

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

WINTER 1985
VOL.28 NO.4

U.D.C. 543.544.08482:535.379

● 目 次 ●

高速液体クロマトグラフィー特集

報 文

化学発光検出液体クロマトグラ
フィー……辻 章夫 前田昌子…1

核酸のHPLC ……………牧野圭祐…6

タンパク質の高速液体クロマトグ
ラフィー……………門屋利彦 陳 顕川 奥山典生…10カラムスイッチング法を利用する
全自動高速液体クロマトグラ
フィー……………高萩英邦…16

報 文

ゼーマンフレイムレス原子吸光光
度法による血中鉛の定量の実際
……………大原昭男
道辻広美 山口恭平 藤木幸雄…20酵母マイクロボディ複合結晶体を
構成する酵素分子の構造解析(II)
……………大隅正子…24

解 説

D-2000形日立クロマトデータ処
理装置……………
吉原桃八 関貴和夫 上武成吾…29

トピックス

S-900形日立走査電子顕微鏡 ……5
日本分析化学会第34年会開かる…32

高速液体クロマトグラフィー特集

報 文

化学発光検出高速液体クロマトグラフィー

HPLC with Chemiluminescence Detection

辻 章夫* 前田 昌子**

(昭和60年10月2日受理)

1. まえがき

バイオメデカル領域における最近の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の応用開発は目覚ましいものがある。

複雑なマトリックスである生体試料中の微量成分の分析法としてHPLCがより有効に利用されるためには、(1)検出方法の感度を向上し、(2)多数かつ大量に共存する他成分からの完全な分離ができることが必要である。種々のHPLCの検出方法のうちで、高感度で共存成分を検知せずに分析目的成分を選択的に検出するものは蛍光検出法、電気検出法および質量分析法であろう。蛍光法は原理的に励起光源の強度を強くするほど蛍光も強くなり、高感度化する。レーザーを光源とするレーザー蛍光検出器の開発が行われている。しかし実際には蛍光検出器の構造上、励起光の一部が蛍光の受光部に入射し、いわゆる迷光現象がおこる。光源のフラツキが蛍光の変動をひきおこし、検出器の感度を上げようとしてもSN比が大きくなる。また溶離液に用いられる溶媒中の不純物に基づく蛍光も強くなりSN比を増大させ、従って期待したほどの感度の向上が得られない。

最近、化学、生物発光に基づく分析法が吸光度法や蛍光法より高感度であることから、種々の生体成分の微量分析法に応用されている。化学、生物発光に基づく分析法は、(1)極めて高感度で H_2O_2 は $10^{-9}\text{mol./l.}^{-1}$ 、ATPは $10^{-15}\text{mol./l.}^{-1}$ 、NADHは $10^{-16}\text{mol./l.}^{-1}$ を検出でき、(2)定量範囲が幅広く、 $10^{-3}\sim 10^{-6}$ の幅で直線性がある。また、(3)反応の応答が極めて早く、(4)選択性、特異性に優れている、などの特徴を有している。さらにその検出器には光源部とモノクロメーター部を必要とせず、セル室と受光部のみでよいから構造が簡単で安価である。HPLCの検出部にも化学、生物発光反応を用いる方法の研究が行われている。本稿では我々の研究室で開発した化学発光HPLCについて述べる。

2. 化学発光反応の基礎^{1),2)}

化学発光反応の一般的過程を図1に示す。反応の第1段でエネルギーの高い中間

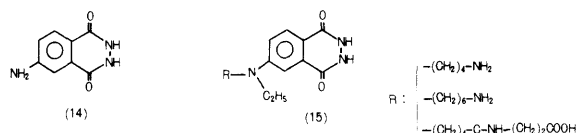
* 昭和大学薬学部 薬品分析化学教室 教授 薬博

** 昭和大学薬学部 薬品分析化学教室 助教授 薬博

2.3 Acylhydrazides

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) (12) のような acetylhydrazides はアルカリ性で適当な酸化剤と触媒の存在で強く発光する。量子収率は約1%で反応液のpHにより著しく変化する。中間体として diazoquinone および dioxetane を経る過程(a)と electron transfer の過程(b)とが提唱されている。発光は励起 aminophthalate イオン(13)に基づいている。

イソルミノール(14)はルミノールと同様に発光するが、特にそのN-アルキル誘導体(15)は、化学発光標識体として T_4 、ステロイド、蛋白質のラベル化剤として用いられ、化学発光イムノアッセイに用いられている。



我々の研究室ではイソルミノール誘導体を種々のアミン類、カルボン酸類、胆汁酸類にプレラベルして、HPLCにより分離後、アルカリ性フェリシアン化カリウム試液により発光検出するHPLC法を開発した(後述)。¹⁰⁾

3. 化学発光検出器

HPLC用の化学発光検出器は市販されていない。

蛍光光度計の光源を点灯せずフローセルと受光部のみを用いる。蛍光HPLC用フローセルはなるべく少容量のセルを用いているが、化学発光検出では持続する発光をできるだけ長く光電面に照射するようにしたほうが感度がよい。図4に種々のセルを示す。我々は単にHPLC用ポリスチレンチューブをガラス板に巻いたり、ポピンケースに巻きつけた物を用いている。より効率のよいセルを用いればより高感度になるであろう。

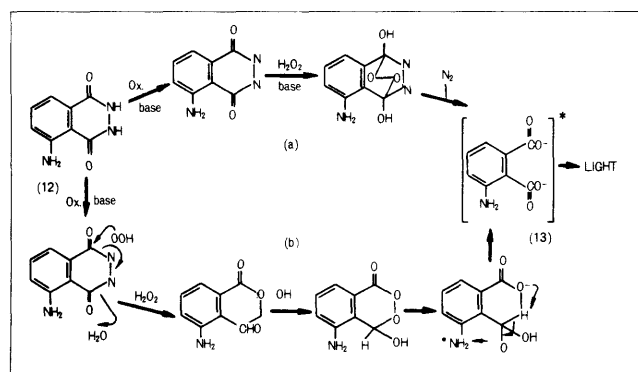


図3 ルミノールの化学発光機構

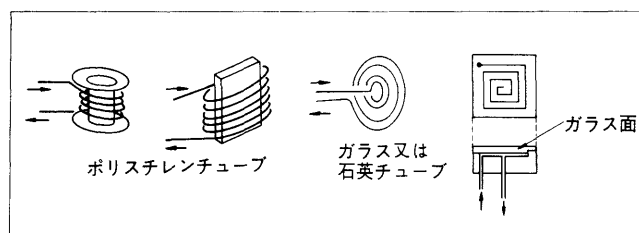


図4 化学発光HPLC用セル

4. ルシゲニン化学発光反応に基づく化学発光HPLC¹¹⁾

塩基性色素ルシゲニンはアルカリ性でアスコルビン酸やグルコースのような還元性の化合物と反応し、Dioxetane 中間体を経てN-メチルアクリドンになるときに発光することは1979年Veazyらにより報告されたが、著者らは還元糖を過ヨウ素酸ナトリウムと緩やかな条件下で酸化後、ルシゲニンと反応させるとその発光強度が増大することを見だし、更にグリセルアルデヒドやコルチゾールのようなステロイド類、およびフェナシルアルコールのように分子内に α -hydroxycarbonyl 基を有する化合物について検討したところ、これらの化合物がアルカリ性でルシゲニンとともに発光することを見いだした(図2)。今回はそれらの化合物のうちコルチゾール関連ステロイドおよびカルボン酸のフェナシルエステル類について、HPLCで分離後化学発光検出する方法について検討した。

(1) 流路構成

図5にルシゲニンをを用いる化学発光HPLCシステムを示す。装置は655形日立高速液体クロマトグラフを主体として、図に示したような構成を用いた。

(2) 分離条件と発光条件

分離系は逆相モードとし、メタノール/水=7:3をステロイドの分離では0.5ml/min、有機酸のp-ニトロフェナシルエステルは0.8ml/minの流速とした。発光試薬は0.001%ルシゲニン-0.1MKOH溶液で、0.7ml/minの流速で送液したとき最大の発光強度を示した。

(3) クロマトグラム

代表的クロマトグラムを図6, 7に示す。p-ニトロフェナシルプロミドによる有機酸のラベル化は、クラウンエーテルを触媒とする方法を用いた。最小検出量はステロイド類、有機酸のp-ニトロフェナシルエステル類共に0.5pmol.である。化学発光の検出感度は、種々の要因に支配される。特に検出器により著しく変化する。

5. ルミノール化学発光反応に基づく化学発光HPLC¹⁰⁾

我々はルミノールの化学発光に注目し、より量子効率の高いN-(4-aminobutyl)-N-ethyl isoluminol (ABEI) をカルボン酸およびアミン類のプレラベル化剤とし、HPLCで分離後アルカリ性で過酸化水素-フェリシアン化カリウム

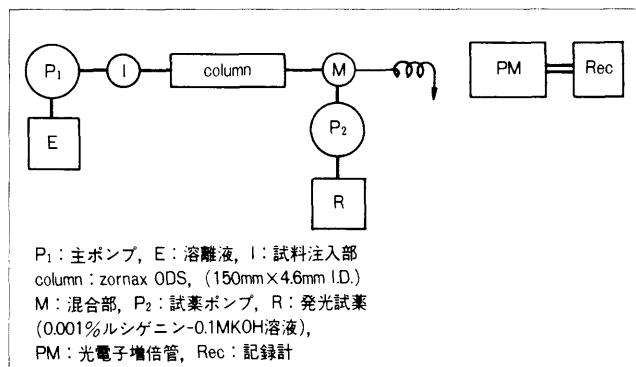
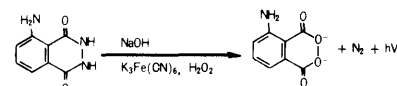


図5 ルシゲニンをを用いる化学発光HPLCの流路系

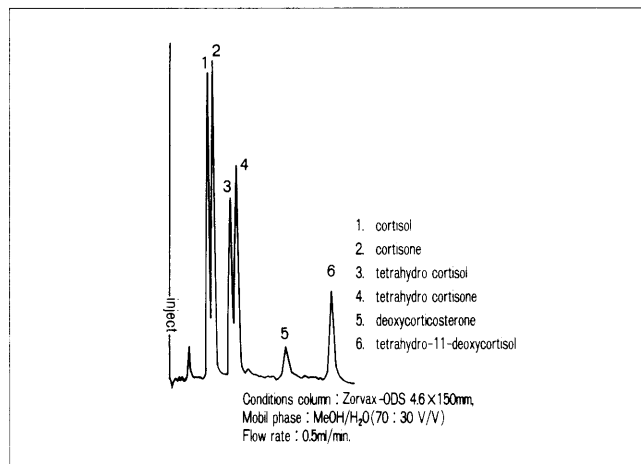


図6 コルチコステロイド類のクロマトグラム

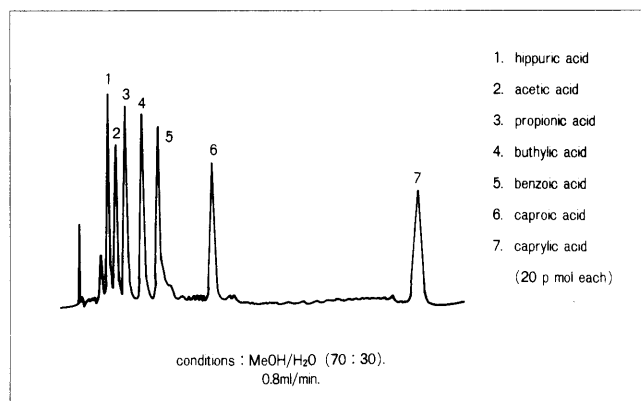


図7 カルボン酸のp-ニトロフェナシルエステルのクロマトグラム

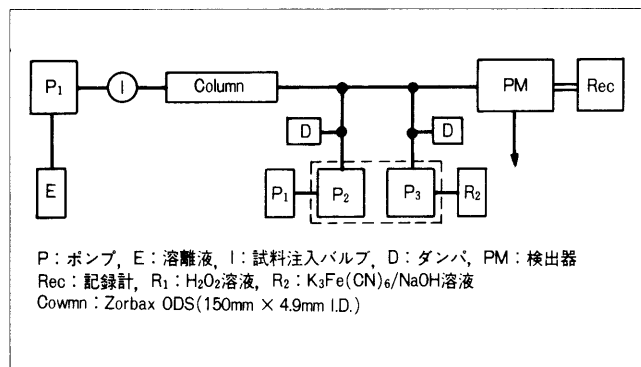


図8 ABEIをプレラベル化剤とする化学発光HPLCの流路系

で反応させ、発光検出する方法を検討した。

(1) 流路構成

化学発光HPLCシステムを図8のように設定した。分離系は逆相モードとし、溶出液にP₂からH₂O₂、P₃からK₃Fe(CN)₆のNaOH溶液を送液し反応させる。発光検出器はAMINCO社のCHEM-GLOW photometerに自製のフローセルを組み込んで用いた。

(2) ABEIの至適発光条件

ABEIの化学発光にはアルカリ性でoxidant baseとしてH₂O₂、触媒としてK₃Fe(CN)₆が必要である。P₁から90%

MeOHを1.5 ml・min⁻¹の流速で送液し、P₂からH₂O₂、P₃からK₃Fe(CN)₆/NaOH溶液を送液しそれぞれの至適条件を検討した。結果はP₂から0.3M H₂O₂、P₃から0.0125M K₃Fe(CN)₆/2.6N NaOHをそれぞれ2.2 ml・min⁻¹、3.9 ml・min⁻¹の流速で送液したとき最高の発光強度を示した。

(3) カルボン酸とABEIとの反応

図9に示すようにカルボン酸類は縮合剤に2-chloromethyl pyridinium iodide (CMPI)、プロトン捕捉剤に3.4-dihydro-2H-pyrido [1.2-a] pyrimidine-2-one (DPP) 存在下ABEIのアミノ基と反応し、アミド化合物を与える。反応はアセトニトリル中60°、2時間の条件が最適であった。試薬のABEIはカルボン酸の1.5倍量以上で一定の発光強度を示した。

(4) カルボン酸類のクロマトグラム

図10(A)に脂肪酸混合物の、同図(B)に遊離型胆汁酸混合物の相互分離のクロマトグラムを示した。脂肪酸は5分後に溶離液を40% MeOHから75% MeOHに変えることで約12分でC₂~C₁₀の脂肪酸の完全分離が得られた。胆汁酸の分離カラムにはRadial-Pak C₈、μBondapak Phenylなども検討したが、Resolveを用いたとき約9分で良好な分離が得られた。本システムでのcholic acidの検出限界は約20 fmolであり、他の検出系に比べ良好である。

(5) アミン類とABEIとの反応

図11に示すようにABEIは活性エステル化剤であるN,N'-disuccinimidyl carbonate (DSC)と反応し、活性カルバモイル誘導体を生成する。この活性カルバモイル誘導体は第1及び第2アミンと反応し、それぞれ対応する尿素化合物を与える。

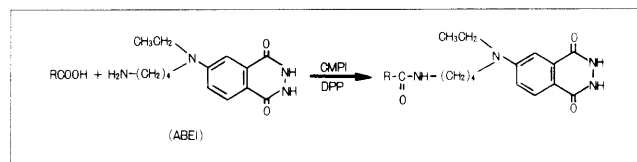


図9 ABEIによるカルボン酸のラベル化反応

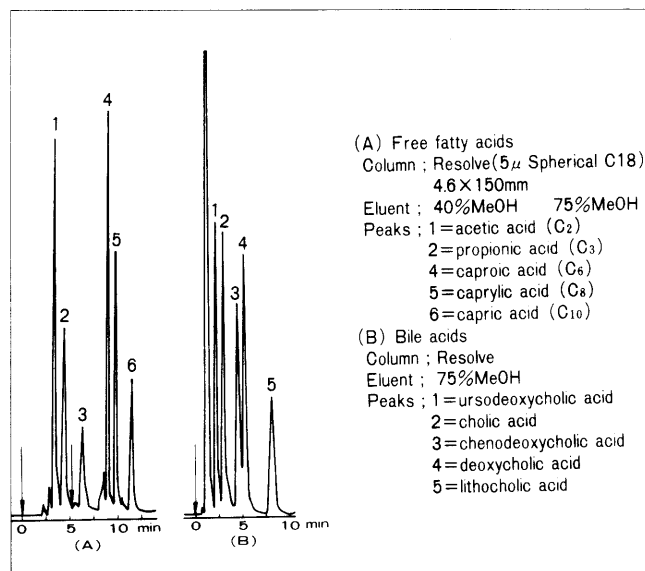


図10 カルボン酸類のクロマトグラム

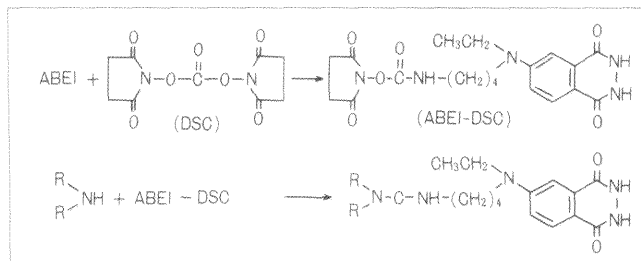


図11 ABEIによるアミン類のラベル化反応

(6) アミン類クロマトグラム

図12(A)にArylsubstituted amineを、同図(B)に芳香族アミン、同図(C)に脂肪族アミンの相互分離のクロマトグラムを示した。第3アミンであるN,N'-dimethyl anilineはこの条件ではABEIと反応せず検出は不可能であった。脂肪族アミンはC₂が溶出後に溶離液を40%MeOHから65%MeOHに変えることで約15分でC₁~C₈の直鎖脂肪族アミンの完全分離が得られた。

6. まとめ

化学発光法は、吸光度法や蛍光法に比べて高感度であるが、反応が極めて迅速であるため、発光試薬の混合器や検出器の構造により検出感度や再現性が著しく影響される。至適条件は各装置ごとに設定しなければならない。

本稿では、我々の研究室で開発しつつあるイソルミノール誘導体を、プレラベル化剤とするシステムおよびルシゲニンをポストラベル化剤とするシステムについて述べた。

両法ともにさらに改良し、生体成分の高感度HPLCとして応用することができる。現在開発検討中である。

参考文献

- 1) L. J. Kricka, T. J. N. Carter (eds): Clinical and Biochemical Luminescence, Mercel Deckker, Inc. (1982)

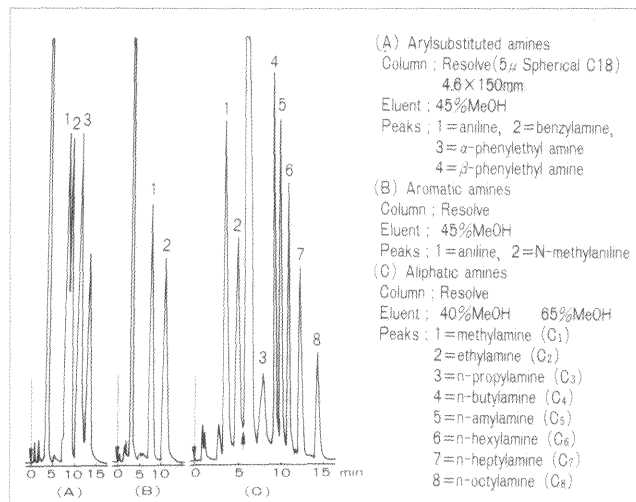


図12 アミン類のクロマトグラム

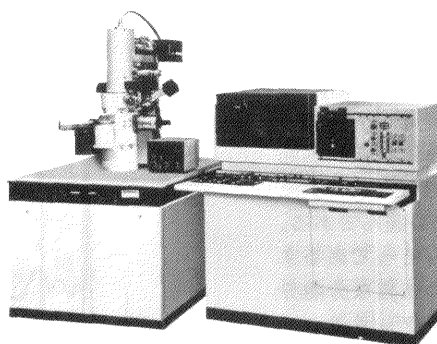
- 2) 今井 外：臨床化学, 9, 167~176 (1980)
- 3) M. Maeda, et al.: J. Pharmas. Dyn., 7, S-8 (1984)
- 4) 前田ほか：日本薬学会第104年会講演要旨集 p.557 (1984)
- 5) M. M. Rauhn et al.: J. Am Chem Soc., 89, 6515 (1967)
- 6) D. C. Williams, III, G. F. Huff and W. R. Seitz: Anal. Chem., 48, 1003 (1976)
- 7) D. C. Williams III, : Anal. Chem., 48, 1478 (1976)
- 8) S. Kobayashi, et al.: Anal. Chem., 52, 424 (1980)
- 9) S. Kobayashi, J. Sekine, K. Honda and K. Imai: Anal. Biochem., 112, 99 (1981)
- 10) T. Kawasaki, et al.: J. Chromatogr., 328, 121-126 (1985)
- 11) M. Maeda et al.: J. Chromatogr., In press.

