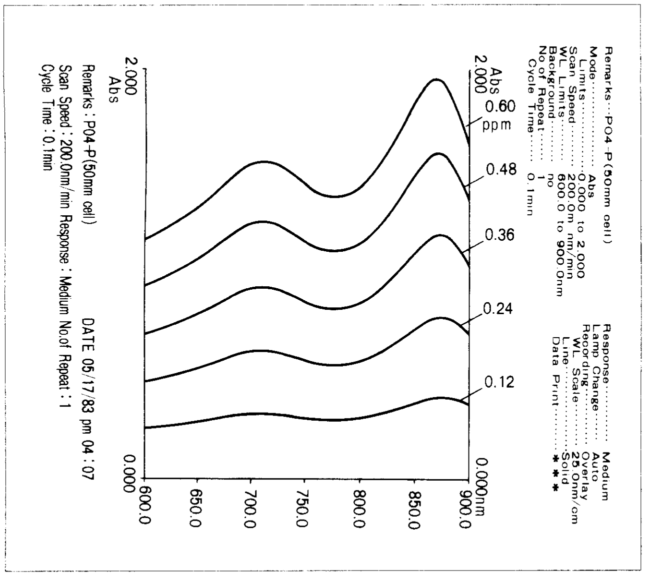


図4 各濃度におけるリンの吸収曲線(モリブデン青法)
Absorption Spectra ofPO_4-P
(Methord of Moribuden Blue)

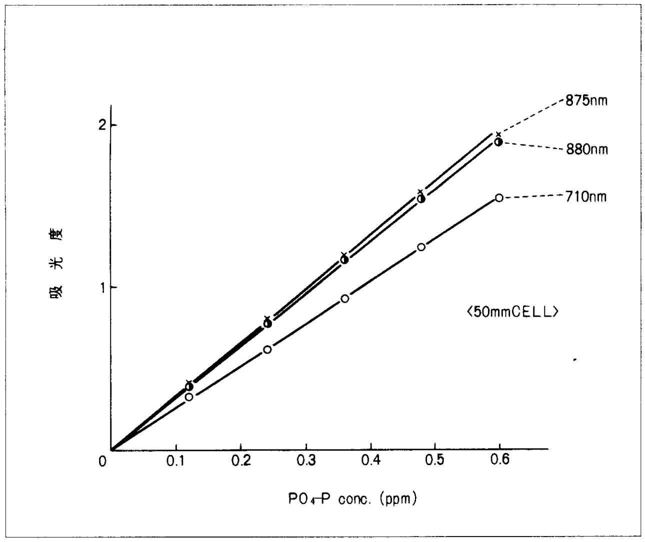


図5 リンの検量線
Working Curve of PO_4-P

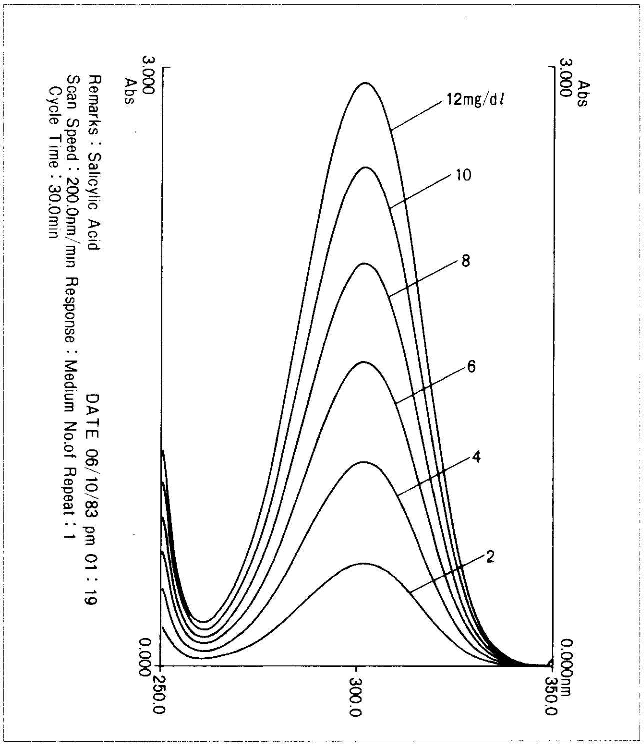


図6 各濃度におけるサリチル酸0.1N塩酸溶液の吸収曲線
Absorption Spectra of Salicylic Acid in 0.1N HCl aq.