Topics

S-900 日立走査電子顕微鏡

高輝度電界放射電子銃と最新の電子光学系の採用により、世界最高の分解能(0.8nm; 二次電子像)を実現したS-900形走査電子顕微鏡が完成しました。

この装置は、エレクトロニクス、材料科学、バイオテクノロジーなどの最先端科学における幅広い高度なニーズに応えるため、研究開発専用機として完成された超高分解能走査電子顕微鏡です。



S-900形 日立走査電子顕微鏡

■主な特長

(1) 超高分解能

世界最高の分解能(0.8nm; 二次電子像)を実現

(2) 低加速電圧における高分解能化

高加速電圧だけでなく、低加速電圧においても高分解能化を図りました。目的に合わせて容易に使い分けができます。

(3) 高精度・高感度分析機能

多様化する分析のニーズに応えられる軽元素X線分析器(UTW)等の同時装着が可能です。

■主な仕様

- (1) 分解能: 0.8nm(8Å); 二次電子像
- (2) 加速電圧: 1~30kV
- (3) 倍率: 150~×800,000
- (4) 試料寸法: 20×6×2.40mm最大
- (5) 排気系: ターボモレキュラーポンプ標準装備
- (6) オプション: 反射電子検出装置, EDX他

核酸のHPLC

HPLC for Nucleic Acids Analysis

牧野 圭祐*

(昭和60年10月21日受理)

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が、我が国に於て、新しい溶液系の分析機器として紹介されて以来、20年近くになる。以来、HPLCを用いた研究は活発に行われ、今日では傑出した分離分析・精製的手段としての評価を得るに至っている。特にHowardとMartin¹⁾によって逆相クロマトグラフィー(RPLC)が導入されて以来、取り扱うことのできる水系試料の数は莫大なものになり、HPLCは生化学試料を取り扱う上で必要不可欠の方法になった感じがする²⁾。現在では、排除(SEC)及びイオン交換(IE_xC)クロマトグラフィー用カラムについても格段の改良がなされ、更には疎水性相互作用を有効に生かした、生理活性物質の失活の少ないHydrophobic Interaction Chromatography (HPIC)用カラムも実用化されるようになり、HPLCは生化学を研究する者に対して益々多くの選択性を与え、高い分離効果を提供するようになった。

しかしながら、このように生化学に於けるHPLC分離分析全能の時代が到来しつつあるかのようにみえる現在でも、その適用を拒み続ける試料がある。その代表的なものとしては、この総説で紹介する核酸に関連する一連の試料があり、他にはタンパクに結合してその機能発現に密接に関係を有した糖鎖がある。これ等の試料は共に生命現象に対して極めて深い係り合いを有するものであるため、今後、HPLCを利用する研究者にとって、見過して通ることのできない大きなターゲットになるであろう。

核酸は言うまでもないことであるが、生命体の遺伝情報の担い手であり、この情報が一連の生体系のメカニズムによって種々の機能を有したタンパクに置き換えられ、こうして生命体の機能調節が行われる。近年、このメカニズムを巧妙に利用して種々の機能を持ったタンパクを人為的に生産し、生命維持に関した種々のメカニズムを解析したり、新しい医薬品の分野を築き上げようとする研究が活発である。一方、低分子量の核酸関連化合物も生命体の機能調節のメカニズムには欠かせない物質であり、これ等をモニターすることによって病態診断等に利用する研究も盛んである。

これらの研究を行う上で、いずれの場合もそうであるように、核酸あるいはその構成成分の迅速かつ正確な分離分析法が強く要求されている。しかしながら、ヌクレオチド、ヌクレオシド及び塩基等の構成成分に関しては有効な方法がほぼ確立されているものの、分子量の大きい試料に対しては未だゲル電気泳動法だけに依存しており、HPLCの応用に関しては「やっと研究の途についた」状態であるといっても過言ではあるまい。これは、高いイオン性と疎水

性を同時に持つこれらの試料の構造的特徴と、研究に供するための試料の調製の困難さに帰因するところが多い。

本総説では、これらの現状について、将来に対する展望を含めて紹介する。

2. ヌクレオチド、ヌクレオシド及び塩基

このカテゴリーに属する化合物は、核酸の加水分解生成物の塩基組成の決定のために、あるいは代謝の状態を調べるために分析の対象となる。特に代謝異常に関するクロマトグラフィーは病態診断の有力な方法として注目されており、組織、血液、尿などの生体液が試料となる³⁾。HPLC、特にRPLCに関する技術の向上は著しく、例えばODSカラムを用いた場合、メタノール濃度のグラジエント溶出下、ヌクレオチドの妨害なしに28種のヌクレオシド及び塩基の分離が可能であり³⁾、またヌクレオチドのみを分離の対象とすることもできる。更に、図1に例示したように、IE_xCもこれらの試料の有効な分離分析の方法である⁴⁾。勿論生体液は標準試料と比較できないほど複雑な組成から成るため、然るべき前処理が必要であるが、例えばt-RNA加水分解生成物中のヌクレオシドはホウ酸ゲルで前処理した後に逆相クロマトグラフィーで良好に分離できる⁵⁾。

3. 長鎖核酸関連化合物(RNA並びに一本鎖及び二本鎖DNA)

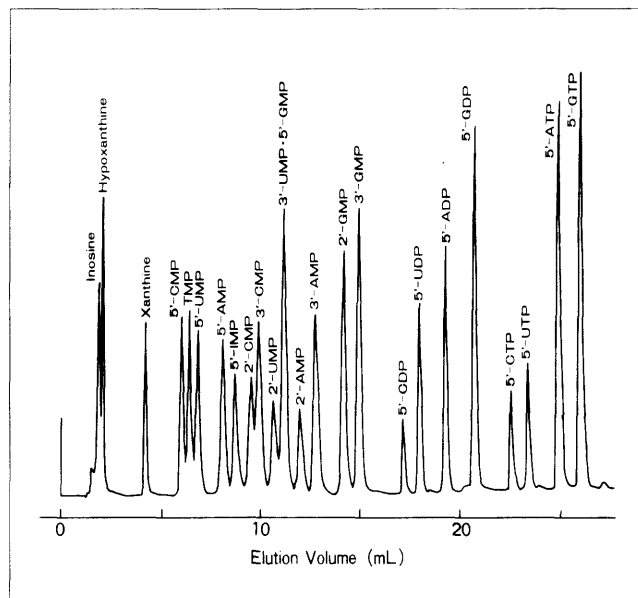


図1 ヌクレオチドの分離

条件：カラム、HITACHI GEL#3013-N；流速、0.5mL/min；温度、70°C；移動相、A) 4%CH₃CN in 0.06M NH₄Cl-0.01M KH₂PO₄-0.01M K₂HPO₄、B) 4%CH₃CN in 0.3M NH₄Cl-0.05M KH₂PO₄-0.05M K₂HPO₄；検出、260nm。

*京都工芸繊維大学繊維学部 助教授 理博

このカテゴリーに属する化合物を分離分析するために用いられたHPLCのモードは次の4種に大別される。(1) SEC, (2) IEXC, (3) RPC-5を用いたHPLC, (4) RPLC。これらのモードの中で、核酸関連化合物に対して最も有効なものはどれであるか、という質問に対して答えるのは、すべてのモードについて可能性が検討中であり、現時点では非常に難しい。よって以下に現状を紹介し、著者なりの将来に対する展望を示したい。

3.1 排除クロマトグラフィー (SEC)

この方法は、試料を分子量の異なりによって分離する、高分子量化合物の分離に適した方法として知られるが、一般に用いられるのと同様、核酸に対しても分子量の高いものをその対象とする。報文中で用いられたことのある試料は、制限酵素によって選択的に切断されたプラスミドベクター(二本鎖DNAフラグメント)、生命体から直接得られたRNA混合物等である^{6),7)}。

制限酵素は特異的塩基配列を認識し、その部位を特異的に切断するため、遺伝子操作に於ては欠くことのできない酵素である。組換えDNA実験におけるベクターとして最もよく用いられるpBR322は、4362塩基対を持つ環状DNAであるが、例えばこれをHaeIIIで切断した場合、7, 11, 18, 21, 51, 57, 64, 80, 89, 104, 123, 184, 192, 213, 234, 267, 434, 458, 504, 540, 587の塩基対を有する二本鎖DNAフラグメントが得られる。この試料を市販のSECカラムで一般的な溶離液を用いて測定した場合、各々のフラグメントに対して個々の分離したピークが得られており⁶⁾ (図2)、今後SECカラムの粒径等に対する改良が予測されるところから、非常に有効な方法になることが考えられる。今

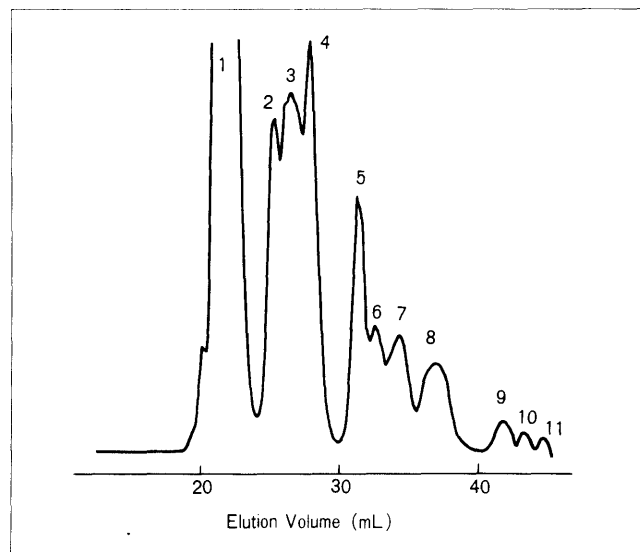


図2 pBR322のHaeIII分解物の分離例

条件：カラム、市販SECカラム；流速、1 mL/min；溶離液、0.1 M NaClと1 mMのEDTAを含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7) 温度、25°C；検出、260nm。

ピークは次の塩基対数のDNAフラグメントを含む。

- 1) 434-587 2) 267 3) 213, 234 4) 184, 192
5) 123, 124 6) 104, 7) 80, 89 8) 51, 57, 64
9) 18, 21 10) 11 11) 7

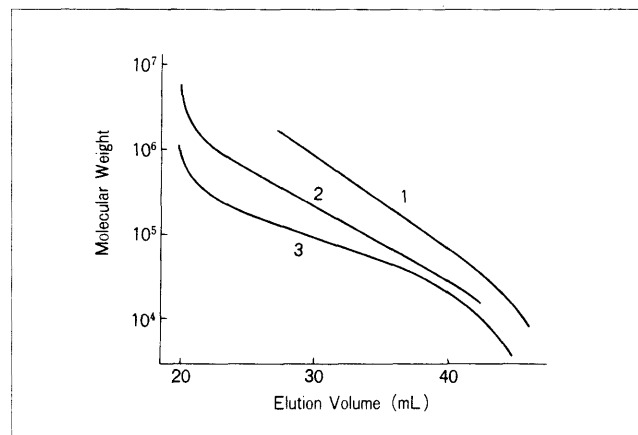


図3 DNA及びRNAのSEC検量線の一例

条件は図2と同じ。検量線：1) タンパク, 2) RNA, 3) DNA

後残された問題は、より高分子量の試料（例えば、10,000塩基対以上）に対するSECカラムの開発であろう。

一方、RNAに対しても優れたSECの応用例があり、人為的RNA混合物⁶⁾、生命体からの抽出物中のRNAの分析結果が報告されている。例えば、HeLa細胞から抽出したRNA混合物に対してSECを応用し、種々のRNAを分画した例や、植物抽出物中のviroid (低分子核酸病原体) の分画に成功を収めた例がある⁷⁾。

SECを用いる研究者にとって最も重要なデータの一つである分子量-溶出容量曲線についても報告がある⁶⁾。図3に例を示すが、検量線は他の化合物、例えばタンパク等に対するものとは異なる。

現代の遺伝子操作を用いた研究では、特異的なタンパクを生産する系（例えば、白血病患者に於けるT-セル表面のホルモンレセプター等）から、特異的なm-RNAを分離し、それからの逆転写でc-DNAを調製し、これを用いることによって系に検討を加える一連の方法が用いられるが、今後のSECの利用は、このようなm-RNAのRNAaseを含む系からの分離と、個々のm-RNAの分離を可能にする方向に進むものと考えられる。これは他のモードについても言えることであるが。

3.2 イオン交換クロマトグラフィー (IEXC)

IEXCは、核酸関連化合物にとって、最も使い易く最も分離効果の高い方法として認められてきたように思う。この方法は核酸のヌクレオシドユニットの糖部分の3', 5'位を結合するリン酸の陰イオンを利用しており、アニオン交換能を有するカラムを用いる。報文中でIEXCの分離の対象として用いられた試料は、ヌクレアーゼS1で非選択的に部分的加水分解を受けたpolyA^{8),9)}、t-RNA混合物⁶⁾、化学的に合成された一方鎖DNAフラグメント¹⁰⁾、pBR322のHaeIII分解で得られた二本鎖DNAフラグメント¹¹⁾等であり、SECの対象とする試料よりも小さい分子量のものが多い。これ等の研究はすべて、試料をリン酸基の数（あるいは塩基の数）の異なりによって分離することを目的として行われており、現在のところ二本鎖DNAを除いて50塩基までの分離が可能とされている⁸⁾。

IE_xC用カラムは、シリカを基材とするもの、ポリマーを基材とするもの、ポリエチレンイミンを化学的に結合したもの(PEIカラム)の3種に大別される。この中で、シリカを基材とするものはアミノアルキルシランが化学的に不安定であるため、分離後の試料の純度等を考慮して、ポリマー系へ移行しつつあるといえよう。図4に、ポリマー系IE_xCカラムを用いて得られた一本鎖DNAフラグメントの分離例をしめす¹⁰⁾。PEIカラムの場合も前二者に劣らない優れた分離効果を示し、例えば、部分的加水分解を受けたpolyAは50塩基を有したフラグメントまで良好に分離された⁸⁾。しかしながら、ポリマー系アニオン交換樹脂の質的向上が急速に進んでいる現状と、PEIという特殊な、しかもモノマーが発癌性を示すカラムを考えた場合、このカラムの将来性には多少の疑問が残る。

IE_xCを行う場合、有機溶媒を少量添加することは効果的であり、また塩濃度のグラジエント溶出が不可欠である。この場合、添加する量と得られる効果が、メーカーの異なるカラム間で大きく変動するため、条件の設定には慎重さを要する。また温度及びpHの効果も顕著である。更に、昇温は、試料中に相補鎖の存在する場合には不可欠なものである¹⁰⁾。

IE_xCでは、溶出位置が試料の塩基数に相関するが、すべての同一塩基数の試料を同一ピークに溶出させることは現在では難しい¹⁰⁾。もしこの条件を満たすカラムが将来得られるようになれば、比較的分子量の小さい試料に対して、例えばMaxam-Gilbert法で用いられる塩基の化学修飾及び分解反応等を利用することによって、塩基組成決定の有効な手段となりうるであろう。

3.3 RPC-5 によるHPLC¹²⁾

RPC-5というカラムについては、日頃HPLCを取り扱う機会の多い方でも余り御存知ないと思う。これは元来ガスクロマトグラフィー用に開発されたカラムであり、後に生化学の分野で核酸に対して良好な分離を与えることが見出された。RPC-5は、細孔を持ったフッ素系樹脂(Plascon CTFE)に水不溶性の四級アミン(Adogen 464)をコーティングして調製される。その分離機構については、イオン

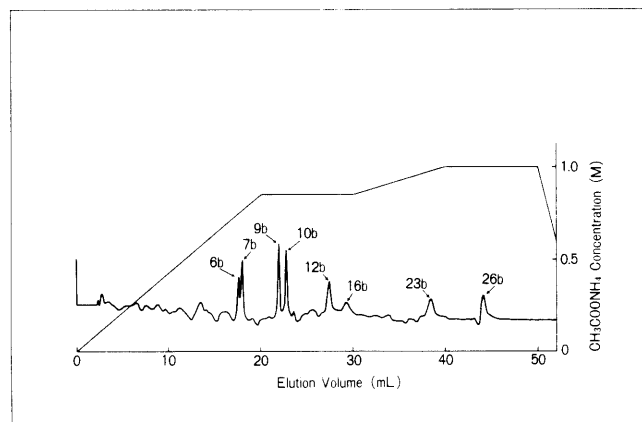


図4 一本鎖DNAフラグメントのIE_xCによる分離

条件：カラム、市販ポリマー系IE_xCカラム；流速、1.0mL/min；
溶離液、酢酸アンモニウム水溶液；温度、50℃；検出、260nm。

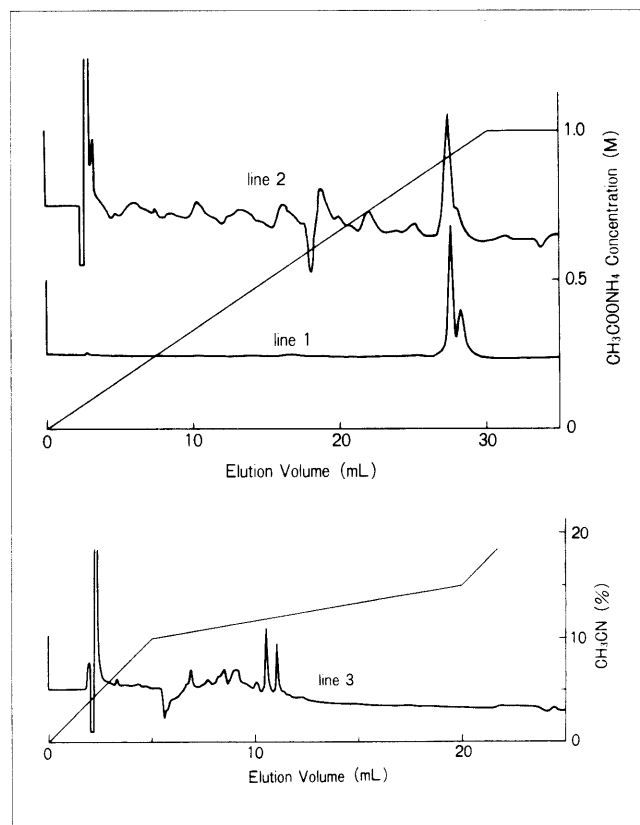


図5 IE_xC分離後の一本鎖DNAフラグメントのRPLCによる再分離
条件：(IE_xC)、図4と同様；(RPLC)、カラム、試作ODSカラム；
流速、0.5ml；溶離液、0.1M酢酸アンモニウムを含むCH₃CN水溶液；温度、室温；検出、260nm。
試料：dGGTTGTCCA (不純物を含む)
Line：1) 不純物を含む試料のIE_xCクロマトグラム
2) 1で分離したピークAのIE_xCクロマトグラム
3) 1で分離したピークAのRPLCクロマトグラム

交換と分配の混合モードであるという報告がある。但し、このカラムは現在市販されておらず、しかも透過性が悪いために低圧でさえも充填剤が破損するという欠点を持つので改良が試みられている。例えばNeosorb NDを基材としてAdogen464をコーティングしたカラムについての報告があり、polyAの部分的加水分解生成物の分離は良好であった¹³⁾。

しかしながらRPC-5は余りにも特殊なカラムであり、Adogen464をゲル表面にコーティングしただけの不安定なものであるため、実用化するとすれば相当の改良が要求されよう。但し、これを用いて得られた分離結果は、新しい核酸分離用カラムの開発に大きな影響を及ぼすものと期待される。

3.4 逆相クロマトグラフィー (RPLC)¹⁴⁾

RPLCは、生化学で最も頻繁に用いられるモードでありながら、核酸関連化合物に対しては研究例の少ないモードである。報文⁸⁾中でのべられているように、市販のODSカラムを用いた場合、10塩基を超える一本鎖DNAフラグメントに対しては幅の広いピークしか得られないために、それ以上の研究がなされなかったであろう。

著者等は、これまでに核酸分離に適したRPLCカラムの

探索を行ってきたが、最近良好な性質を有したカラムを得ることに成功したのでその応用例を示す。このカラムは特定のシリカを基材としており、結合したオクタデシル基の量を調節することによって得られた。カラムの性能は、一般的にODSカラムの特性を論じる際に問題となる残存シラノール基量には強い依存性を示さず、またゲル表面のチャージの影響も少なかった。

図5は、IE_xCで分離した試料を更にRPLCで分離した例であり、RPLCが、良好なカラムさえ用いれば、極めて有効な核酸分離用の方法となりうることを示すものである。また図6には、非常に類似した試料をこのカラムで分離した例を示した。同図からRPLCでは、他のモードでは不可能な、一塩基の異なりが識別できることが分かる。更に図7には、分子量の高い一本鎖DNAフラグメントを試料とした場合でも、このカラムではピーク幅の広がりがないことを示した。

以上例示したように、RPLCを用いることによって、他のモードでは得られない高い分離能の得られることが分かった。この研究は現在進行中のものであり、より効果の高い

カラムも見い出されつつある。将来、一本鎖のみならず二本鎖、あるいはRNAに対する分離条件の開発も手がけるつもりである。またRPLCに関連した新しいHPLCであるHPICの応用もこれからの課題であろう¹⁵⁾し、IE_xCに代るイオン対法の導入も期待の持てる方法である。

4. おわりに

核酸に関連した比較的高分子量の高い化合物の分離分析にRPLCが効果的であることが見出された。核酸に関しては現象論的研究が急速に展開され、種々の興味ある生命現象に関連した事実が解き明かされつつある。これからは、核酸に関する機構論的研究が極めて重要になってくるであろう。そうしてこそ、生命現象のより深い理解が可能になるからである。この中でHPLCによる迅速かつ高い精度での多量の試料の調製が極めて重要な意味を持つ。開発中のRPLCをSEC及びIE_xCによる分離と組み合わせることによって、この目的が達成できればと願う次第である。

参考文献

- 1) G. A. Howard and A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **46**, 532, 1950.
- 2) 「高速液体クロマトグラフィー」A. M. Krstulović and P. R. Brown著、波多野博行、牧野圭祐、中野勝之訳 東京化学同人、1985年.
- 3) R. A. Hartwick, S. P. Assenza and P. R. Brown, *J. Chromatogr.*, **186**, 647, 1979.
- 4) Hitachi Technical Data, シートNo. 59, 特集6 核酸, p. 5.
- 5) G. E. Davis, C. W. Gehrke, K. C. Kuo and P. F. Agris, *J. Chromatogr.*, **179**, 281, 1979.
- 6) Y. Kato, M. Sasaki and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, **266**, 341, 1983.
- 7) L. Graeve, J. Kruppa and P. Földi, *J. Chromatogr.*, **268**, 506, 1983.
- 8) R. R. Drager and F. E. Regnier, *Anal. Biochem.*, **145**, 47, 1985.
- 9) A. N. Wulfson and S. A. Yakimov, *HRC*, **7**, 442, 1984.
- 10) H. Ozaki, H. Wada, T. Takeuchi, K. Makino, T. Fukui and U. Kato, *J. Chromatogr.*, **332**, 243, 1985.
- 11) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, S. Fukushima and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, **265**, 342, 1983.
- 12) A. D. Kelmers, H. O. Weeren, J. F. Weiss, R. P. Pearson, M. P. Stulberg and G. D. Novelli, *Methods Enzymol.*, **1971**, PartC, 9.
- 13) H. Sawai, *Nucleic Acid Research, Symposium Series*, No.15, 105, 1984.
- 14) K. Makino, H. Ozaki, H. Wada, T. Takeuchi, M. Ikehara, T. Fukui, H. Sasaki and Y. Kato, *Nucleic Acid Research, Symposium Series*, in press.
- 15) Y. Kato, T. Kitayama and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, **292**, 418, 1984.

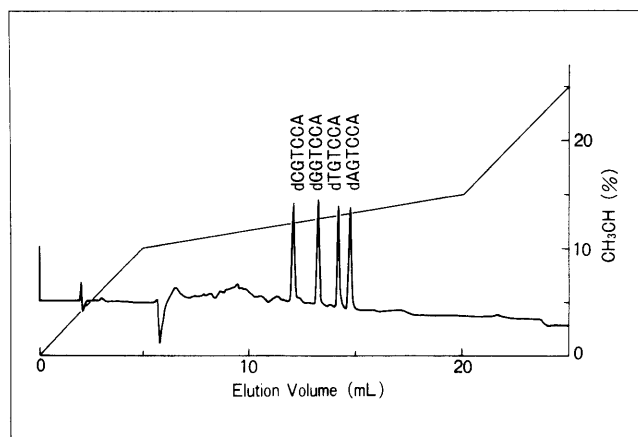


図6 dXGTCCAのRPLCによる分離
条件は図5のRPLCに対するものと同様

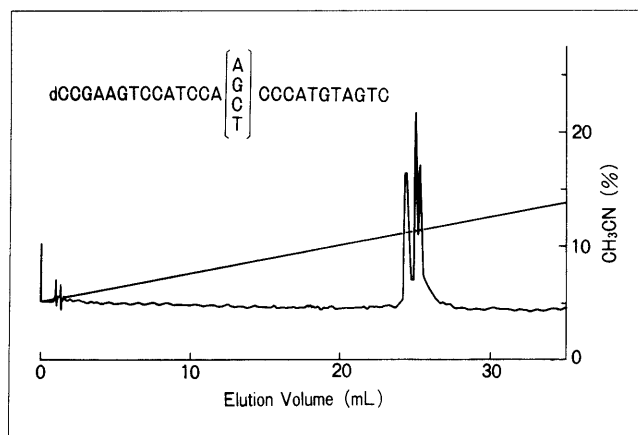


図7 dCCGAAGTCCATCCAXCCCATGTAGTC (X=A, G, C, T)のRPLCによる分離
条件は図5のRPLCに対するものと同様

タンパク質の高速液体クロマトグラフィー

HPLC for Protein Analysis

門屋 利彦* 陳 顕川* 奥山 典生*

(昭和60年10月30日受理)

1. はじめに

タンパク質のクロマトグラフィーを行なう上で、考慮しなければならないことのひとつは、タンパク質の構造についてである。すなわち、クロマトグラフィーの溶離条件がタンパク質の高次構造に及ぼす影響について考えなければならない。タンパク質には、図1に示したように1次構造から4次構造までのいろいろの準位の構造を持っている。タンパク質が酵素作用のような生理作用を示すためには、高次構造を保持していることが必要である。高次構造が破壊されるとともに生理作用を失い、このような状況をタンパク質の変性と呼び、高次構造を保持しない場合にはポリペプチドと呼んで区別している。図1に示したような高次構造を保持するための親和力は、また、クロマトグラフィーの分離に利用される親和力でもある。したがって、固定相物質からタンパク質を溶離するという操作は、同時にタンパク質の高次構造を破壊する可能性を意味している。そこで、タンパク質の高次構造を保持したままでの分離には、できるだけ温和な条件で行なわれる必要があり、水系のクロマトグラフィーが用いられることになる。

さて、現在、HPLC用充てん剤には、大別するとシリカゲ

ル系と有機系ポーラスポリマー系がある。シリカゲル系の充てん剤は、一般的に理論段数の点で優れていることが特徴であるが、一方でカラムの耐久性、試料容量が小さく、またアルカリ条件下で使用できないなどの実用面での問題点もある。これに対し、ポーラスポリマー系の充てん剤は試料容量が大きく、耐久性に優れ、アルカリ条件下でも使用でき、アルカリ洗浄による再活性化も可能である。しかし、シリカゲル系でもポーラスポリマー系であっても、その結合官能基による基本的分離様式は同様である。そこで、各種の非常に強く結合する不純物を含む試料の分離という点からみるとポーラスポリマー系のほうが利用しやすく実用的である。

2. 水系イオン交換クロマトグラフィー

水溶液を溶離系とする、従来の古典的な低圧クロマトグラフィーと同様の官能基を導入したイオン交換HPLC用の充てん剤が開発され^{1)~3)}、広く用いられるようになってきた。これらの水系イオン交換HPLCの発達によって、図2および図3に示したように各種のタンパク質を、高次構造を保持したまま、すなわち生理機能を保持したまま、

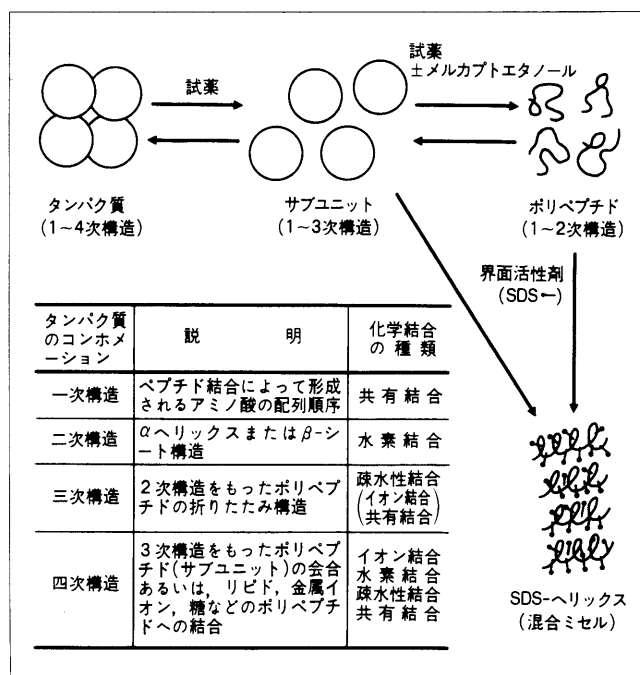


図1 タンパク質とポリペプチド

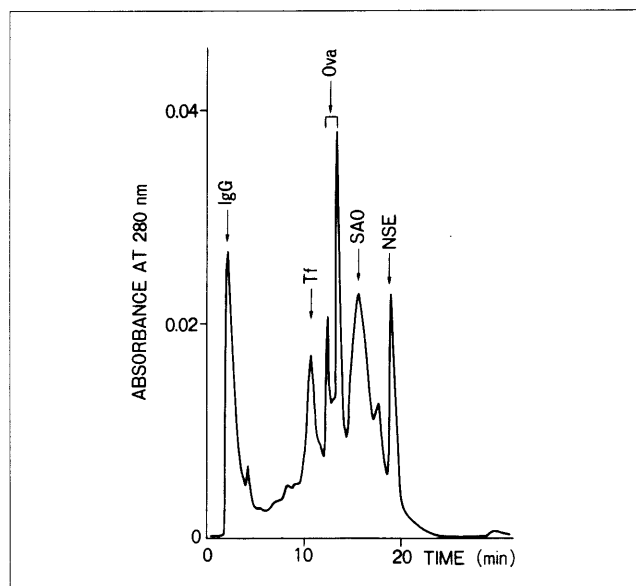


図2 タンパク質のイオン交換HPLC

IgG: ヒト免疫グロブリンG, Tf: ヒトトランスフェリン, Ova: 卵白アルブミン, SAO: ウシ血清アミン酸化酵素, NSE: ウシ脳神経特異エノラーゼ

カラム: TSK-gel DEAE-SPW (0.78cm I.D. × 7.5cm)

溶離: 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)

0~0.4M NaCl 直線濃度勾配法

流速: 1.0 ml/min

*東京都立大学 理学部化学科 生物化学研究室

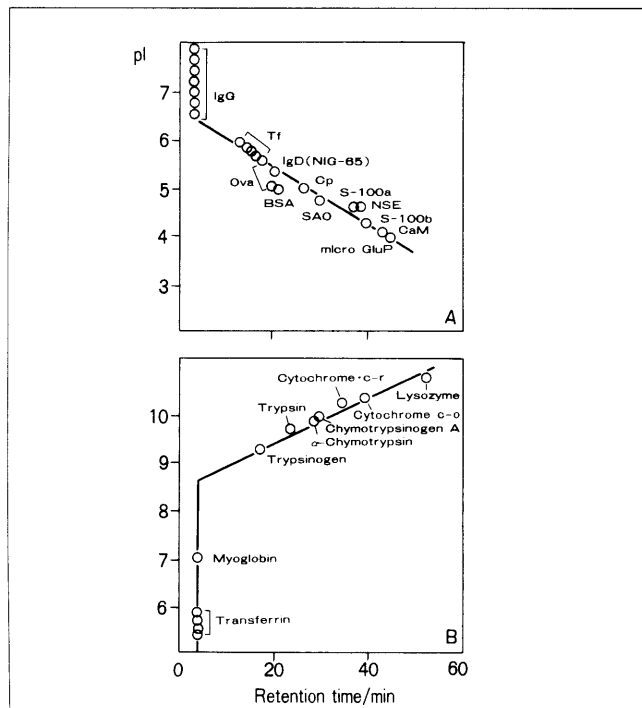


図3 タンパク質の等電点とTSK-gel DEAE-5PW(A)及びSP-5PW(B)からの溶離時間との関係

- A. カラム：TSK-gel DEAE-5PW (0.78cm I. D.×7.5cm)
 溶 離：0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)
 0～0.4M NaCl直線濃度勾配法
 流 速：1.0 ml/min
- B. カラム：TSK-gel SP-5PW (0.78cm I. D.×7.5cm)
 溶 離：0.02M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)
 0～0.4M NaCl直線濃度勾配法
 流 速：1.0 ml/min

その荷電にもとづいて短時間で、しかも微量試料で分離することが可能となった^{4),5)}。図3に、タンパク質の保持時間と等電点の関係を示したが、実際には、等電点よりも、そのpHにおける電荷であるべきである。しかし、利用するには、等電点の文献値が容易であるためにここにとりあげて示した。

$$t_R = a + b (pI)$$

また、このポーラスポリマーを担体とするイオン交換体は、従来のセファデックス系などの軟質のイオン交換体と、溶離に要する時間は全く異なるが、非常によく似た溶離曲線を示すので、大量精製のための大規模クロマトグラフィー系を考えるうえで、非常に有用となる。

水に可溶性のタンパク質については、図2および図3に示したような溶離条件によって、ほとんど全ての場合にクロマトグラフィーが可能である。一方、繊維性のタンパク質や膜タンパク質などの不溶性のタンパク質の場合には、尿素や界面活性剤を用いて可溶化される。そこで、これらのタンパク質の分離精製には、溶剤存在下でのイオン交換クロマトグラフィーが必要となってくる。

図4は、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いてイオン交換HPLCでの尿素の影響をみたものである。および、尿素非存在下、尿素濃度2 M、4 M、6 M存在下で塩化ナトリウ

ム直線濃度勾配法によってBSAの溶離を行なった。尿素濃度が高くなるほどタンパク質の保持時間は小さくなる傾向がみられた。また、6 M尿素存在下では、ピーク幅が非常に広がっている。これらの傾向は、従来の軟質のイオン交換樹脂DEAE-セファデックスA-50を用いて検討を行なった場合も同様であった⁶⁾。これは、尿素3～4 M付近までは、タンパク質は大きなコンホメーション変化を受けていないが、6 M尿素中ではタンパク質が大きく変性していると考えられる。図5は、ウシ脳の不溶性タンパク質画分より2 M尿素によって抽出される繊維性のタンパク質画分

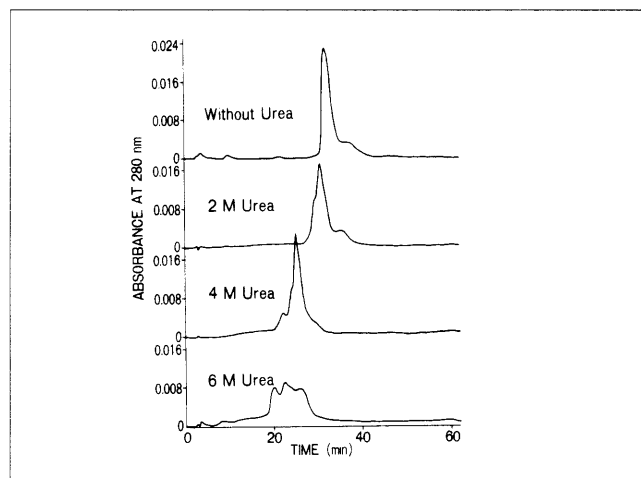


図4 タンパク質のイオン交換HPLCにおける尿素の影響

試 料：ウシ血清アルブミン
 カラム：TSK-gel DEAE-5PW (0.78cm I. D.×7.5cm)
 溶 離：0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)
 0～0.4M NaCl直線濃度勾配法
 (尿素0, 2, 4, 6 M存在下)
 流 速：1.0 ml/min

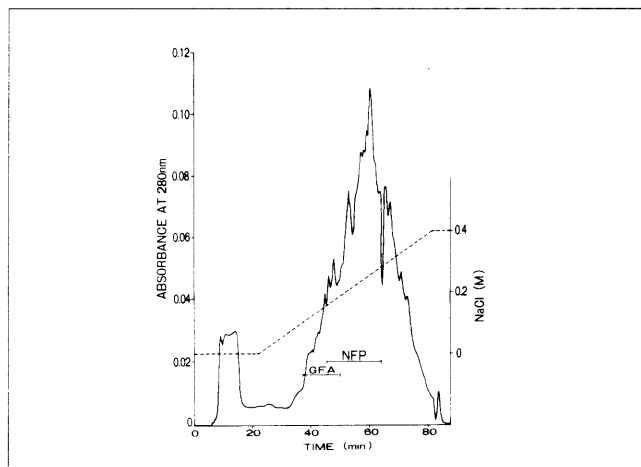


図5 ウシ脳の繊維性タンパク質画分の2 M尿素存在下でのイオン交換HPLC

カラム：TSK-gel DEAE-5PWs(0.78cm I. D.×7.5cm)
 溶 離：0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5), 2 M 尿素中
 0～0.4M NaCl直線濃度勾配法
 流 速：1.0 ml/min

の、2 M尿素存在下でのイオン交換HPLCの溶離図である。以上のような条件によって、脳中に存在する膠細胞繊維性酸性タンパク質 (GFA) や神経細胞繊維性タンパク質 (NFP) などの繊維性タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーが可能であった。

膜タンパク質は、一般に界面活性剤を用いて抽出される。このようなタンパク質のイオン交換クロマトグラフィーは、非イオン性の界面活性剤存在下で行なうことができる⁷⁾。この場合には、タンパク質の検出波長に吸収をもたない界面活性剤を選択しなければならない。

3. 疎水性クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィー

疎水性クロマトグラフィーとは、次のように説明される。親水性の合成あるいは天然の高分子性のGPC用の充てん剤に疎水性の官能基 (たとえば, phenyl, alkylなど) を導入した充てん剤を用い、移動相に高濃度の塩の溶液を用いたとき、タンパク質の移動相での溶解度は低下し、固定相への吸着が増加する。そこで移動相の塩濃度を次第に低下させたとき、一旦吸着されたタンパク質は徐々に溶離してくる。図6に示したのは、GPC用充てん剤TSK-gel 5000 PWに少量のphenyl基を導入したPhenyl-5PWカラムを用いた数種のタンパク質の溶離例である。この場合、1.5Mの硫酸アンモニウム溶液で吸着させ、蒸留水まで塩濃度を直線的に減少させる方法を用いたが、硫酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなども用いられる。この方法では、従って、変性していないタンパク質の分離ができる。例えば、Phenyl-5PWカラムから溶離されたウシ血清アミン酸化酵素が酵素活性を保持している。また、ウシ血清アミン酸化酵素、ラッカーゼ、ステラシアニンなどの銅タンパク質は、溶離後も銅イオンを保有している⁸⁾。

一方、逆相クロマトグラフィーの場合には、タンパク質は、更に、強く吸着されている。例えば、Phenyl-5PWよりphenyl基を多く導入したPhenyl-5PWRPの場合には、水の

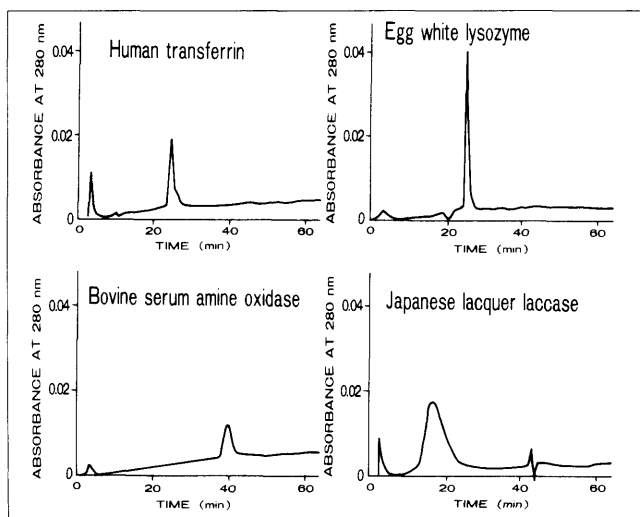


図6 タンパク質の疎水性クロマトグラフィー

カラム: TSK-gel Phenyl-5PW (0.78 l. D. × 7.5cm)
溶 離: 1.5M—0 M NH₄SO₄/0.05M トリス-塩素緩衝液 (pH 7.5)
流 速: 1.0 ml/min

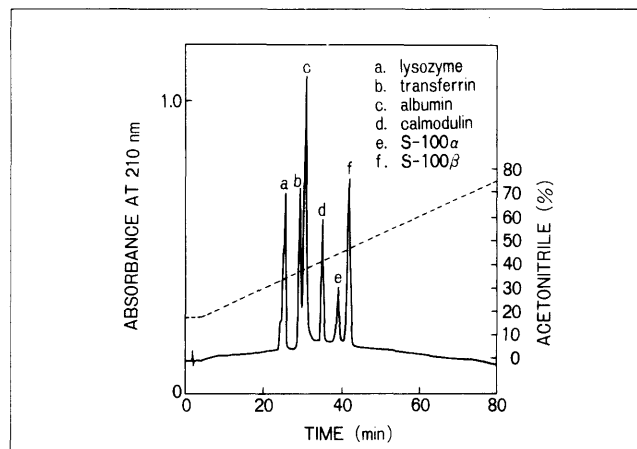


図7 ポリペプチドの逆相クロマトグラフィー

カラム: TSK-gel Phenyl-5PWRP (0.46 l. D. × 7.5cm)
溶 離: 20—75%CH₃CN/0.1%TFA.
流 速: 1.0 ml/min

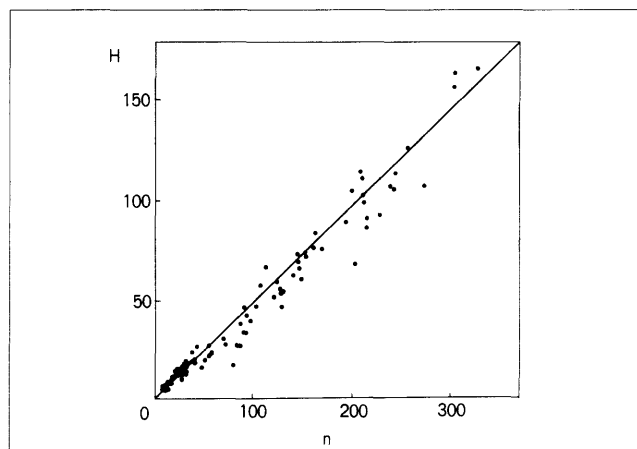


図8 ポリペプチドの疎水性と構成アミノ酸残基数との関係⁹⁾

分子量1,000から40,000までのポリペプチド100個を用いた。 n はポリペプチドの残基数、 H は構成アミノ酸残基の疎水度を加算して得られたポリペプチドの疎水度である。