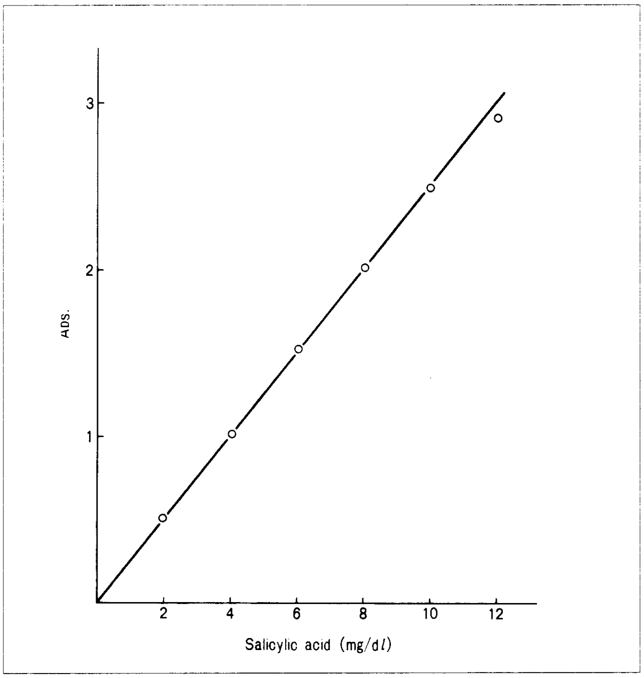


図7 サルチル酸0.1N塩酸溶液の検量線
Working Curve of Salicylic Acid.

(2) チトクロムC，アセトン遷移などの測定

日立独特のディファレンシャル フィードバック方式によって，マイナス吸光度への延長ができる。吸光度で－2から＋3までの広範囲にわたり測定でき，かつ測光スケールは任意の値で設定できる。**図8**にはウマ心筋チトクロムc