移動相を用いても、リゾチームが溶離されない。そこで、移動相に有機溶媒を用いて、幾分変性したタンパク質、つまり、ポリペプチドを溶離するということになる。この場合には、一般に、サブユニットを持つタンパク質はサブユニットに解離された状態にある。図7にはその一例を示す。リゾチームはアセトニトリル35%の位置に溶離された。また、S-100タンパク質が α 、 β サブユニットに解離して溶離された。

上述のいずれのクロマトグラフィーにおいても、タンパク質は一般に疎水性の小さい方から順次溶離されている。タンパク質の疎水性 (H) と保持時間 (t_R) との関係を以下の式に示す。

$$t_R = a + b \log H$$

疎水性はそのポリペプチドを構成するアミノ酸の疎水性の総和で求められる。

$$t_R = a + b \log \sum D_i n_{ij}$$

ただし、ここに述べる D_j は0.1%TFA中でのもので、Sasagawa-Okuyamaによって再計算された値¹⁰⁾、 n_{ij} は、それぞれのアミノ酸の残基数である。そこで平均的なアミノ酸1残基あたりの疎水性を計算してみると大体0.5になる(図8)。一方、分子量(M)と疎水性(H)との関係は、図9に示すようにほぼ直線的である。よって、分子量と保持時間との間に直線関係が予想される。図10は、Phenyl-5PWおよびPhenyl-5PWRPの場合のタンパク質の保持時間と分子量との関係を示したものである。いずれの場合においても、低分子量領域では、分子量と保持時間とはほぼ直線的な関係にあるが、高分子量領域では予想される保持時間からのずれが見られる。このずれは、タンパク質の構造の寄与によるものであると考えられる。逆相クロマトグラフィーの場合(図10b)、タンパク質の高次構造が破壊され、構造の寄与は比較的に小さくなっている。それゆえ、

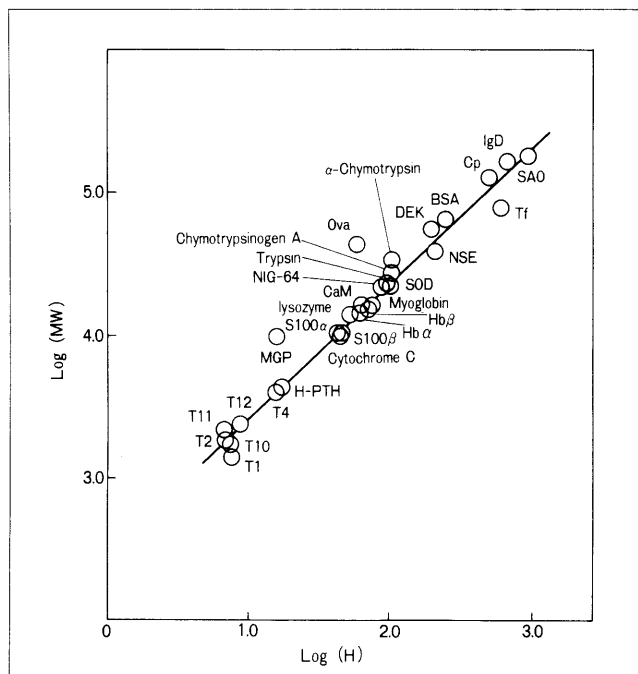


図9 ポリペプチドの分子量と疎水性との関係

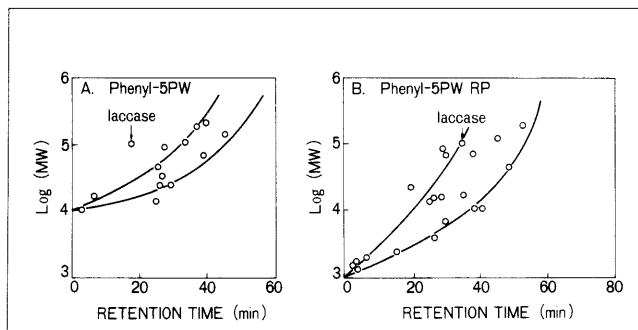


図10 疎水性(A)及び逆相(B)クロマトグラフィーにおけるタンパク質の分子量と保持時間との関係
カラム、溶離条件は、図6、図7にそれぞれ示した。

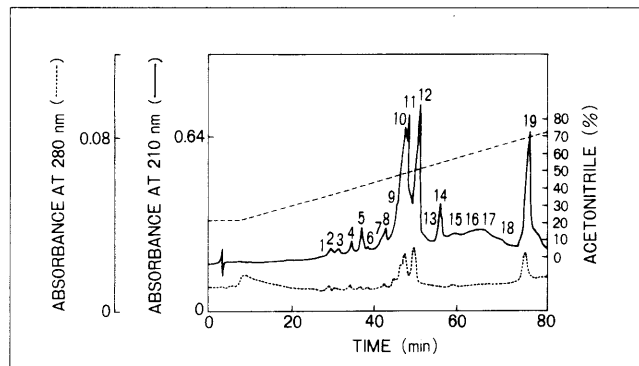


図11 膜タンパク質の逆相クロマトグラフィー

試料：1%SDS可溶化した赤血球膜

カラム：TSK-gel phenyl-5PWRP (0.46 I. D. × 7.5cm)

溶離：20—75%CH₃CN/0.1%TFA

流速：1.0 ml/min

Phenyl-5PWの場合に直線から大きく外れたラッカーゼはPhenyl-5PWRPの場合では、直線に近づいた。逆相クロマトグラフィーおよび疎水性クロマトグラフィーにおける分子量と保持時間との相関性に関しては、SDS存在および非存在下の電気泳動の場合に似ている。

逆相クロマトグラフィーでは、タンパク質が疎水性の差によって分離されるので、酸性度の強いSDSのような界面活性剤が存在しても大きな影響は受けない。従って、SDSのように強力なイオン性界面活性剤によって可溶化された膜タンパク質の分離にも利用できる。図11は1%SDSで可溶化したウシ赤血球膜をPhenyl-5PWRPカラムで分離を行った一例である¹¹⁾。移動相に界面活性剤を添加していないのが特徴である。主なピークについてアミノ酸分析を行なった結果、ピーク11がスペクトリンと同定された。1年間で約500試料の膜タンパク質の分離を行なってもカラムの劣化が認められなかった。なお、移動相に0.1%のSDSを添加すると、ウシ血球膜タンパク質の分離度を低下させる結果になった。この場合には、SDS-ポリペプチド複合体の状態が保たれていると考えられる。

4. ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

古くからタンパク質の分離精製に用いられてきた方法に、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーが^{12),13)}ある。最近、球状(平均粒径5 μ m)に成形した高性能のHPLC用のハイドロキシアパタイトが開発されてきた。このHPLC用ハイドロキシアパタイトカラムを用いて、数種のタンパク質のクロマトグラフィーを行なった結果を図12に示す。これらのタンパク質の溶離は、従来の結晶状ハイドロキシアパタイトカラムを用いたものと同様の挙動を示した。しかし、この球状のハイドロキシアパタイトカラムは従来のものよりも耐圧性(150kg/cm²)にすぐれ、HPLCカラムとして安定して、また高分離能でクロマトグラフィーを行なうことができた。タンパク質のハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーの溶離挙動は、まだ十分に理解されていないが、保持時間は酸性のタンパク質ほど小さく、また、塩基性のタンパク質ほど大きくなる傾向で、どちらかという陽イオン交換的である。しかし、イオン交換ク

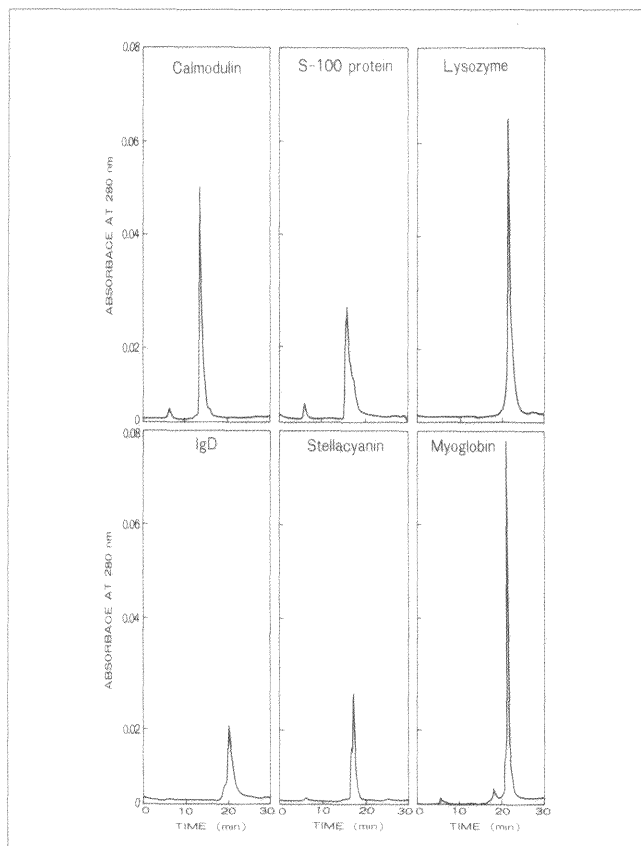


図12 タンパク質のハイドロキシアパタイトHPLC

カラム：球状HPLC用ハイドロキシアパタイト（東亜燃料工業株式会社・旭光学工業株式会社）（0.8cm I. D. × 10cm）

溶離：0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8）～0.4Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8）直線濃度勾配法

流速：1.0 ml/min

ロマトグラフィーでの分離が非常に難しいタンパク質の場合でも、容易に分離できることがあることが知られているので、アフィニティークロマトグラフィー的な要素が含まれていると考えられる。その意味では、非常に有用な場合がある。

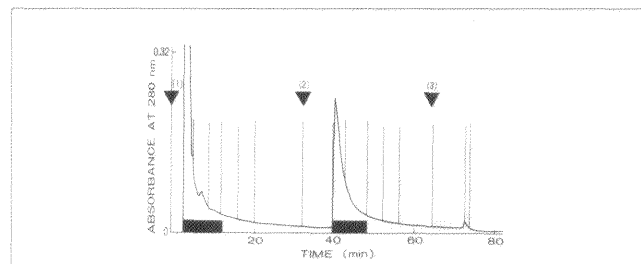


図13 ヒト血清のConAカラムクロマトグラフィー

カラム：GL-L55C（日立）（0.8cm I. D. × 10cm）

試料：ヒト血清100μl

溶離：(1) 0.05Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.2），0.02%Na₂S₂O₃，0.15M NaCl

(2) 0.05Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.2），0.2M D-グルコシド，0.02%Na₂S₂O₃，0.15M NaCl

(3) 0.05Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.2），0.02%Na₂S₂O₃，1.0 M NaCl

流速：1.0 ml/min

■で示した部分を集め、2次元電気泳動法による分析（図14）を行なった。

5. レクチンカラムによる糖タンパク質の分離

生物体の持つ非常に特異性の高い可逆的な結合を利用するアフィニティークロマトグラフィー¹⁴⁾は、適当なリガンドを選択することができれば、タンパク質を簡単に分離することができ、非常に有効なタンパク質分離法のひとつである。

親水性ポリマー系樹脂にレクチンを導入した高速アフィニティークロマトグラフィー用カラムを用いて糖タンパク質を分離した例を図13に示す。D-マンノースおよびD-グルコースに親和性を示すコンカナバリンAを導入したカラム（ConAカラム）に、ヒト血清を添加し、0.2M D-グルコシドを加えた緩衝液によってタンパク質の溶離を行なった。ConAカラム素通り画分と吸着画分を2次元電気泳動法によって分析した結果を図14に示した。ConAカラムに吸着したタンパク質画分では、主として、免疫グロブリンM、 α_2 マクログロブリン、ハプトグロビン、セルロプラスミン、トランスフェリン、ヘモベキシンなどが検出された（図14 C）。しかし、素通り画分にも、免疫グロブリンG、 α_1 酸糖

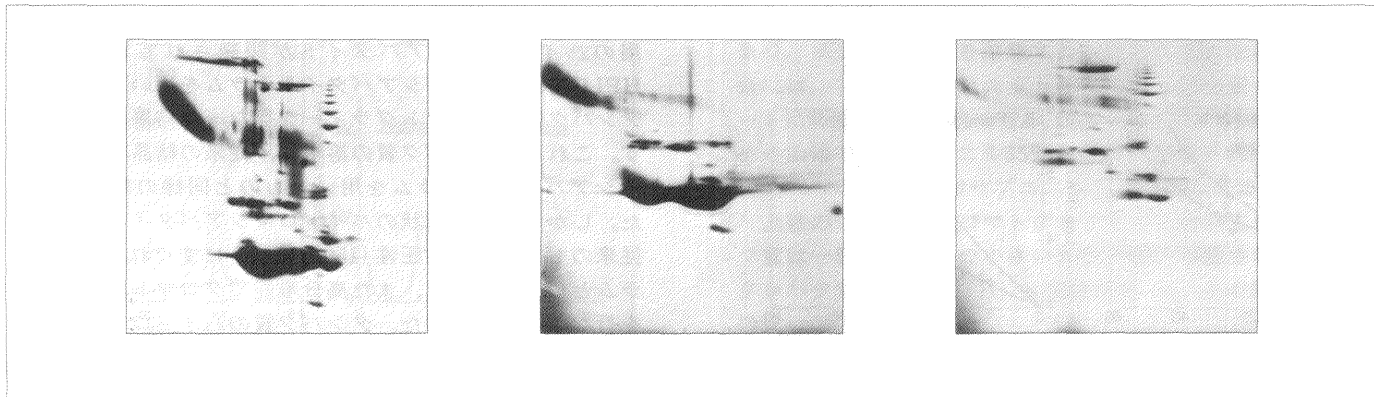


図14 ヒト血清のConAカラムクロマトグラフィー溶離液の2次元電気泳動

A. ヒト血清（クロマトグラフィー添加試料） B. ConAカラム素通り画分 C. ConAカラム吸着画分

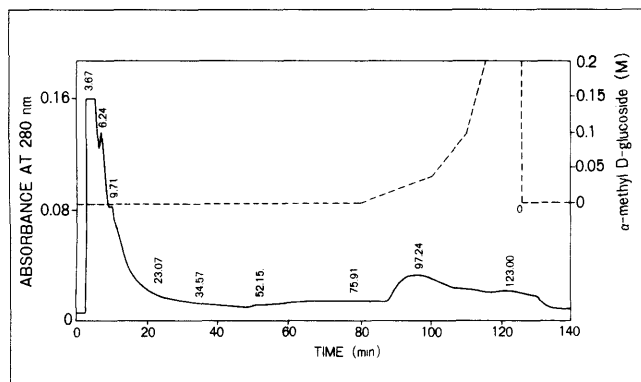


図15 D-グルコシド濃度勾配溶離法によるヒト血清のConAカラムクロマトグラフィー

試料：ヒト血清100μl

カラム：GL-L55C（日立）（0.8cm I. D.×10 cm）

溶離：0.05M トリス-塩酸緩衝液（pH7.2），0.02%NaN₃，0.15 M NaCl 中でのD-グルコシド濃度勾配溶離法

流速：1.0 ml/min

タンパク質など糖を含むタンパク質が見られる（図14B）。これらはConAレクチン染色法では、あまり染色されないタンパク質であり、含まれる糖類の組成によるものと考えられる。

さらに、ConAカラムに吸着したタンパク質をD-グルコシド濃度勾配法によって溶離を行なった場合の結果を図15に示した。この場合には、ConAカラムに吸着した血清中の糖タンパク質は、溶離液中のグルコシド濃度の変化によって、溶離・分画されている。これは、このカラムによって単に糖タンパク質と糖を持たないタンパク質の分離だけではなく、吸着した糖タンパク質の分離も可能であることを示している。

6. ゲル浸透クロマトグラフィーの限界

ゲル浸透クロマトグラフィーの分離の原理は、分子の形と大きさに基づいている。

$$t_R = a - b \log M$$

そのため、回収率が高く、非常に安心して用いられることが多かった。しかし、高能率のため、シリカを基剤に用いるようになってから、吸着を生ずる場合が見られ、これを防ぐために、タンパク質によって処理した充てん剤が試みられている。

一般に分離率に影響を及ぼすパラメータについて、次式が知られているが、この式から、GPCの場合の分離の限界について考察してみよう。

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{k'}{k' + 1} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha}$$

(1) 選択性(α)については、カラム温度、移動相の組成の変化などが考えられるが、タンパク質の場合、高次構造の保持が主要であるし、また、ポリペプチドの場合でも、その存在状態が大きく影響することが多いので、あまり有効ではない。また、移動相の組成は、不適切な吸着を減少させるという点では有効であっても、分離の向上という点では有効ではない。

(2) 容量比(k')については、細孔容量を大きくすることに

よって行なわれるが、これは、樹脂の強度に関係するので、HPLCとしては困難である。

(3) 理論段数(N)については、

(a) カラムを長くする。理論段数がカラムの長さの平方根に比例して大きくなる。しかし、カラムを無限に長くすることができない。実用性も考え合わせると、現在の1 mぐらいまでが妥当であろう。

(b) 粒子を小さくする。乱流が小さくなるので、理論段数が高くなるが、GPCの樹脂には分離されるべきタンパク質と同じくらいの大きさ（数十～数百オングストローム）の細孔がなければならない。現在、粒子径が1.5μmの充てん剤が開発されている。

7. おわりに

最近開発されてきた各種のHPLC用カラムでの水系クロマトグラフィーを中心にタンパク質のクロマトグラフィーについて述べてきた。タンパク質のクロマトグラフィーについての研究が進み、従来、経験的、試行錯誤的であったタンパク質の分離が、論理的かつ系統的なものになりつつある。タンパク質の分離については、さらに、クロマトグラフィーが用いられてゆくものと考えられるが、今後、HPLCの分離性能の向上によって、どこまで数多くの成分を一度に確実に分離できるのかということが課題であろう。また、微量化の問題とともに、近年大規模化されつつあるHPLCが、どこまで大型化できるのかということも1つの課題である。

参考文献

- 1) Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto : J. Chromatogr., **266**, 385 (1983)
- 2) S. Gupta, E. Pfannkoch, F. E. Regnier : Anal. Biochem., **128**, 196 (1983)
- 3) J. Richey : Amer. lab. Oct., 104 (1982)
- 4) T. Kadoya, Y. Amano, T. Isobe, Y. Kato, K. Nakamura, T. Okuyama : Bunseki Kagaku : **33**, E 287 (1984)
- 5) T. Kadoya, T. Isobe, Y. Amano, Y. Kato, K. Nakamura, T. Okuyama : J. Liq. Chromatogr., **8**, 635 (1985)
- 6) 門屋利彦, 奥山典生 : 分析化学, **32**, 664 (1983)
- 7) H. Ikigai, T. Nakae : J. Chromatogr., **322**, 212 (1985)
- 8) 門屋利彦, 陳 顕川, 王希成, 磯辺俊明, 真鍋 敬, 奥山典生, 大島隆一 : 第六回液体クロマトグラフィー討論会講演要旨集 (1985)
- 9) Y. Kurosu : Thesis 138 (1985)
- 10) T. Sasagawa, T. Okuyama, D. Teller : J. Chromatogr., **240**, 329 (1982)
- 11) X. C. Chen, T. Isobe, T. Okuyama : J. Liq. Chromatogr., submitted
- 12) A. Tiselius, S. Hjerten, O. Livin : Arch. Biochem. Biophys., **65**, 132 (1965)
- 13) G. Bernardi : Mehtod in Enzymology XXII, 325 (1971)
- 14) J. Turkova : J. Chromatogr. Library, Vol. 12 (1978)

カラムスイッチング法を利用する全自動高速液体クロマトグラフィー

Fully Automated HPLC Using Column Switching Technique

高萩 英邦*

(昭和60年10月21日受理)

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は薬物のほとんどが紫外部に吸収を有する幸運も手伝って、血液 (血清、血漿) 尿等の生体液中の薬物濃度の測定をはじめ、そのファーマコキネティックな解析や代謝研究には欠かせない分析手段となった。特に近年、データ処理装置やオートサンプラー等の周辺機器が発達し、多数の試料を測定するには極めて都合のよい方法となってきた。しかしながら、除蛋白や抽出等の試料の前処理、クリーンアップ法はほとんどの場合が手作業であり、ここが自動化の律速因子になっているのが現状であろう。

我々はカラムスイッチング法^{1)~5)}を利用して、前処理を全く行わずに血漿、血清等の生体試料を直接注入することのできる完全自動HPLCを試み、好結果を得た^{6)~8)}。Roth¹⁾やVoelter²⁾らに始まるカラムスイッチング法を利用した生体試料の直接注入の方法は、その後いくつかの報告がある。彼らの方法を含め、その多くの場合は第1カラムにODSカラムを用いる、いわばプレカラム方式である。この方法は、試料中の極性の高い生体液構成成分を素通りさせ、極性の低い薬物等をODSに保持させた後、有機溶媒を含む移動相で第2カラムに導入させるもので、ODS-ディスプレイザブルカラムをオンライン化したものと言える。

我々は第1カラムに十分な分離能を有するGPCカラムを用いて薬物成分を蛋白成分から分離し、必要なピークのみを第2カラムに導入する方法を採用した。

ここではこの方法の原理を説明すると共に、高い蛋白結合を有する薬物へも応用し、その有用性を確かめることができたので紹介する。

2. 装置の構成と操作方法

利用した自動液体クロマトグラフは2台のポンプ (日立655、及び島津LC-5A)、1台のUV検出器 (日立638)、オートサンプラー (ウォーターズWISP710B) スwitchングバルブ装置 (東洋曹達PT-8000)、データ処理器 (日立833クロマトプロセッサ) 及び2本のカラムから構成される (図1)。2本のカラムは除蛋白用 (Col-1: 東洋曹達, TSK-gel 2000SW, 7.5×300mm) と分析用 (Col-2: エルマ光学 ERC-ODS-1262, 6×100mm 又はウォーターズ μ -Bondapak-C18, 3.9×300mm) である。

先ずCol-1に注入された血漿 (又は血清) 中の被検成分は、アルブミン等の血漿成分から分離される。蛋白成分はCol-2に導入されることなく廃棄される (図1(A))。血漿蛋白から分離された被検薬物を含むピークは、2本のカラム

を直列に継ぐことによりCol-2に導入される(B)。被検薬物を含むピークがすべてCol-2に導入された後、2本のカラムは再び分離され(C)、薬物はCol-2によって分離され、検出される。

2本のカラムには汎用性を考慮し、Col-1として水系GPCカラムを、Col-2としてはODSカラムを選択した。水系GPCカラムは水溶性高分子の分離を目的につくられており、蛋白と低分子化合物の分離は良いが、分子量の小さな化合物間の分離は十分でなく、通常は低分子域にまとまって溶出する。しかしながら、GPCカラムは溶離液の選択が容易であり、低分子化合物相互の分離はCol-2に用いたODSカラムに任せることができる。

我々の方法では2本のカラムを用いるから、通常の場合の約2倍の分析時間を要することになる。しかし、一方のカラムで分離が行なわれているとき、他方のカラムでは残った血漿成分の洗浄と緩衝化が行なわれており、本法が何十本と連続して分析しても分離能が落ちず、自動分析法として優れた利点を有している秘訣はここにあると言っても過言でない。

スイッチングバルブの変換操作は、予め設定した時間に自動的に行なわれるので、血漿等の試料をオートサンプラーにセットするだけで、全く手を触れることなく自動的に分析することができる。

3. 分離条件の設定

この方法において最も大切な点は、2本のカラムに対する移動相溶媒の組み合わせにある。図2に模式的に示したように、Col-1によって分離された目的成分を含むピーク

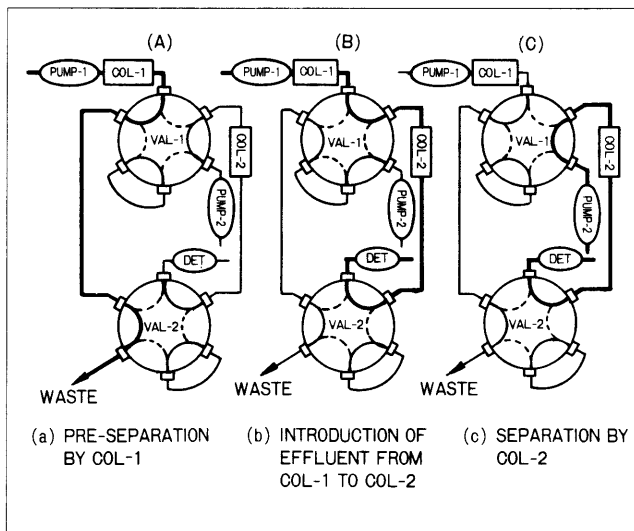


Fig.1 SCHEMATIC DIAGRAM OF COLUMN SWITCHING TECHNIQUE

* 三共株式会社 分析代謝研究所 薬学博士

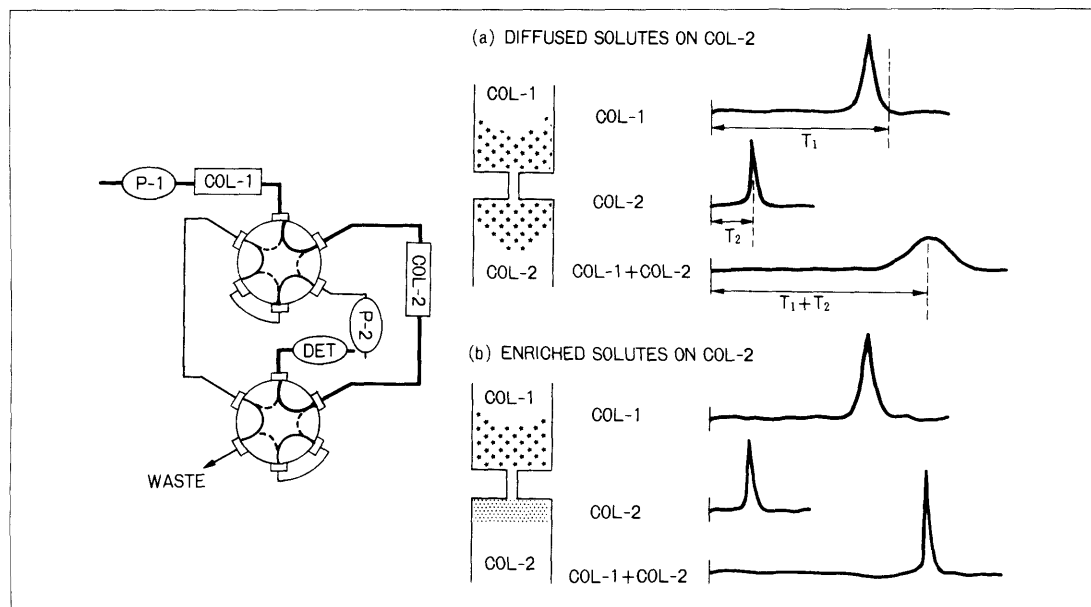
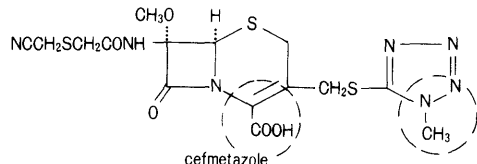


Fig.2 Effect of solutes enrichment on peak sharpness

は拡散して溶出する。この溶出液をCol-2にオンラインで導入するから、溶出液中の目的成分がCol-2の上端で濃縮される条件を選択しなければ、得られるピークはブロードになり、定量精度と感度の減少を来すことになる。

分離条件の選択方法をセフメタゾールの分離を例にとって説明する。セフメタゾールは下記の構造を有するセファ



マイシン系抗生物質である。セフメタゾールをODSカラム (Col-2) によって溶離し、至適な保持時間 ($1 < k' < 10$) に溶出させるには5~10%のアセトニトリルを含む移動相を用いる必要がある。一方、Col-1による溶離は緩衝液だけで行なうから、両移動相の極性の差 (アセトニトリルの含量比) が少なく、Col-2から溶出するピークは図2(a)に示したように極めてブロードになってしまう。そこでCol-2の移動相にテトラブチルアンモニウムブロマイドを加え、イオン対を作らせて溶離したところ、20~25%のアセトニトリルが必要であった。Col-1とCol-2の移動相にこれだけの極性の差を持たせると、Col-1によって溶離された溶質はCol-2の上端で濃縮される。この濃縮された溶質はCol-2に20~25%のアセトニトリルを含む移動相が導入されると溶離が始まる。表1はこのようにして決められたセフメタゾールの分析条件を示したものである。

表1に示した条件でセフメタゾール標準液の分離を行ない、ODSカラム1本で分離したときの結果と比較したものを表2に示した。

カラム2本を用いるカラムスイッチング法ではセフメタゾールの保持時間が約26分とCol-2だけの場合の2倍以上の時間を要するが、ピークの高さは両者に差が無く、カラムを2本継いだことによるピークのプロード化は全く起っていないことがわかる。

Table 1 ANALYTICAL CONDITIONS FOR CEFMETAZOLE BY COLUMN SWITCHING HPLC TECHNIQUE

	C-1	C-2
PACKING MATERIAL	TSK-2000SW (7.5mm.i.d. × 30cm)	ERC-ODS-i262 (6mm.i.d. × 10cm, 5μm)
MOBILE PHASE	0.005M TBAB*, 0.025M CITRATE BUFFER, pH 5.0	0.005M TBAB, 0.025M CITRATE BUFFER, pH 5.0/ ACETONITRILE = 78/22
FLOW RATE	1 ml/min	1 ml/min
DETECTION	UV 254nm	UV 254nm
SAMPLE (STD. SOLN., PLASMA)		
CONCENTRATION	3 μg/ml	
VOL. INJECTED	10-50 μl	2 ml
PROGRAMMER		
T = 0	INJECTION	FLUSHING, CONDITIONING
T = 13.00	SEPARATION	
T = 15.00	INTRODUCTION FROM C-1 TO C-2 (2ml)	
T = 25.00	FLUSHING, CONDITIONING	SEPARATION
	STOP	

* TBAB : tetrabutylammonium bromide

Table 2 COMPARISON OF RETENTION TIME AND PEAK HEIGHT ON CEFMETAZOLE PEAK BETWEEN COUPLED COLUMNS AND SINGLE COLUMN

COUPLED COLs (COL-1+COL-2)		SINGLE COL (COL-2)	
Tr (min)	PEAK HEIGHT (mm)	Tr (min)	PEAK HEIGHT (mm)
25.4	217	11.0	222
26.8	208	11.4	215
26.1	213	11.1	212
25.3	211	11.3	220
26.1	220	11.9	225
25.9 ± 0.6	213.8 ± 4.8 (C.V. = 2.2%)	11.1 ± 0.2	218.8 ± 5.3 (C.V. = 2.4%)

図3と4はこの方法によるクロマトグラムを示したものである。図3は標準溶液の例で、AはCol-1、BはCol-2だけによる分離を、Cはスイッチング法によるクロマトグラムである。セフメタゾールはCol-1だけで溶離するとき、保持時間14分の位置に溶出するので、13~15分の2分間(2

ml)の溶出液をCol-2に導入することとした。Cにおけるセフメタゾールのピークの保持時間はCol-2への注入時間(15分)とCol-2による保持時間(11分)の和の位置に溶出し、そのピークの高さはCol-2だけによるものとほぼ同じ高さであることに注目願いたい。

図4は血漿に添加したセフメタゾール(D)とブランク血漿(E)のクロマトグラムである。セフメタゾールの溶出位置に定量の障害となるピークは認められない。なお、このクロマトグラムはCol-1の溶出液をモニターしないで得たものであるが、Col-1溶出液をモニターすれば0~13分の間に多くの血漿蛋白のピークが出現する。

図5はこの方法で得たセフメタゾールの検量線を示したものである。標準溶液による検量線とブランク血漿に添加

したそれとに差は認められない。このように標準溶液だけで検量線が得られるのも本法の特徴の1つである。

4. 蛋白結合の影響

血漿を直接注入する本法では、蛋白結合の強い薬物の場合はその一部は血漿蛋白と結合したまま分離され、棄てられるのではないかと疑問が生じる。そこで強い蛋白結合で知られるワーファリンを用いて、蛋白結合の定量に及ぼす影響について検討した。

表3に示したように、Col-1を0.05Mリン酸緩衝液に5%アセトニトリルを加えた条件で溶離したとき、ワーファリンは93%しか回収されなかったが、ここに塩化ナトリウムを加えて溶離すると回収率は高くなり、0.1M以上の濃度では定量的に回収されることがわかった。ワーファリン

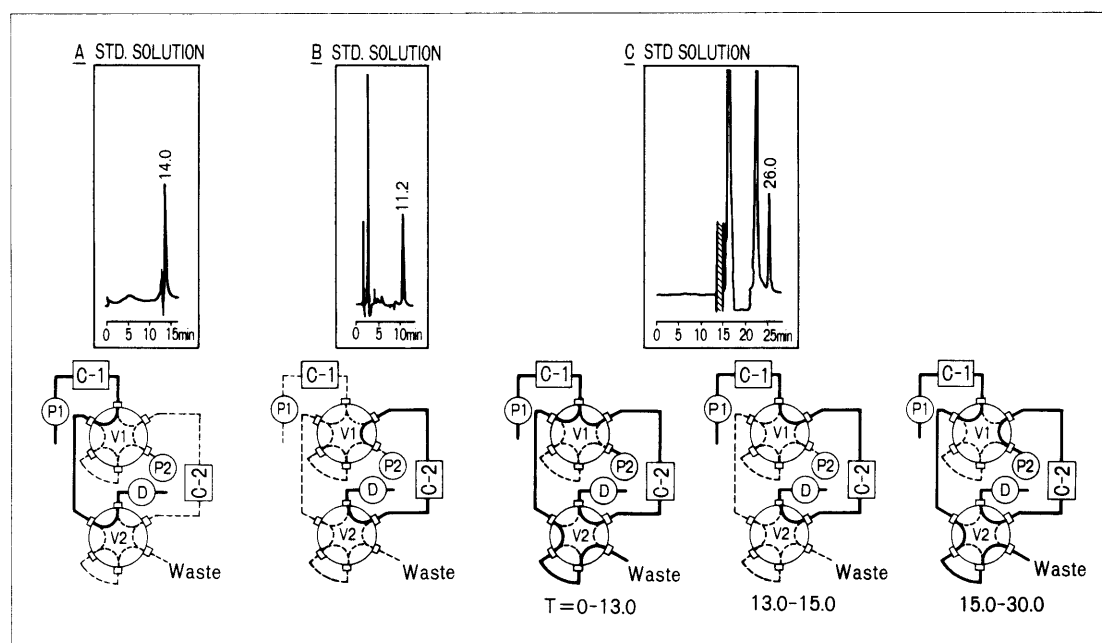


Fig.3 TYPICAL CHROMATOGRAMS (1)

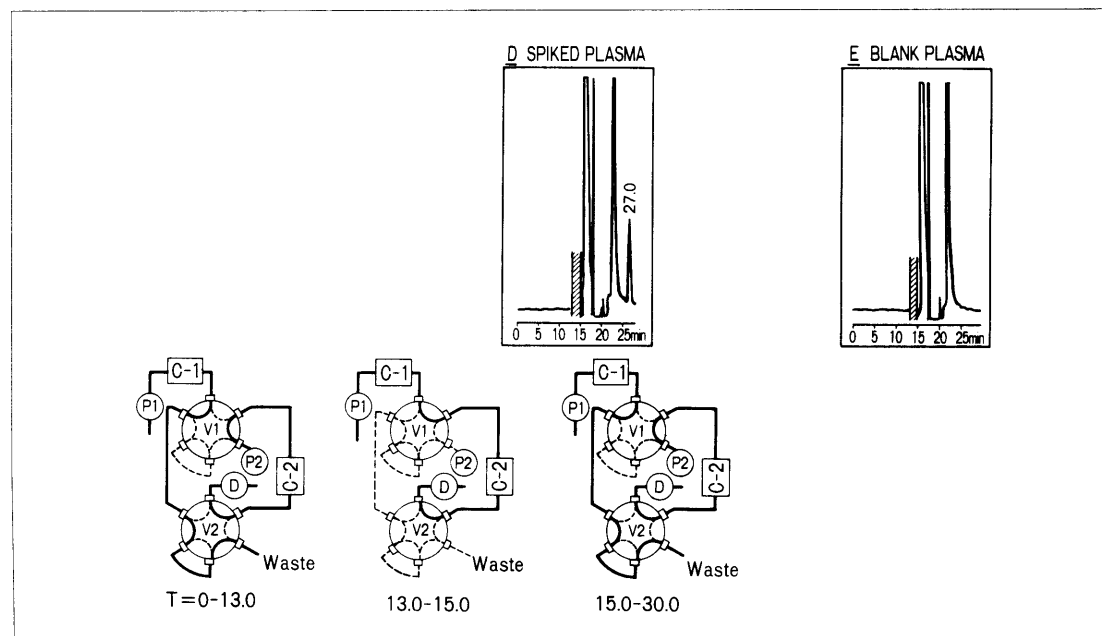


Fig.4 TYPICAL CHROMATOGRAMS (2)

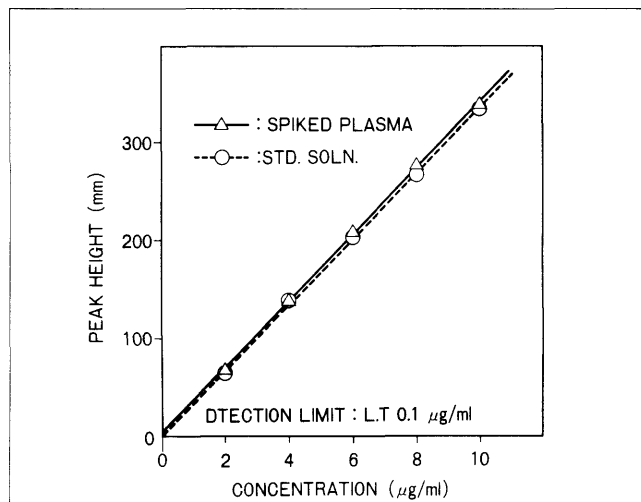


Fig.5 CALIBRATION CURVES FOR CEFMETAZOLE

Table 3 RECOVERY OF WARFARIN FROM RAT PLASMA*

Conc. of NaCl (M)**	0	0.05	0.10	0.20
% Recovery	93.0	96.0	101.1	100.9

* Warfarin was added to rat plasma and incubated at 37°C for 30min.

** Mobile phase for Col-1 was consisted of 95 parts of 0.05M phosphate buffer (pH7.0) including above concentration of NaCl and 5 parts of MeCN.
Col-1: TSK-G2000SW (300×7.5mm)
Col-2: μ-Bondapak C18 (300×3.9mm)

のように蛋白結合の強い薬物でも、適当なイオン強度を持った移動相を用いることにより、その結合を切って遊離の形で定量することができる。

5. 考 察

カラムスイッチングの方法には種々の方法が報告されている。我々が用いたのは2つのバルブを用いる方法である。図1に示した今回の方法では、2本のカラムに2つのインジェクターを取り付けてあり、2本のカラムの分離条件をカラムを取り外すことなく検討することができるだけでなく、通常のシングルカラムクロマトグラフィーもこのままの接続で行なうことができる。

又、カラムの配置を変えることにより、図6に示したような応用も可能である。まず(A)-(1))は上部のバルブをインジェクターバルブとして用い、試料を[C-1]に注入後

(P1)を用いて不要成分を洗い流し(A)-(2))た後、[C-1]に保持された成分を移動相を反対方向から送って(バックフラッシュ)、分析用カラム[C-2]で定量する(A)-(3))方法である。Bは極性化合物と非極性化合物のように、本来は2本のカラム又はグラジエント溶離をして同時分析を行なうようなときに利用できる方法である。例えば、[C-1]と[C-2]に共にODSカラムを用い、[C-1]に注入された試料のうち極性の高い化合物を極性の高い移動相を用いて溶離し、定量する(B)-(1))。次いで[C-1]用の移動相を[C-2]に用いている極性の低い移動相に変え、[C-1]に保持されていた低極性の化合物を[C-2]に導入する(B)-(2))。(B)-(3))では[C-2]によって低極性化合物の分離定量を行なうと同時に[C-1]のカラムの洗浄と緩衝化を行なう課程である。なお、用いたスイッチングバルブは2つのポンプに対して任意の時間に3種類の移動相を自動的に選択することができ、Bに示したような応用が可能になったものである。

6. おわりに

以上、カラムスイッチング法を利用して、前処理なしに直接生体液を注入することのできるドラッグモニターの方法を紹介した。この方法は、単に省力的というメリットだけでなく、前処理課程のロスがなく、前処理によって分解するような不安定化合物の定量が可能なこと、蛋白結合の影響を受けないなど数々のすぐれた点を有しており、今後ますます普及する方法と考えられる。

参考文献

- 1) W. Roth et al.: J. Chromatog., **222**, 13 (1981)
- 2) W. Voelter et al.: J. Chromatog., **239**, 475 (1982)
- 3) R. E. Majors: J. Chromatog. Sci., **18**, 571 (1980)
- 4) F. Erni et al.: J. Chromatog., **204**, 65 (1981)
- 5) C. E. Werkhoven-Goevie et al.: J. Chromatog., **255**, 79 (1983)
- 6) 黒崎かおる 外: 第4回液体クロマトグラフィー討論会 (1983)
- 7) H. Takahagi et al.: 9th Int. Symp. on Column Liquid Chromatog (1985)
- 8) H. Takahagi et al.: J. Chromatog in press