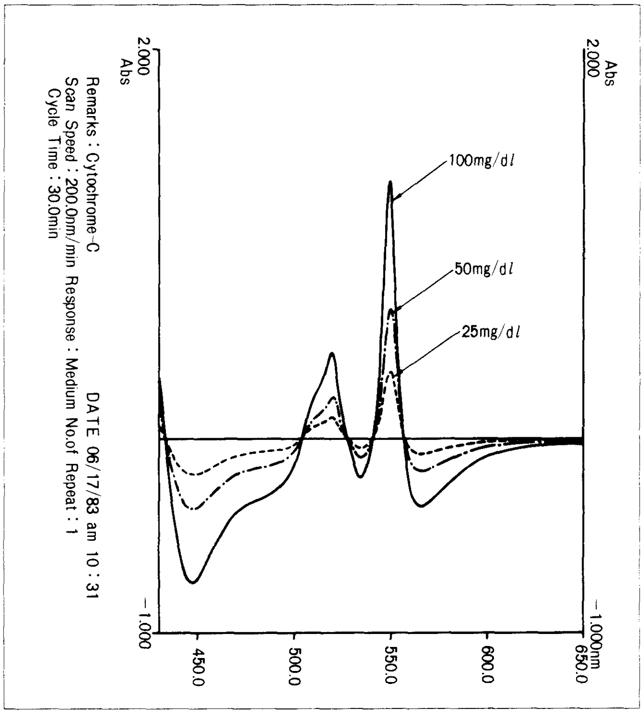


図8 ウマ心筋チトクロムcの酸化，還元型差スペクトル
Differential Spectra of Cytochrome-c

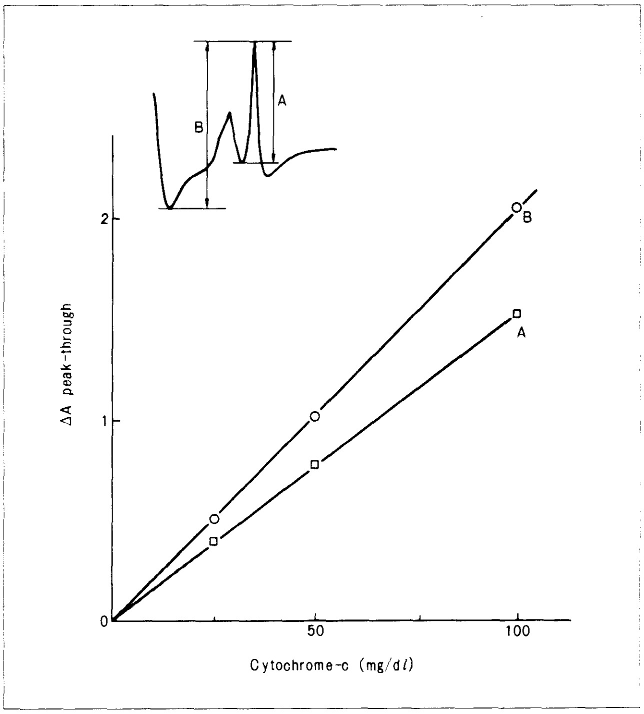


図9 検量線
Working curve of Cytochrome-c

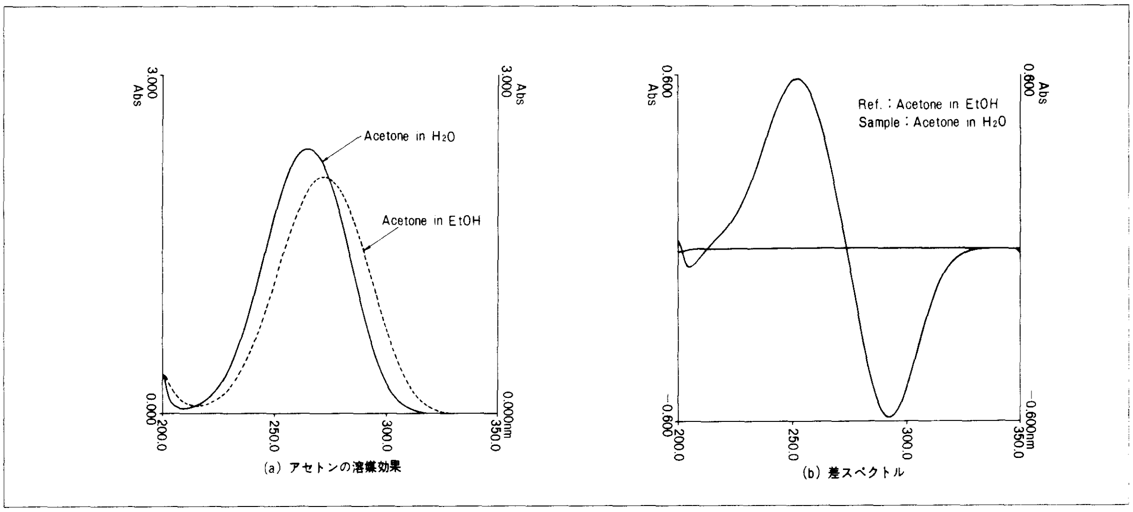


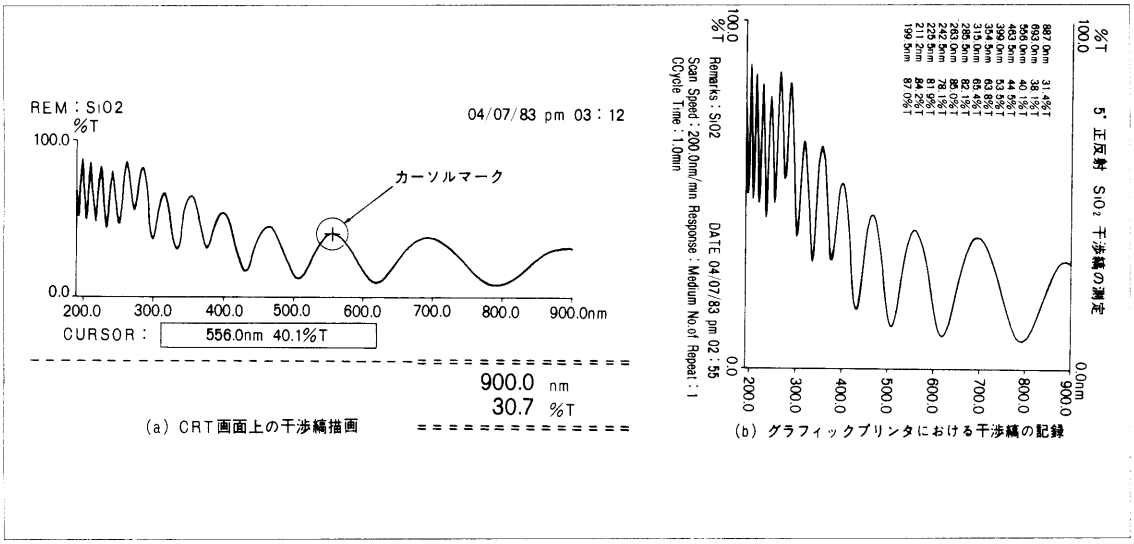
図10 アセトンの溶媒効果と差スペクトル（マイナス吸光度スケール）
Solvent effect and Differential Spectra of Acetone