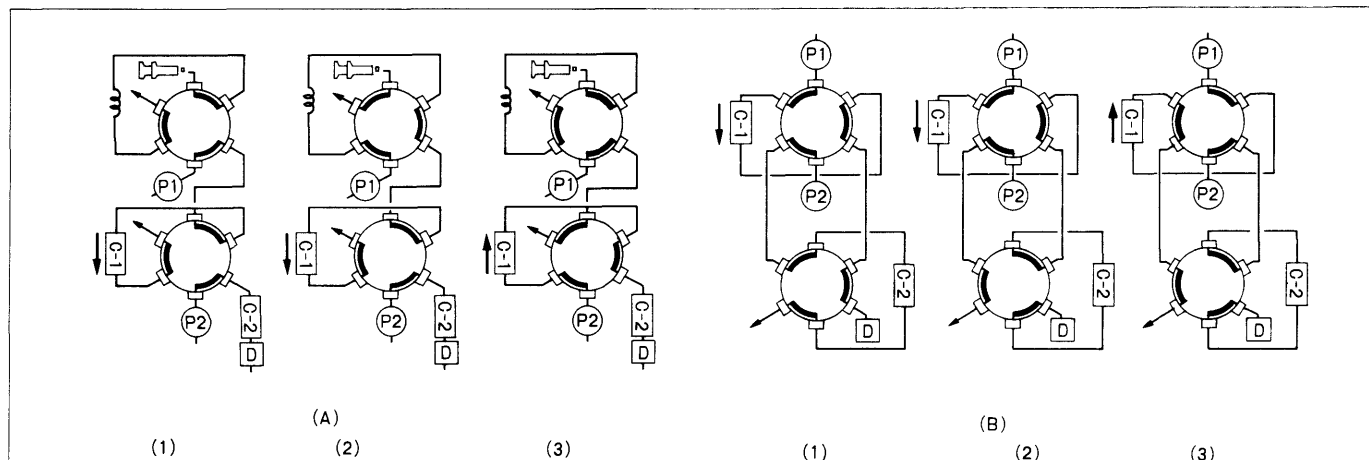


Fig.6 SOME VARIATIONS OF COLUMN SWITCHING TECHNIQUE

報 文

ゼーマンフレイムレス原子吸光光度法による血中鉛の定量の実際

Determination of Lead in Blood Using Zeeman Effect Flameless Atomic Absorption Spectroscopy

大原 昭男* 道辻 広美* 山口 恭平* 藤木 幸雄*

(昭和60年10月1日受理)

1. はじめに

フレイムレス原子吸光光度法 (FLAA) を用いると、生体試料の分析、特に血液中や尿中の金属の定量が、比較的簡単に行えるようになった。しかし、実際にFLAAで生体試料を分析する場合、種々の問題が報告されている。

すなわち、バックグラウンド (BKG) の補正、グラファイトキューベット (キューベット) の劣化に伴う発現温度の上昇、キューベットのロット差、原子化部の気密度、温度プログラムの設定条件、キューベット内に注入されたサンプルの広がり等である。

最も大きな問題点とされていたBKGの補正方法には、現在、ゼーマン方式、D₂方式、SH方式等種々の補正方法が報告されており、全衛連の生体試料精度管理調査によれば、BKGの補正方法としてゼーマン方式が最も優れていると報告している¹⁾。

今回は、我々がを行っている血液中鉛の具体的な分析方法と、種々の問題点についての対処の方法について報告する。

2. 分析方法

2.1 前処理方法

FLAAで血液中鉛の分析を行う場合の前処理方法は種々報告されているが、大別すると3つの方法に分けることができる。第1に血液を界面活性剤溶液や蒸留水で希釈する方法^{2)~4)}、第2に血液を湿式灰化する方法⁵⁾、第3に血液を希酸で除蛋白しその上清を分析する方法⁶⁾である。

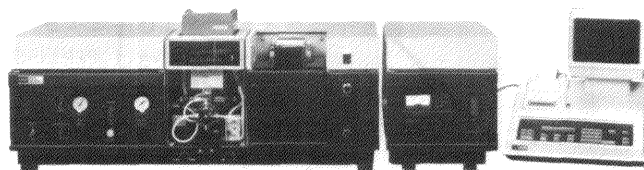
当科学センターでは、血液中鉛だけで、年間5,000~6,000件の分析を行っているため、煩雑な前処理方法では、この多くの件数を処理することはできないこと、またFLAAで分析を行う場合、フレイム原子吸光光度法と比べ、使用する器具や試薬等からの汚染の影響が大きいことから、我々は最も簡単な前処理方法である、第1の方法を用いることとし、血液を1%トリトンX-100で5倍に希釈する方法で分析を行っている。

2.2 分析条件

表1に示す条件で分析を行っている。

サンプルの注入量は10 μ lで、ノルマルチューブ形キューベット (図1) を使用し、注入回数は1検体1回のみである。

機器導入時は、1検体につき2回の注入を行い、2回の平均値を分析値としていた。しかし、1検体2回注入では時間的なロスが大きいことや、キューベットの効率面を考慮して、1回測定時と2回測定時の値を検定してみた。その結果この両者間に有意差は認められなかった (表2参照)。



180-80形日立ゼーマン原子吸光分光光度計

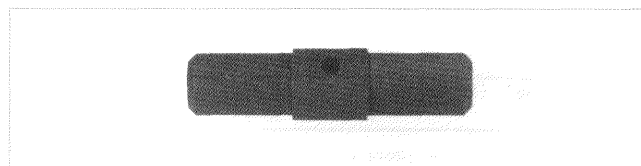


図1 ノルマルチューブ形キューベット

表1 分析機器および条件

HITACHI 180-80 TYPE POLARIZED ZEEMAN FLAAS (AUTOMATIC SAMPLING SYSTEM 170-0125)		
WAVELENGTH	283.3nm	
SLIT	1.3nm	
CUVETTE	TUBE TYPE	
CARRIER GAS	200ml/min	
HEATING PROGRAM		
STAGE	TEMP (°C)	TIME (sec)
DRY	40 ~ 120	20
ASH-1	200 ~ 400	20
ASH-2	500 ~ 500	10
ATOM*	1600	5
CLEAN	2000	3
* TEMP CONTROL ON		

従って、日常の管理が充分に行われていれば、1検体1回の注入で充分であり、また注入ミスもBKGの値から判断することが可能であるため、現在ではすべて1検体1回の注入で、良好な結果を得ている。

図1、2は分析時のチャートを示す。

2.3 注入量のチェック

オートサンプラー (図2) でサンプルを注入する場合、少なくとも1年に1回注入量のチェックを行い、正確な注入量を把握しておく必要がある。

我々がやっているチェックの方法は、注入量 (サンプル量) を重量で測定している。

オートサンプラーのアルミ製アーム部より注入チューブを取り外して手で持ち、オートサンプラーを作動し蒸留水

* 松下産業衛生科学センター

表2 1回測定と2回測定(血中鉛 Pb $\mu\text{g/dl}$)

No	X1	X2	m	e	No	X1	X2	m	e	No	X1	X2	m	e
1	4.8	4.6	4.7	0.021	28	3.7	3.6	3.65	0.014	55	3.8	4.0	3.9	-0.026
2	4.4	4.4	4.4	0	29	3.7	3.6	3.65	0.014	56	4.6	3.8	4.2	0.087
3	4.3	4.1	4.2	0.023	30	5.4	5.2	5.3	0.019	57	4.4	4.2	4.3	0.023
4	4.4	4.3	4.35	0.011	31	3.0	3.0	3.0	0	58	3.8	3.8	3.8	0
5	4.7	4.7	4.7	0	32	2.6	2.6	2.6	0	59	5.6	5.6	5.6	0
6	5.0	4.9	4.95	0.010	33	2.6	2.5	2.55	0.019	60	3.7	3.9	3.8	-0.027
7	4.1	4.2	4.15	-0.012	34	3.2	3.2	3.2	0	61	2.7	2.3	2.5	0.074
8	4.6	4.7	4.65	-0.011	35	3.2	3.0	3.1	0.031	62	2.1	2.0	2.05	0.024
9	5.7	5.4	5.55	0.026	36	3.5	3.8	3.65	-0.043	63	2.9	2.9	2.9	0
10	3.7	3.8	3.75	-0.014	37	3.7	4.2	3.95	-0.068	64	2.5	2.5	2.5	-0.040
11	3.8	4.2	4.0	-0.053	38	3.5	3.8	3.65	-0.043	65	3.5	3.8	3.65	-0.043
12	5.4	5.4	5.4	0	39	3.5	3.2	3.35	0.043	66	3.0	2.7	2.85	0.050
13	7.7	7.6	7.65	0.006	40	3.1	3.1	3.1	0	67	2.4	2.7	2.85	-0.063
14	3.9	4.3	4.1	-0.051	41	2.5	2.5	2.5	0	68	3.2	2.9	3.05	0.047
15	3.3	3.3	3.3	0	42	4.2	3.9	4.05	0.036	69	2.4	2.7	2.55	-0.063
16	3.0	3.3	3.15	-0.050	43	2.9	3.0	2.95	-0.017	70	4.2	3.8	4.0	0.048
17	1.8	2.0	1.9	-0.056	44	4.2	3.9	4.05	0.036	71	3.2	2.7	2.95	0.078
18	3.9	3.4	3.65	0.064	45	3.8	3.7	3.75	0.013	72	3.5	3.3	3.4	0.029
19	2.5	2.2	2.35	0.060	46	5.2	5.4	5.3	-0.019	73	3.5	3.0	3.25	0.07
20	4.7	5.0	4.85	-0.032	47	3.0	2.9	2.95	0.017	74	1.7	1.8	1.75	-0.029
21	3.0	3.0	3.0	0	48	7.4	7.4	7.4	0	75	2.0	1.9	1.95	0.025
22	4.6	4.3	4.45	0.065	49	4.2	4.6	4.4	-0.048	76	3.5	2.7	3.1	0.114
23	6.2	6.2	6.2	0	50	2.0	2.1	2.05	-0.025	77	2.9	2.5	2.7	0.069
24	3.0	3.1	3.05	-0.017	51	4.3	4.2	4.25	0.012	78	2.3	2.0	2.15	0.065
25	3.6	3.6	3.6	0	52	4.3	4.4	4.35	-0.012	X	3.73	3.73	3.76	
26	4.3	4.6	4.45	-0.034	53	3.2	3.5	3.35	-0.047	SD	1.181	1.181	1.163	
27	5.9	5.9	5.9	0	54	4.8	4.8	4.8	0					

結果：1検定及び符号検定の結果：X1とX2の間に差はなかった。

を吸入させ、予め重量を測定しておいたポリエチレン製のカップに吐出させる。この操作を2～5回繰り返して行い、重量を測定し1回当たりの注入量を求めている。

2.4 サンプル注入時の注意

キューベットにサンプルを注入する場合の注意点はサンプルを注入する深さである。

サンプラーチューブの先端部が軽くキューベットの底につく程度に調整し、チューブ先端のカット部も常に一定方向に向ける必要がある。

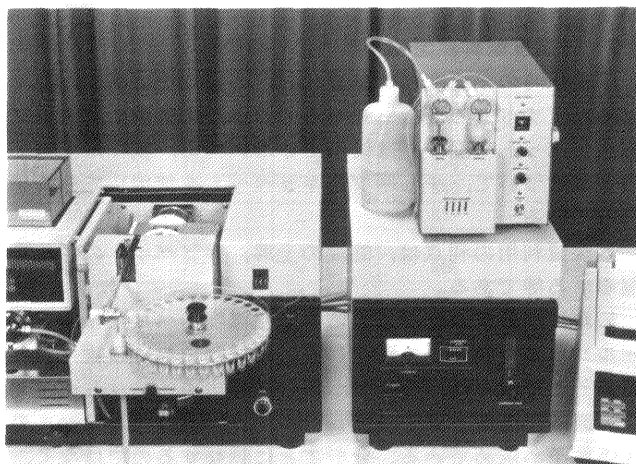


図2 グラファイトアトマイザ用オートサンプラー

血液中鉛の分析に限れば、リンス液ボトルも付属のポリエチレン瓶よりもガラス瓶の方がよい。リンス液は1ℓのガラス瓶に入れて超音波槽に入れ、アスピレーターで減圧し蒸留水中に含まれる空気を脱気する。この操作により、リンス用シリンジやサンプル用シリンジに混入する空気を、大幅に減少させることができる。このことは、サンプル注入ミスや注入量の変化を少なくすることができる。

2.5 キュベットの管理

FLAAで分析を行うキューベットの管理が、充分に行われているか否かで、分析値が左右されるといっても過言ではない。

キューベットの管理、つまりキューベットの状態を正確に知るために、我々は血液中鉛分析用のコントロール血液⁷⁾を作成している。

このコントロール血液は、ヒトのブール血液を1%トリトンX-100で5倍に希釈し、小型のポリエチレンチューブに5 mlずつ分けて、-85℃に凍結保存している。

血液中鉛を分析する場合には、まず始めに、このコントロール血液を分析し、その鉛の吸光度とBKGの数値から、機器、オートサンプラー、キューベットの状態、設定条件の善し悪しを判断している。またその為には機器、オートサンプラー、キューベット、設定条件が最も良い場合のコントロール血液の吸光度を知っておくことが必要である。

新しいキューベットを使用する場合も、このコントロール血液を注入し、鉛の吸光度が一定になったところで、標準系列、コントロール血液、検体の順に分析を行っている。

また、オートサンプラーの31番目には、常にコントロール血液を入れておき、オートサンプラーが1回転後すなわち30検体分析した後のキューベットの状態を管理している。図3、4に実際のチャートを示す。

キューベットは、それぞれ金属別、サンプル別(尿、血液、その他)に区分し、それぞれの使用回数を累積記録すると共に、灰化温度も管理ノートに記録し管理指標としている。

また、キューベットをリング(図5)に装着する場合も、前回装着した方向と今回装着する方向を逆にしない、つまり、常に一定方向に装着する必要がある。一定方向に装着しないと、キューベットの劣化状態から原子化炉部の気密性を確認することができない。

キューベットは使用すると徐々に劣化⁸⁾(肉眼的にも確認できる炭素の昇華等)が起こってくるので、常に一定方向に装着すればこれを確認することができるため、必要な措置を講ずることができるが、使用の都度装着方向が変われば、劣化に左右差があるか否かの確認をすることができないので管理を誤ることがある。

リングの交換時期についての明確な指標はないが、当科学センターの現在の取り扱い件数では約6ヶ月間で吸光度の再現性が悪くなり、バラツキも大きくなるように思われるので、6ヶ月に一度、定期的に交換している。

2.6 灰化温度管理

FLAAで実際に分析を行う場合、灰化温度が重要であることは言うまでもないが、灰化温度を一定に保つことは非常に難しい。キューベットの劣化について、我々が検討を行った結果⁹⁾、キューベットは使用により抵抗値が高くなり、

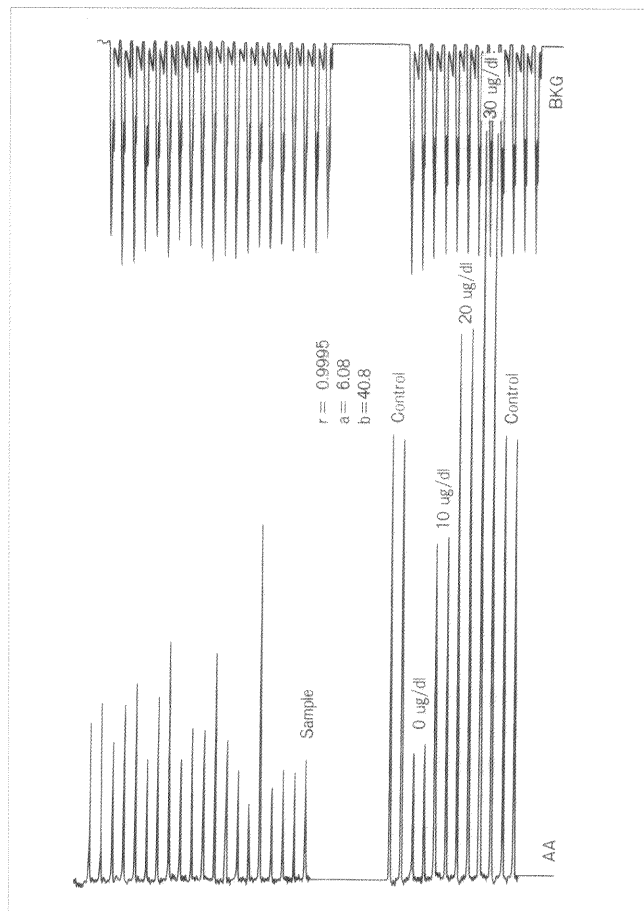


図3 標準系列

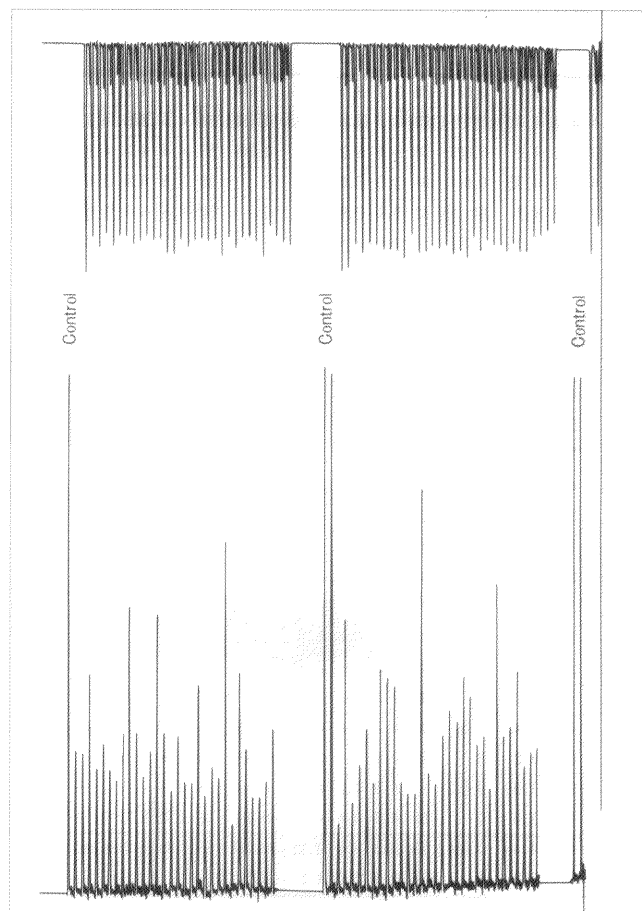


図4 検体分析

使用回数と抵抗値の間には、 $r=0.98$ と良好な相関関係が認められた。このことは、市販されている機器のほとんどが電流制御方式であることから、キュベットが新しい時には設定温度に近い温度に制御されていると思われるが、頻回に使用するとキュベットは劣化し、実際の温度は設定温度よりやや高くなる。

FLAAで血液中鉛の分析を行う場合、灰化温度が重要である。原子化温度は、設定温度より実際の温度が高くなっても分析値に殆ど影響を与えないが、灰化温度が設定温度より高くなると、灰化時に鉛の一部が飛散し、誤った結果を得ることになる。現在市販されている機器では、灰化温度を正確に制御することはできない。そこで、我々は前記のコントロール血液を用いて、間接的に灰化温度を推定している。

具体的には、まずはじめにコントロール血液を分析し、鉛の吸光度とBKGの吸光度から灰化温度を推定し、使用回数に伴って設定温度を $500^{\circ}\text{C} \rightarrow 450^{\circ}\text{C} \rightarrow 400^{\circ}\text{C} \rightarrow 350^{\circ}\text{C}$ と下げている。

表1の灰化温度 500°C は、キュベットの劣化が殆どない状態の時の灰化温度である。

キュベットの管理を充分に行って使用すれば、ノルマルチューブ形キュベットの場合であれば、1本で血液中鉛を500~600件分析することができる。

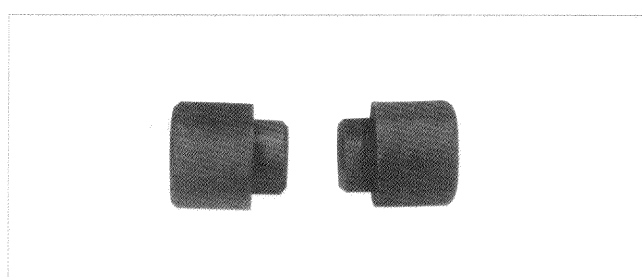


図5 リング

2.7 光温度制御装置

原子化時の光温度制御装置(図6)の有用性は高く、我々は殆んどすべての分析に利用している。本装置ではカップ形キュベット(図7)は使用できないため、我々はすべての金属について、チューブ形キュベットを使用して分析を行っている。

本装置利用の利点は、感度の上昇、キュベットの劣化を遅らせる等である。

しかし、分析のたびごとに原子化温度レベルとコントロールレベルを調整して設定しなければならない煩雑さがある。そこで我々は、リングが新しい時にキュベットを装着し、原子化温度と原子温度レベル、コントロールレベルの関係を予め求めている。分析ごとに調整するのではなく、予め求めておいたレベルに合わせている。我々の測定した

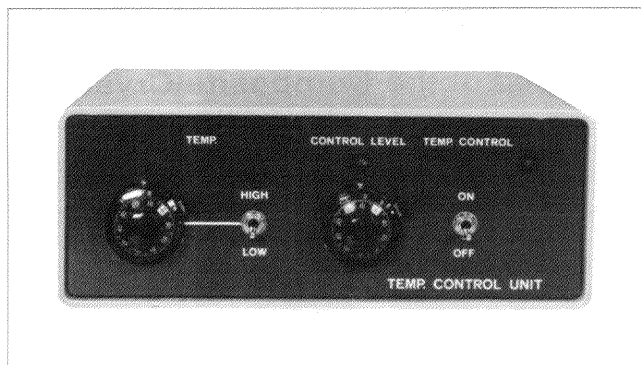


図6 光温度制御付属装置

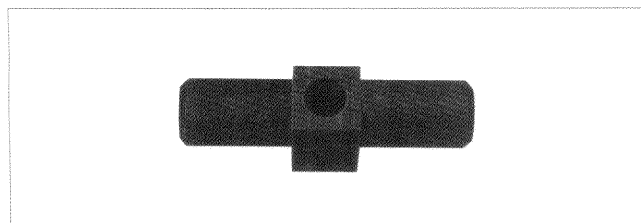


図7 カップ形キュベット

原子化温度と原子温度レベル、コントロールレベルの関係は表3のごとくである。

2.8 ランプ電流と印加電圧

ランプの劣化、石英ウインドの汚れ、および波長が正確に合っているか否かを確認するため、各ホーロカソードランプ（HCL）電流と、フォトマルのゲイン（印加電圧）の関係を求めておく必要がある。