の酸化，還元型差スペクトルを示す。標準側および試料側，両光路に酸化型をおきベースラインを補正，次に試料側にハイドロサルファイトを一尖刀加えて還元して差スペクトルを各濃度で測定した。**図9**には各濃度に対する波長**550nm**における吸収ピークと，波長**450nm**，**535nm**の吸収の谷の**ΔA peak-through**値の関係線を示す。吸収の谷は**100mg/dl**の濃度で−**0.8Abs.**に達しているが良い直線性が得られている。高濃度試料の差スペクトルの測定に威力を発揮する。

図10（a）および（b）に，それぞれアセトンの**n**→π^***遷移**による吸収曲線と差スペクトルを示した。これはタンデムセルホールダを使用した測定例である。点線記録は**EtOH**中のアセトン，実線はH_2O中のアセトンの吸収曲線で，溶媒効果による吸収帯のシフトがみられる。（b）の差スペクトル測定結果より一層明確である。

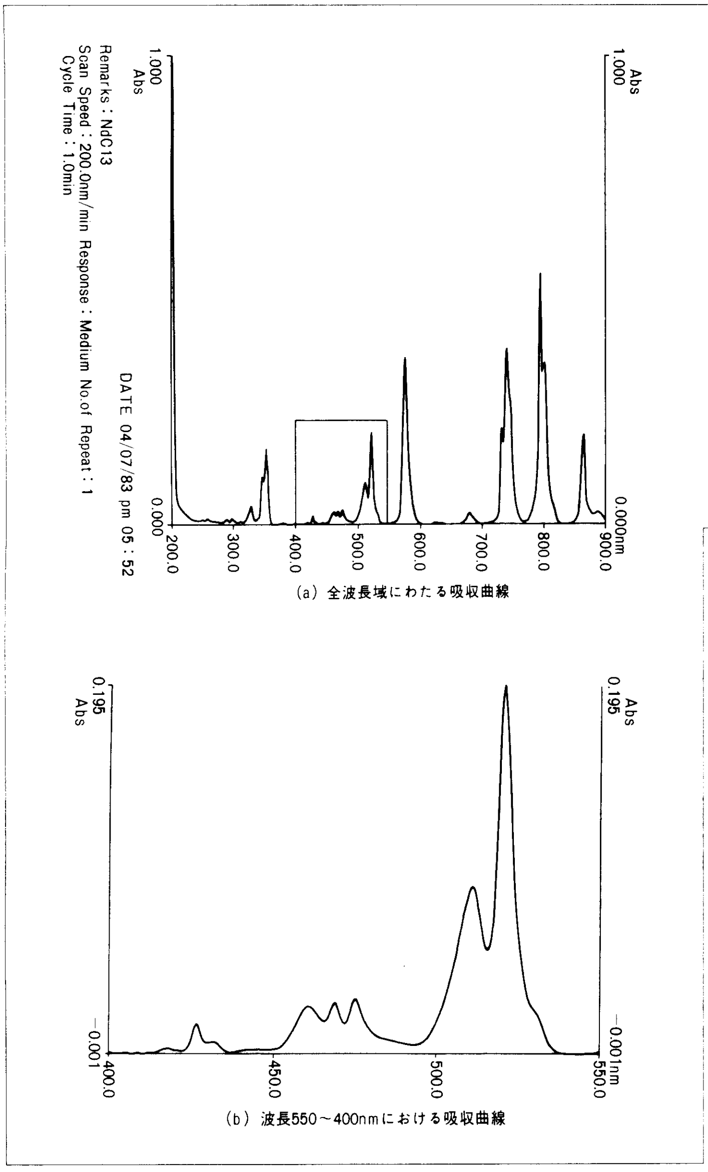
(3) カーソルマーク（十字形）の活用

CRT画面に十字形のカーソルマークを移動させて，プリントアウトや再生記録範囲を指定するなど，**CRT**画面上にはもちろんのこと，グラフィックプリンタに記録できる。**図11**(a)には，5°正反射測定**Acc.**を用いてSiO_2薄膜の干渉縞を記録した場合のハードコピーを示した。**556nm**に干渉縞のピークがありその反射率は**40.1%**を示していることがわかる。随時カーソルをピーク位置に移行し DATA キーを押せば**図11**の（b）に示すように印字できる。ピークの波長位置を正確に読み出すために有効である。また，カーソルマークを必要な波長間隔の間に移行させて，それぞれの波長で EXPAND キーを押すとただちに拡大された吸収曲