例えば鉛の場合、HCLに明記されている電流値7.5mAを流し、ランプの光強度が安定するまで30分間放置する。30

表3 原子化温度と温度コントロール、コントロールレベル
(TUBE type)

原子化温度 (°C)	電 流 (A)	HIGH or LOW	温度 コントロール レベル	コントロール レベル
3000	400 ↑	H	920	950
2900	400	H	911	930
2800	395	H	906	920
2700	370	H	900	910
2600	352	H	893	900
2500	340	H	888	880
2400	325	H	879	860
2300	310	H	872	840
2200	300	H	866	810
2100	285	H	858	800
2000	275	H	850	770
1900	265	H	840	740
1800	252	H	831	700
1700	242	H	816	670
1600	235	H・L	806	640
1500	225	H・L	794	620
1400	220	L	784	600
1300	210	L	763	550
1200	202	L	743	480
1100	195	L	716	440
1000	185	L	677	400
900	178	L	636	350
800	168	L	561	280

分後スリットを1.3nmに合わせ、鉛の吸収波長283.3nmに合わせる。

CRTディスプレイ上で光強度が100になるゲインの数値を記録しておき、数値が大きくなればランプの劣化、石英ウインドの汚れ、波長が正確に合っていない等機器の状態を知ることができる。

2.9 使用後の清掃

分析終了後は、原子化炉部よりキュベットを取り出し、アルコール綿で炉内、ふたの汚れをふき取る。

3. ま と め

我々がを行っている血液中鉛の具体的な分析方法について報告した。

フレイムレス原子吸光光度計を用いて生体試料を分析する場合、キュベットの善し悪しが分析値に大きく影響するため、キュベットの管理を充分に行わなければならない。しかし、現在の電流制御方式の機器では、キュベットの温度管理にも限度がある。キュベットの温度、特に灰化時の温度（200～1200°C）を正確に制御できる温度制御方式の機器の開発を期待したい。

参考文献

- (1) (社)全国労働衛生団体連合会：企業外健康診断機関業務適正化のための精度管理調査結果報告書、その1 生体試料測定による精度管理、昭和58年3月
- (2) F. J. Fernandez : Summary of HGA results in several Blood Lead Proficiency Testing Programs. ATOMIC ABSORPTION APPLICATION STUDY NUMBER 641, PERKINELMER
- (3) F. J. Fernande : Micromethod for lead determination in whole blood by atomic absorption, with use of the graphite furnace. Clinical Chemistry, 21, No. 4, 558-561, 1975
- (4) R. J. Shambergen : Effects of blood and urine on lead analyzed by flameless atomic absorption, J. Clin. Chem. Biochem, 21, 107-111, 1983
- (5) Lars Friberg and Marie Vahte : Assessment of Exposure to Lead and Cadmium through Biological Monitoring : Results of a UNEP/WHO, Global Study 1. Environmental Research. 30, 95-128, 1983
- (6) Carl G. Elinder, Lars Friberg et al. : Lead and Cadmium Levels in Blood samples from the General Population of Sweden : Environmental Research. 30, 233-253, 1983
- (7) 道辻広美, 大原昭男, 内藤勝巳, 黄河正昭, 藤木幸雄 : フレイムレス原子吸光光度法による血液中鉛の精度管理について(第1報) 第56回日本産業衛生学会, 第34回日本産業医協議会 講演集, 488-489, 1983
- (8) 安田秀子, 佐々木胤則, 斎藤和雄 : ゼーマン型原子吸光装置を用いた血液中の重金属測定によるキュベットの劣化 分析化学, 30, 538-544, 1982
- (9) 黄河正昭, 大原昭男, 山名正紀, 山口恭平 : 原子吸光光度計に使用するキュベットの劣化について 松仁会医学誌, 24, 1985へ投稿中

酵母マイクロボディ複合結晶体を構成する酵素分子の構造解析(II)

Structure Analysis of Enzyme Molecules Composed of the Composite Crystal in Yeast Microbody (II)

大隅 正子*

(昭和60年7月23日受理)

2.4 デジタル画像処理による解析^{13)~15)}

以上の事実、デジタルプロセッシングによる画像処理¹²⁾により再確認された。

結晶体の超薄切片のネガティブ染色像(図15a)からコンピュータ回折パターン(図15b)を得ると、回折スポットが格子の交点に整然と現れ、周期性、対称性が正確に把握できる。また、回折スポットの部分が情報でその他はノイズであるというように、かなりよくノイズと情報を区別できる。

さらにこの手法の利点は、像と回折パターンの間に可逆性が存在することである。つまり、回折パターンの中で情報と思われる部分だけを残してその他の部分は取り除き、像に戻すことができる。この手法はフィルタリングと呼ばれる。

また、この手法を発展させたフーリエ解析によって、より正確な再生像を得ることができる。図15c~fは図15aの電顕像にフーリエ解析を応用した結果である。

図15cは図15bの回折パターンの中から100, 200, 110より再生した像で、結晶体が2個の異質の粒子から成ることを示している。

図15dは4組の回折スポット040, 130, 220, 310より再生した像で、結晶体を構成するアルコールオキシダーゼのサブユニット構造だけを見事に示している。

さらに、回折スポット240, 330, 420より再生したものが図15eで、複合結晶体を構成しているもう1つの酵素カタラーゼのサブユニット構造を、明確に表している。

これらの解析は光沢法による解析結果とよく一致し、その上、再現性、正確さの点で構造解析のためにより有利な手法であるといえよう。

2.5 Z方向の重なりを持った超薄切片像からの解析¹⁶⁾

凍結超薄切片のネガティブ染色像では、この切片における結晶体の粒子の一層のみが染色された場合、サブユニット構造までよく解析することができるという利点があった。

これに対し、通常の超薄切片では切片染色ポジティブ染色のほかブロック染色もしてあるので、切片の全域にコントラストがついている。すなわち、Z方向(厚さ)の重なりに関する情報も保持していることになる。この方法によっても、結晶体の大小粒子の配列は詳しく解析された。

図16はZymolyase60000で細胞壁を消化した後、グルタールアルデヒド-オスミウム酸固定し、さらに酢酸ウラニウムでブロック染色した細胞の超薄切片像である。非常に運よく、1つの細胞内に前述の結晶体の3つのパターン(001, 101, 111面)が見られる。

このそれぞれのパターンをデジタルプロセッシング法により解析した結果が図17である。ポジティブ像からもネガティブ像と同様の(ただし、酵素分子は黒く表される)結果が得られ、コンピュータで作成したそれぞれのパターンの大小粒子の配列は、図17cのようになった。

さらに厚い0.5~1 μ mの切片を1000kVの超高電圧電子顕微鏡で観察した結果が図18aである¹⁷⁾。とくに切片の端において、大小の異質の粒子が交互に並んでいる様子がよく分る。

この像のデジタルプロセッシング法による解析結果が図18b, cであるが、図18cは前述の図17b1と一致した。

2.6 精製カタラーゼのネガティブ染色像

最後に、酵母細胞から単離精製されたアルコールオキシダーゼとカタラーゼの構造を、前述の結晶体中の酵素分子の配列と比較したい。

アルコールオキシダーゼについては、Katoら¹⁸⁾により8量体であることがネガティブ染色像から報告されており、我々の示す次元モデルのそれとよく一致している。

そこで、カタラーゼについて、最近、ボロンの支持膜¹⁹⁾を用いて試料を作製した結果、直径約7nmの粒子のサブユニットが観察された(図19)²⁰⁾。

この粒子は極めて微小なため、解析するにはまだ充分とはいえないが、図20a, bのようなモデルを考えることができる。ネガティブ染色像による観察から、サブユニット構造がbで示されるような配列をとることが示唆される²⁰⁾。

2.7 複合結晶体としてのマイクロボディ結晶体

以上の裏付けにより、酵母マイクロボディ結晶体は異質の粒子、すなわちアルコールオキシダーゼとカタラーゼが交互に規制正しく配列した、岩塩型の非常にめずらしい複合結晶体であると結論できる。大粒子(アルコールオキシダーゼ)は 10.5 ± 0.5 nm, 小粒子(カタラーゼ)は 7.4 ± 0.5 nmの大きさであり、11nmの間隔で立方晶系の中に存在すること、さらに、大粒子は8個のサブユニット(5.25 ± 0.25 nm), 小粒子は4個のサブユニット[(3.7 ± 0.25 nm) $\times$ (7.4 ± 0.25 nm)]が45°回転して配位していることが解明された(図14)。

* 日本女子大学生物学教室教授 医博

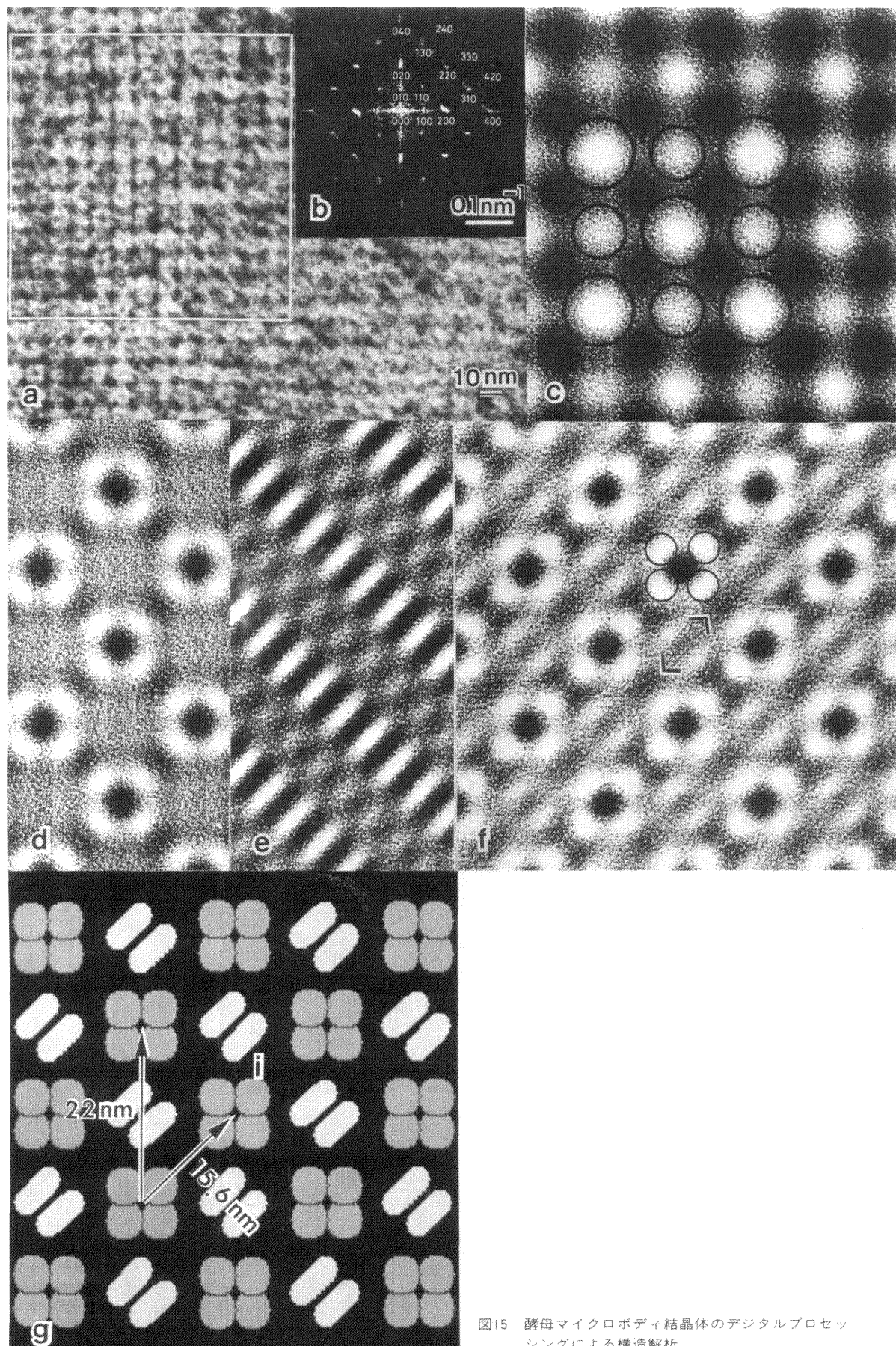


図15 酵母マイクロボディ結晶体のデジタルプロセッシングによる構造解析

写真略語

Cry 結晶体
M ミトコンドリア
Mb マイクロボディ
V 液胞

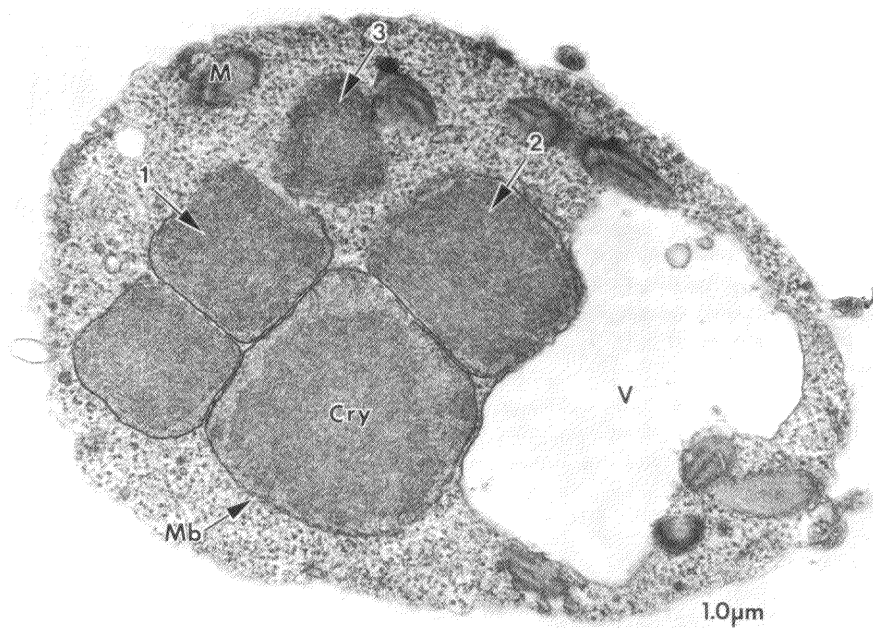


図16 酵母マイクロボディ結晶体の3つのパターン001(1), 101(2), 111(3)を同時に示す *Kloeckera* sp. no. 2201細胞の切片像 × 32,000

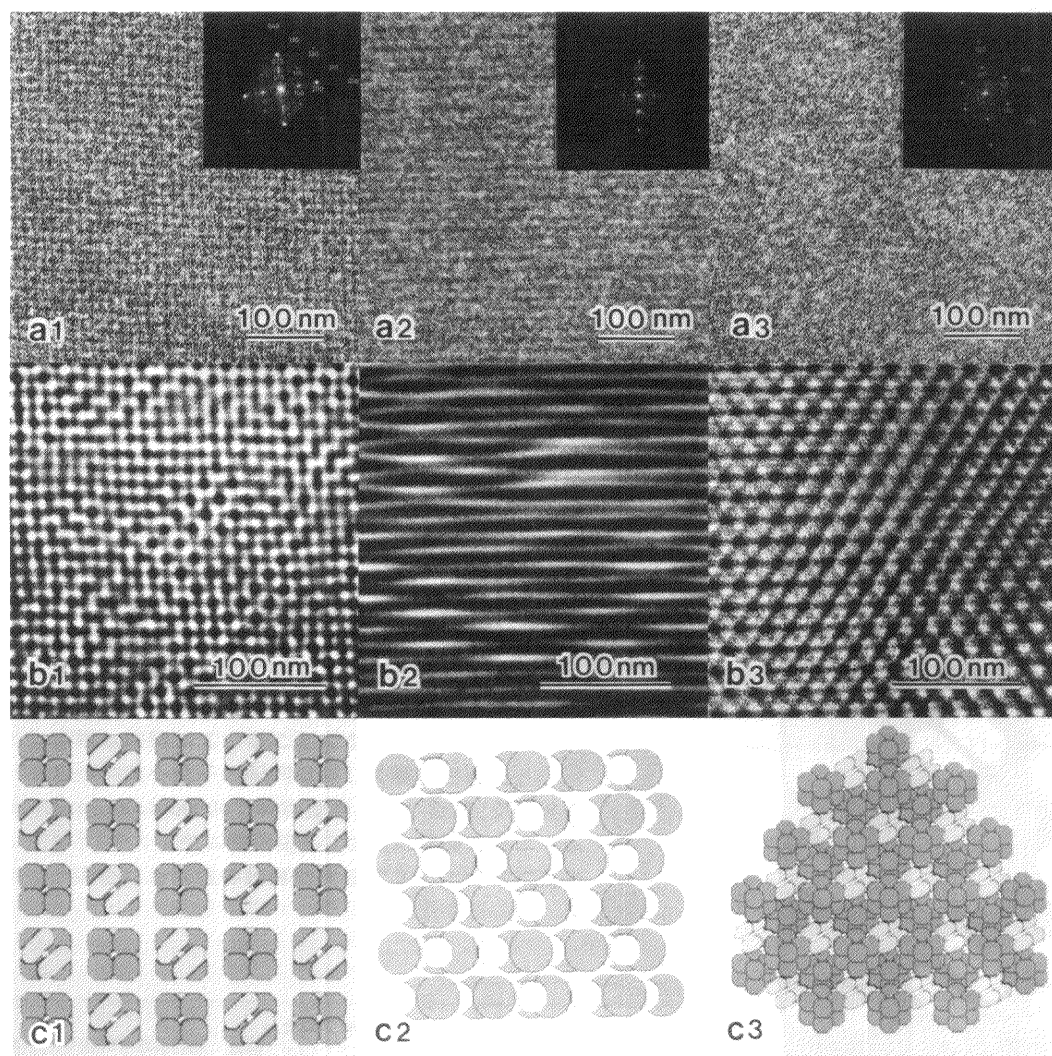


図17 図16の切片像中マイクロボディ結晶体001(1), 101(2), 111(3)面のデジタル画像解析 a× 100,000

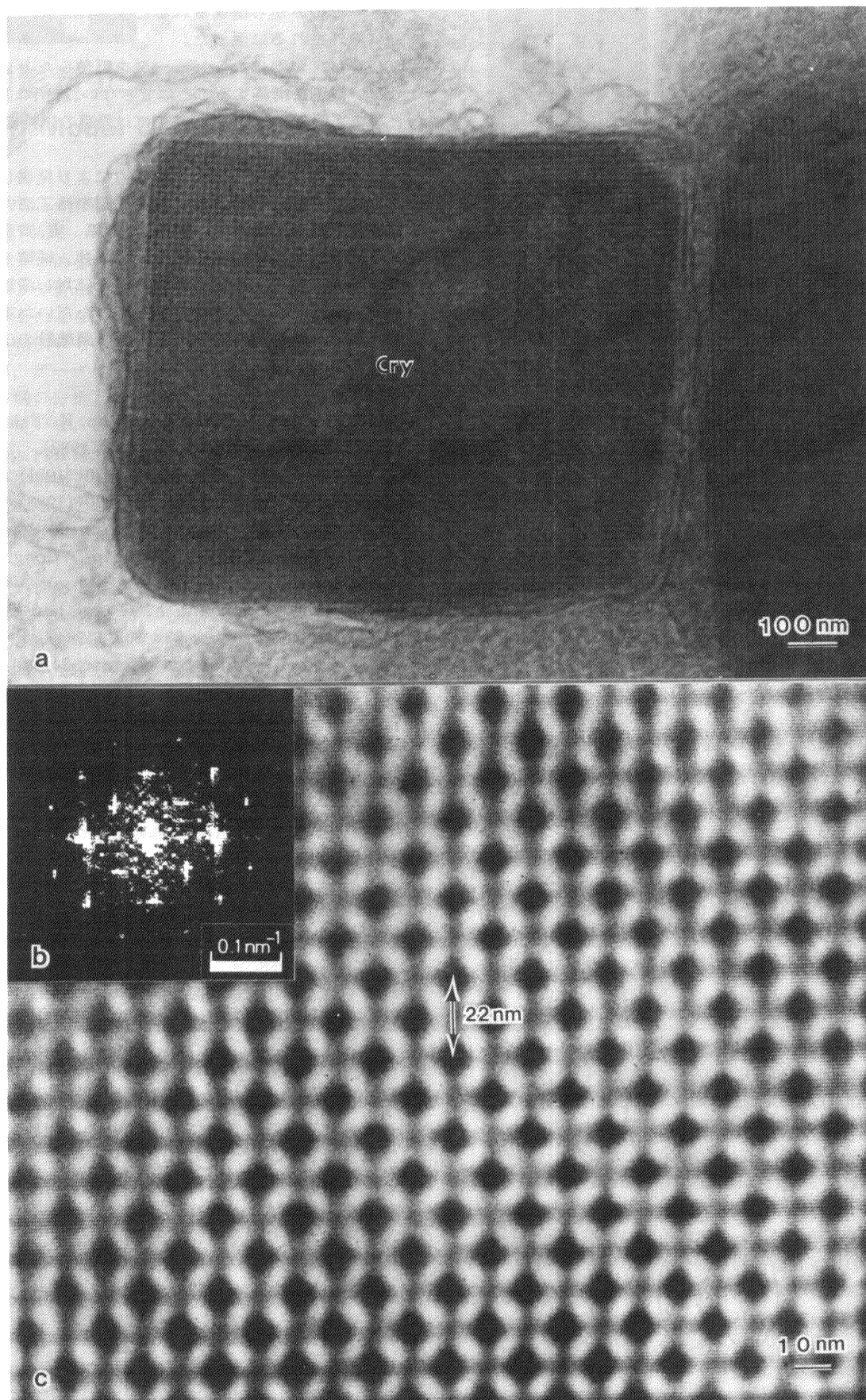


図18 酵母マイクロボディ結晶体001面の超高電圧電子顕微鏡像(a), コンピュータ回析像(b)と透過像(c) a×80,000 b×600,000

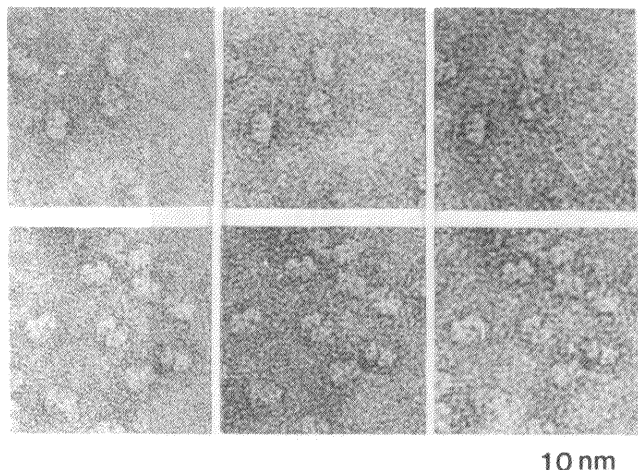


図19 *Kloeckera* sp. no. 2201細胞より単離精製されたカタラーゼのネガタイプ染色像300nmずつのスルーフォーカス写真 shapedフィラメント, 200kV撮影 $\times 300,000$