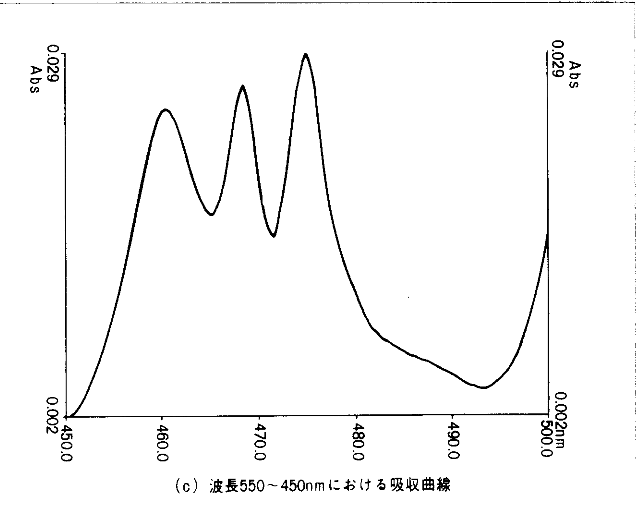


(a) CRT画面上の干渉縞描画　(b) グラフィックプリンタにおける干渉縞の記録

図11　SiO_2薄膜の干渉縞
Measurement of SiO_2 thin layer for interference fringe.



(a) 全波長域にわたる吸収曲線
(b) 波長550〜400nmにおける吸収曲線



(c) 波長550〜450nmにおける吸収曲線

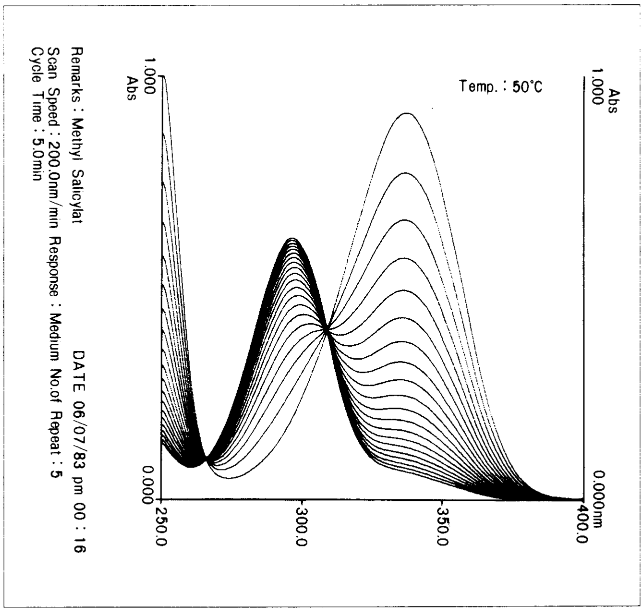


図12　塩化ネオジウム水溶液の吸収曲線
Absorption Spectra of Neodum chrolorid aq.

図13　サリチル酸メチル・EtOH溶液の加水分解
Hydrolysis of Methyl Salicylate EtOH.

線が得られる。この場合，その範囲における最大吸収ピークで縦軸方向がフルスケールとなる。**図12**には□印部を拡大，さらに⊂⊃印部を拡大した例を示す。

(4) 反応追跡測定例

図13には，サリチル酸メチル・EtOH溶液中に0.1NNaOHを添加した場合の加水分解反応のスペクトル変化を示した。

次にこのスペクトル変化に対し6点の波長を選び，各波長における反応追跡をした結果を**図14**に示した。これは本装置のWAVELENGTH PROGRAM機能を使用したものである。

この機能は設定された各波長ごとに順次繰返し測定を行いその同一波長の隣り合うデータ間を直線補間することによって各々の波長(最大6点)での時間変化を表示するものである。さらに6つの波長のなかから特に注目する1つの波長のみを選び出し，CRT画面上，あるいはグラフィックプリンタに記録することができる。その例を**図15**に示す。これは波長2：335nmのデータを選んだ例である。

また**図16**には過マンガン酸カリウム，クロム明ばん硝酸溶液の50°C液温下における所謂クロム反応を示した。

"**図3** 画面の推移"に示した吸収スペクトルの反応曲線で350nmには反応の進行にともない重クロム酸カリウムの生成する様子がよくわかる。この反応曲線から525nmに示さ

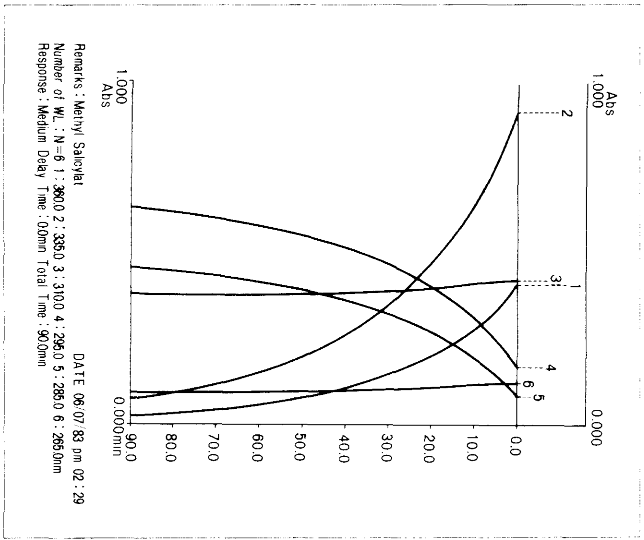


図14 選んだ6つの波長における吸光度の時間変化
Time Course of Methyl Salicylat on each 6 points wavelength.
1. 360nm 3. 310nm 5. 285nm
2. 335nm 4. 295nm 6. 265nm

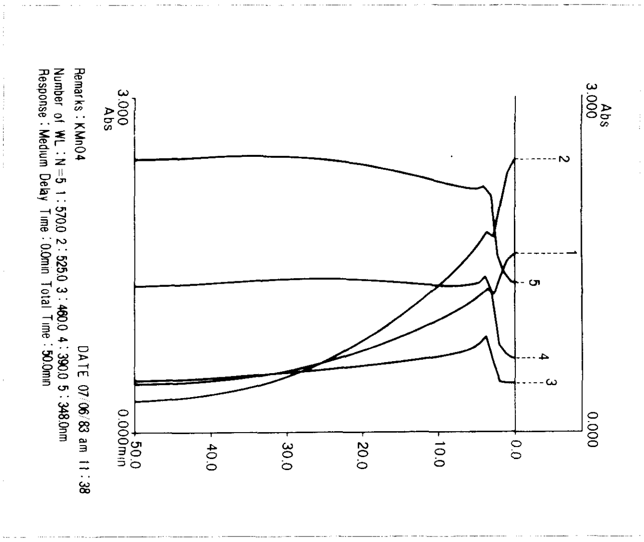


図16 過マンガン酸カリウム，クロム明ばん溶液の各波長における反応曲線
Time Course of $KMnO_4$ Borate crom aq. on each 6 points wavelength.
1. 570nm 3. 460nm 5. 348nm
2. 525nm 4. 390nm

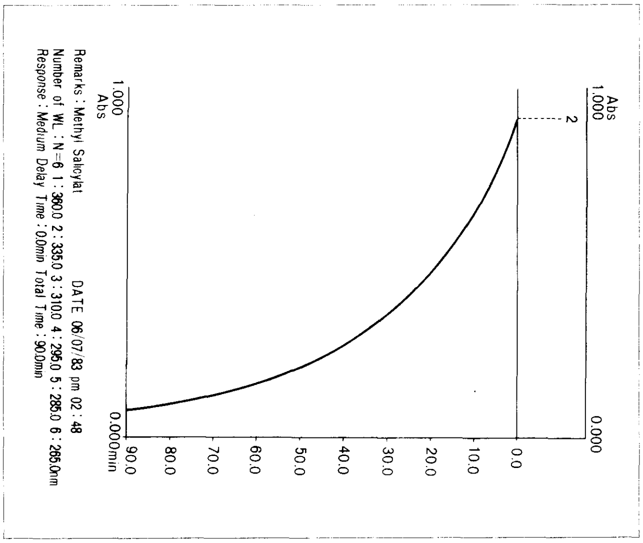


図15 335nmのみの抽出記録
Selected Time course of #2(335nm)

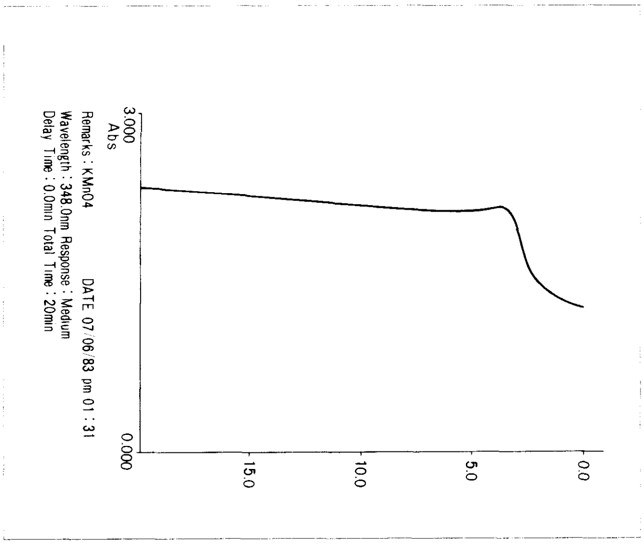


図17 348nmにおける吸光度の変化
Time course of $KMnO_4$ at348nm.

れる過マンガン酸カリウムと，348nmにおける重クロム酸カリウムは，反応開始後およそ3分間で急激にすすみ，かつ一旦戻るという特異な形態を示している。この部分を拡大再生記録したのが**図17**である（反応時間を20分間に限定し入力）。

このように一旦取り込んだデータは二次的に処理して再加工できるので便利である。

4. おわりに

以上，150-20形のおもな機能，性能について述べた。すでに好評を戴いている200形，228形などの流れを嗣ぐ本機は，今後，アクセサリーやフロッピーディスク，パーソナルコンピュータ併用など，CRT画面を中心とした構成で展開される。一層の活用幅を拡大強化する計画であり活躍が期待される。

Topics

昭和58年度 日本電子顕微鏡学会（学術講演会・展示会）

昭和58年度日本電子顕微鏡学会の主要行事として，第39回学術講演会が5月31日から6月2日の3日間にわたり，愛知県産業貿易会館（名古屋市）で開催された。学会長（丸勢進教授，名古屋大学工学部長）以下約2,000名の参加者があった。

学術講演会の方は，例年のように学術展示（パネル）発表（66件）と口頭発表（230件）の2種類があり，ほぼ昨年並みの盛況であった。内容は，理論・鏡体部門が55件と例年になく活況を呈し画像処理や高分解能技術に取り組む研究者の層が厚くなっていることがうかがわれ，一方，医学・生物部門は202件と多く，全体の約70%を占めている。電顕の最近の応用は，新材料分野に向けられているが，関連する論文数は26件とまだ少ない。その他，共通試料技術に関する論文が25件みられた。日立関係からの論文は中央研究所，那珂工場から（社外の方々との共同研究を含めて）合計24件と，例年をやや上回る数になっている。

一方，例年のように学術講演会と並行して開催される商業展示では，日立（H-800形200kVトータルシステムTEM，S-570形コンピュータ化SEM，S-510形小型SEM—いずれも新製品），日本電子，明石製作所，Zeiss等から電顕の展示があり，その他試料の前・後処理関係を扱う約20社の展示があった。我々日立グループでは展示会場内に，特に「進むナノテクノロジーへの挑戦」のメインタイトルのもとに，下表のような内容のサブテーマをもうけて，最近の中央研究所や，那珂工場応用技術センターにおける電顕応用の成果を具体的にパネル展示し，好評を頂いた。

日立展示テーマ 『進むナノテクノロジーへの挑戦』

サブテーマ	内　容	具体例
1．原子レベルに挑む	超高分解能	1)0.88Å像(格子像) H-800 2)セラミックス H-800
2．より自然な姿に挑む	クライオ技法	1)生物(東大：臼倉先生，赤堀) H-600 2)寒天(雪印) S-800
3．量子論に挑む	電子線ホログラフィー	1)磁区観察 2)AB効果 (中研) HU-12FG
4．nanoストラクチャに挑む	FE電子銃	1)SEM/STEM/MICRO. DIFF (阪大，珂) H-600FG
5．nanoアナリシスに挑む	電子線エネルギーアナライザ	1)EA(早大：市ノ川先生)(カラーマッピング) H-8020
6．VLSI観察に挑む	超低加速観察（半導体）	1)レジスト，etc. S-800 S-570
7．立体構造の解明に挑む	高加速観察（準超薄切片）	1．生物試料 (厚さ0.5～1.0μm) H-800

第44回分析化学討論会開催さる

本年度の分析化学討論会が長崎大学（歯学部，水産学部）において5/5～6/5の2日間に亘って開催された。全国から約500名が参加して217件の発表が行なわれた。分析技術的には液体クロマトが40件で最も多く，特にイオンクロマトが目立った。フローインジェクション法は19件あり，今回急増を見せた分析技術である。また，走査電顕や質量分析など電子装置を使用した研究もあり，研究手法が広範囲化されている。

発表件数の86%を大学・官公庁の研究者が占め，参加者のほとんどがユーザであるが本会は研究発表のみで付設の商業展示がない。このため，メーカにとっては学術的な成果発表を通して製品をPRする場であり，各社とも積極的な発表を行っていた。日立からは6件の発表があり，最も多かった。那珂工場からは原子吸光，およびフローインジェクション法に関して発表した。

昭和58年度　全国発明表彰「科学技術庁長官賞」を受賞

このたび，日立製作所那珂工場では，下記の４名が昭和58年度　全国発明表賞「科学技術庁長官賞」を「偏光ゼーマン原子吸光分光光度計の発明」に対しての功績により受賞し，去る６月２日（木），東京プリンスホテルにおいて常陸宮殿下の御臨席を仰ぎ晴れの表彰を受けました。

主任技師　大石公之助
主任技師　小泉　英明
副工場長　福田　健二
企 画 員　高橋健一郎

ご高承の通り全国発明表彰は，数多い技術賞の中でも特にレベルの高い大きな表彰で，今回の受賞は，「ゼーマン効果」と呼ばれる偏光吸光方式の導入により，真のダブルビーム測光を可能にした点が高く評価されたものです。

臨界プラズマ試験装置JT-60周辺プラズマ空間分解測定サブシステムを受注

日本原子力研究所殿では，磁気閉込め法の中でも最も保温性能の優れたトカマク方式の研究開発のため，その第一関門の「科学的実証試験」を目指して，臨界プラズマ試験装置JT-60を建設中です。

JT-60は，臨界プラズマ条件であるプラズマ温度約１億度，閉込め時間約１秒の達成を目指すもので，トロイダル磁場コイル，ポロイダル磁場コイル，中性粒子入射加熱装置，真空容器，並びにJT-60本体に直接付属する周辺装置として，加熱装置，計測装置等により構成されています。

日立製作所那珂工場では，この計測装置A-6-d，周辺プラズマ空間分解測定サブシステムの一部の製作を担当することになりました。

このシステムはJT-60の成功のために不可欠な重要な計測部分にあたり，プラズマからの導光部，紫外分光器，可視分光器からなります。那珂工場の光学技術がJT-60の成功のために貢献することが期待されます。

日製産業株式會社

本社別館　電話　東京(03) 504－7211	本郷出張所　電話　東京(03) 815－2051	横浜出張所　電話　横浜(045)671－5421
新潟出張所　電話　新潟(0252)41－3011〈代〉	大阪支店　電話　大阪(06) 366－2551	四国出張所　電話　高松(0878)62－3391〈代〉
京都出張所　電話　京都(075)241－1591	水戸営業所　電話　水戸(0292)27－2101	筑波営業所　電話　土浦(0298)23－7391
名古屋支店　電話　名古屋(052)583－5841	豊田出張所　電話　豊田(0565)28－5179	広島支店　電話　広島(082)221－4514〈代〉
岡山出張所　電話　倉敷(0864)25－1316	仙台支店　電話　仙台(0222)64－2211〈代〉	秋田出張所　電話　秋田(0188)64－2244
九州支店　電話　福岡(092)721－3501	沖縄出張所　電話　那覇(0988)78－1311～7	札幌支店　電話　札幌(011)221－7241〈代〉
富山支店　電話　富山(0764)24－3386〈代〉		

〈編集後記〉

■ 本号の報文では，東京医科大学の會沢先生に，自記分光光度計ほかの装置を用いて，HpD分子の励超エネルギーの転移を解析した例について報告して頂きました。

■ 本号の報文では，東京慈恵会医科大学の入山先生に，HPLC-ECDによる，CA等の生体成分の高感度な定性，定量分析法について報告して頂きました。

■ 本ニュースは，日立理化学機器をお買上げ頂いた方々には，全てお送りすることになっています。もし，貴殿のお近くに，受取っておられない方がありましたらご一報下さい。直ちに新規に名簿に登録し，以後継続的にお送り致します。

■ 日立理化学機器による報文のご投稿を歓迎致します。

■ 本ニュースに関するお問合せは，下記へ，または，日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

○株式会社　日立製作所　那珂工場　応用技術センタ
茨城県勝田市市毛882番地
〒312　電話　水戸(0292)73－2111(代)

○日製産業株式会社　企画開発部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル
〒105 電話 東京ダイヤルイン(03)504-7187

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
AUTUMN 1983 Vol.26 No.3

発　行　昭和58年10月１日(年４回発行)
発行人　鵜沼伸充
編集人　水谷　隆　岩井孝之
発行所　株式会社　日立製作所　計測器事業部
科学機器部
〒100　東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
電話　東京(03)214-3123(直通)
印刷所　日立印刷株式会社