3. おわりに

物質の構造と電顕像から解析する上で、コンピュータによる画像処理は極めて有効な手段である。

私が酵母マイクロボディ結晶体の構造解析に着手してから久しい年月が経ったが、初期の頃、仮説に基づいた複合結晶体のモデルを作り、コンピュータを使わずにシミュレーションを行ったことがある。実際にどのようにしたかという、化学構造のモデルを作るのに使うプラスチックの粒子と棒を用いて結晶体のモデルを構成し、それと地球儀の軸に地球の代わりに取り付けた。そして、種々の角度に回転傾斜させ、その投影図を1つ1つ接写してレンズに収めたのである。

全く、今思い出してみると涙ぐましい努力の作業であった。このような手作業に比して、コンピュータ・シミュレーションは何と速く、かつ正確に、あらゆる面における構造を提示してくれたことか。

そして、さらにデジタル・フーリエ・トランスフォームやフィルタリングなどの手法により、この結晶体が非常に稀な複合結晶体であることが裏付けられ、アルコールオリ

シダーゼのみから構成されたとするHarderらの考えは、完全に除外されるに至った。

しかし、いかにコンピュータを駆使したとしても、存在しない構造を構築することはできない。鮮明な画像を得ることがまず第1であり、その基礎には最良の試料作製法がある。

この研究は多くの方々の御協力により発展した。

ここに、京都大学柳田充弘教授、国際精工酒井俊男氏、日立製作所那珂工場永谷 隆博士、篠原 実、斉藤 司技師、日本電子株式会社鈴木三喜男氏、細井 純博士、工学院大学金谷光一教授、及び馬場則男博士に対し深謝する次第である。また、心よく種々の協力をいただいた本研究室の佐藤真美子、馬場美鈴両氏、電子顕微鏡施設の山田直子氏に感謝する。

参考文献

- 12) K. Kanaya, N. Baba, M. Shino, K. Takamiya and T. Oikawa : *Micron* **13**, 205 (1982).
- 13) 大隅正子 : 電子顕微鏡 **16**, 120 (1981).
- 14) 大隅正子 : 化学と生物 **16**, 670 (1983).
- 15) M. Osumi, M. Nagano, N. Yamada, N. Baba and K. Kanaya : *Proc. 10th Int. Congr. Electron Microsc.* **3**, 47 (1982).
- 16) N. Baba, M. Nagano, M. Osumi, and K. Kanaya : *J. Electron Microsc.* **33**, 203 (1984).
- 17) M. Osumi : *J. Electron Microsc.* **34**, 60 (1985).
- 18) N. Kato, Y. Omori, Y. Tani and K. Ogata : *Eur. J. Biochem.* **64**, 341 (1976).
- 19) 金谷光一 (私信)
- 20) 大隅正子 : 昭和59年度・日本電子顕微鏡学会関東支部講演会発表 (1985)

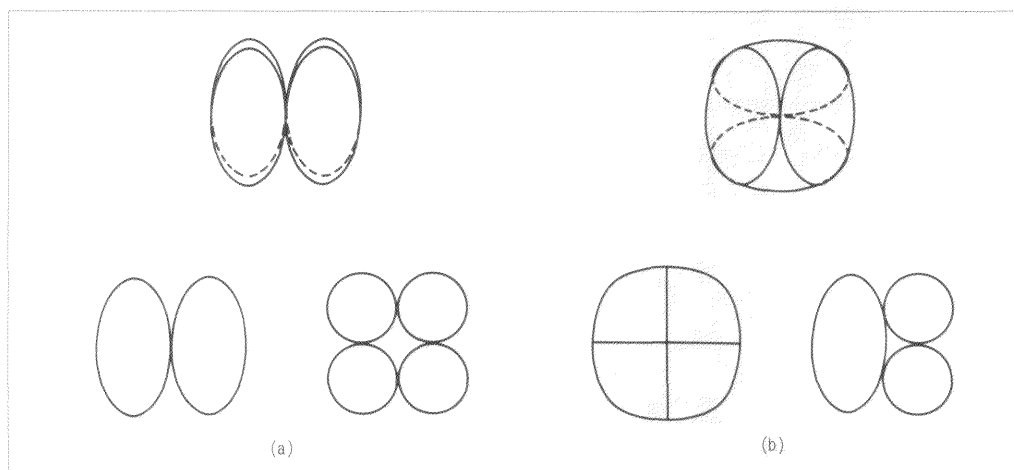


図20 酵母カタラーゼ分子のモデル図

解 説

D-2000形日立クロマトデータ処理装置

HITACHI Model D-2000 Chromato-Integrator

吉原 桃八* 関 貴和夫* 上武 成吾**

(昭和60年11月1日受理)

1. はじめに

クロマトグラフの分野では、データ処理装置の必要性が増し、ルーチン分析から研究開発まであらゆる分野でなくてはならないものとなっている。更に、このデータ処理装置への要求も幅広いものとなり、定性、定量はもとより各種の補正計算、データファイル、そして計算結果のレポート作成など各種の分析目的に対応できるものとしての要求が高まってきている。またクロマトグラフのシステム化の傾向が目立ち、大容量メモリを有する他のコンピュータやクロマトグラフ用周辺装置とのデータ通信なども要求が多くなってきている。これらの背景をふまえ、新しい概念に基づくクロマトグラフ用データ処理装置D-2000形を開発した。

この新形データ処理装置は、標準として256kバイトの大容量RAMを採用し、約7時間(条件固定時)のクロマトグラムを記憶でき、後からこのデータを読み出し、再解析や再計算などを簡単に行うことを特長としている。これらは今までフロッピーディスクを用いて行っていたが、本体のICメモリだけでこのような処理ができ、ベースライン補正や、ピーク検出点のマーカや成分名の表示などが簡単に可能となった。また操作部には、80文字の表示ができる液晶ディスプレイを用いており、分析者はディスプレイとの対話で操作ができるため、基本的な操作は取扱説明書を用いずに行うことができる。その他オプションとして同時処理が2チャンネルまででき、インタフェースを追加することにより、クロマトグラフの周辺装置とのデータ通信が可能となる。すなわち専用ネットワークによるシステム化を考慮した製品となっている。また分析データはRS232Cにより、外部コンピュータへのデータ通信もできる。図1に外観を示す。

2. 装置の構成

図2にD-2000形データ処理装置の構成図を示す。本装置は、MPUに6809、メモリには集積度の高い256kビット系の半導体メモリを使用し、マイクロコンピュータを構成したものである。固定記憶メモリ(ROM)の中に本装置を駆動するための各種のプログラムが記憶されている。一方、一時記憶メモリ(RAM)によりピークデータなどを大量記憶が可能となる。また、CMOS-RAMと呼ばれる低消費電力用のメモリーも使用し、電源のoff時にCMOS-RAM用の電源(Li-電池)に切り替え、分析パラメータ等をセーブしている。分析条件他各種操作を行うキーボード装置の状態

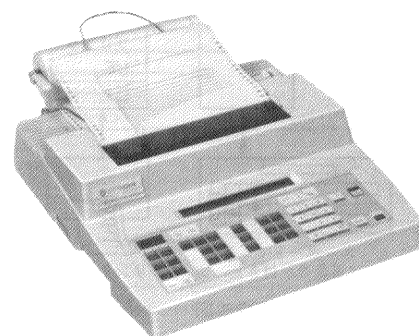


図1 D-2000形日立クロマトデータ処理装置

を示すディスプレイ、データ処理結果、クロマトグラムや分析パラメータなどを印字するためのプリンタ、クロマトグラフ用検出器からの信号をディジタル量に変換するA-D変換器などで本体構成をしている。これらの各部品は、電気回路として1枚の基板にまとめられSBC基板(Single Board Circuit)として作られている。一方、データ処理装置の外部装置との接続がしばしば必要となり、クロマトグラフ周辺機器を含むシステム化が要求されるようになってきた。この目的のための各種インタフェースは本体の外部にラックを設け、そこに収納し使用する構造をとった。次のインタフェースが準備されている。

- (1) 2チャンネル装置用アナログ入力回路
- (2) データ通信(RS232C)
- (3) PANインタフェース(Private Area Network)
- (4) フロッピーディスク
- (5) ディジタルI/Oインタフェース

2チャンネル装置は、2台の分析機器(或いは2台の検出器)の信号を同時に取り込み、それぞれにデータ処理ができる装置である。データ通信(RS232C)は外部コンピュータなどに接続し、測定データを送り特殊計算又は報告書の作成、データの保存などに広く使用される。又外部コンピュータからのデータをD-2000形で受信することもできる(双方向のデータ通信が可能)。PANインタフェースは、D-2000形とPANインタフェースを内蔵する周辺装置を接続し、D-2000形の指令で他の機器を作動するためのネットワークを作るものである。これにより他の機器の動作条件などをD-2000形に転送し、プリンタで確認することができる。フロッピーディスクはD-2000形で取り込んだクロマトグラムや処理結果のデータを保存するときに使用する。又このデータはD-2000形に読み戻し再測定することができ、条件を変えて波形処理をしたりすることもできる。

* 日立製作所那珂工場 光学装置設計部

**日立製作所那珂工場 ソフト設計部

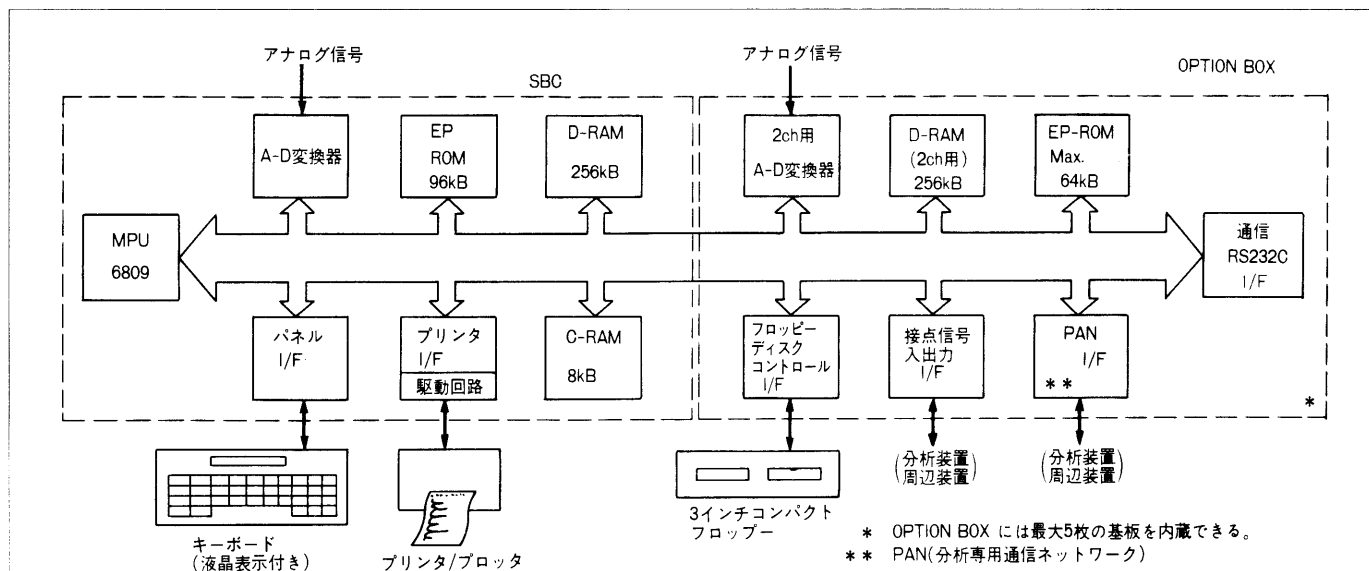


図2 D-2000形データ処理装置構成図

デジタルI/Oインタフェースは、D-2000形と自社製品又は他社製品などを接続しシステムを組んで分析を行うときに使用する。例えば、第一トサンプラーと組んでオートサンプラーからのvial no.を印字することもできる（但し、BCDでvial no.を転送可能なオートサンプラーの場合）。

3. 主な特長

(1) クロマトグラムの生データを多数記憶できる。

大容量（256kバイト）の記憶メモリを使用しているのので、フロッピーディスクなしで、約7時間分の生データの記憶ができる（但し、データのサンプリングピリオドを0.8秒としたとき）。

(2) 濃度計算用データを約6000ピーク分記憶することができる。

オートサンプラなどと連動し、データを連続的に記憶することができる。このデータは電源をOFFにしないかぎり消えないので、翌日に条件を変えて再計算することもできる（1分析のピーク数を60とすると、100分析までの記憶ができる）。

(3) ディスプレイとして液晶表示器を用い、パラメータ入力の対話化をはかり、操作をしやすくした。液晶表示器は2桁で80文字の液晶表示器を使用しており、表示内容も見やすく、操作が便利になった。

(4) 成分の同定をより正確なものにした。

標準試料の測定時、絶対保持時間のずれを補正し、自動的に成分テーブルの保持時間を正しい値に設定しなおす。又、標準試料を実試料の各々に適した同定法を採用した。

(5) 分析目的に応じた特殊計算を採用した。

① 実試料の測定値より各成分の平均値を計算する。

② 分析結果の自己診断を行う。

2種類の計算方法があり、それぞれ品質管理などに有効な計算方法である。

(6) ドリフトの多い分析のとき、バックグラウンドを差引き、ベースラインを補正した計算ができる。

ベースラインドリフトの大きい分析などに有効な計算方法である。

(7) 時間分割による区間面積計算ができる。

液体クロマトグラフのGPCやガスクロマトグラフの蒸留ガスクロ用の基礎データとなる時間分割による区間面積の計算をする。

(8) 操作の向上をはかった。

D-2000形では、初心者でも簡単に使用できるように、初心者用の操作キーを設け、対話を誘導するような操作方法を可能にした。

(9) データ処理をしないで、記録計のようにクロマトグラムを記録することができる。記録計よりも使い易く、機能も豊富にそろえた。

(10) プロッタを利用して、タイプライタのように記録紙上に印字ができる。操作パネル上の英・数字を使用し、タイプライタのように記録紙上に印字することができる。

(11) データ処理はオプションで2チャンネルまで拡張することができる。

(12) 外部コンピュータとのデータ通信ができる。双方向の通信が可能である（通信関係はオプション）。

(13) フロッピーディスクによりデータなどの保存ができる（オプション）。

3インチのコンパクトフロッピーを使用して、データの保存や記憶したデータをD-2000に読み出し、波形処理を再解析することができる。

(14) PANインタフェース接続によって、クロマトグラフ周辺機器を含むシステムが組める（オプション）。

PANインタフェースを内蔵する日立LC周辺装置とD-2000形を接続し、データ通信により分析の自動化などをはかることができる。

4. 応用例

図3に液体クロマトグラフによる多環芳香族の分析例を示す。クロマトグラムには各ピークの成分名及びベースラ

インを引いている。図4にガスクロマトグラフによるn-paraffineの分析例を示す。図5はベースライン補正計算(BACK SUBTRACT)の例を示す。分析試料は高級脂肪酸メチルエステルで、(1)は実試料のクロマトグラム、(2)は

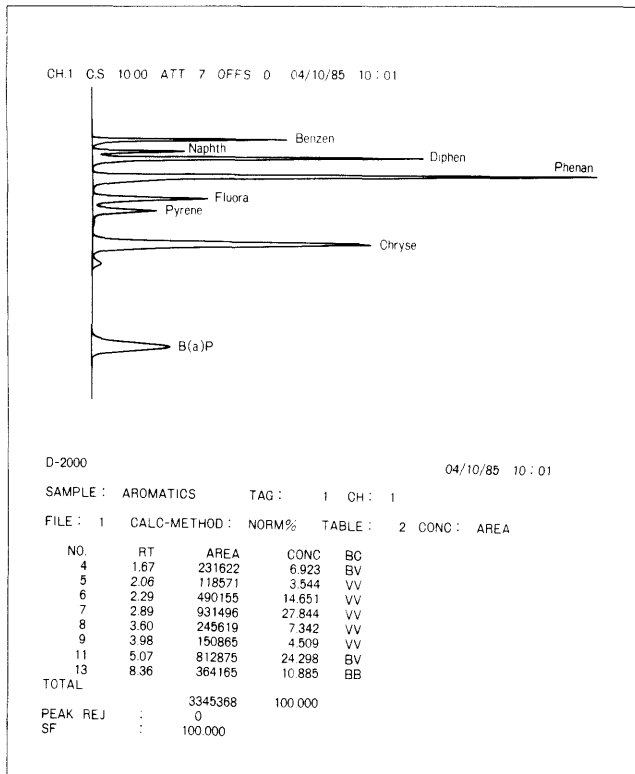


図3 多環芳香族の分析

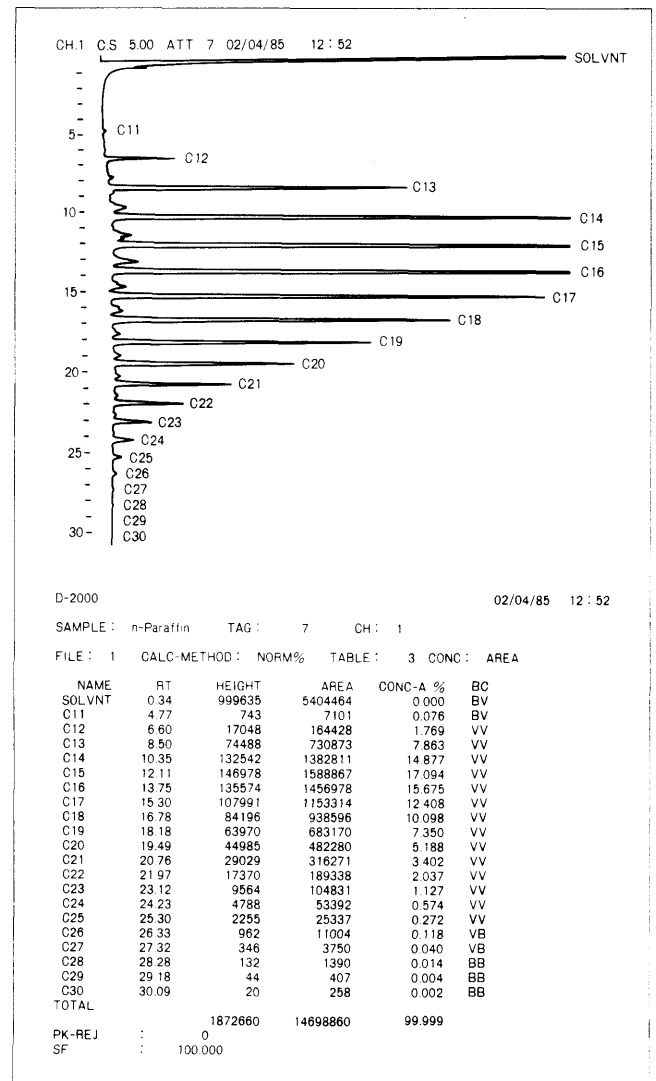
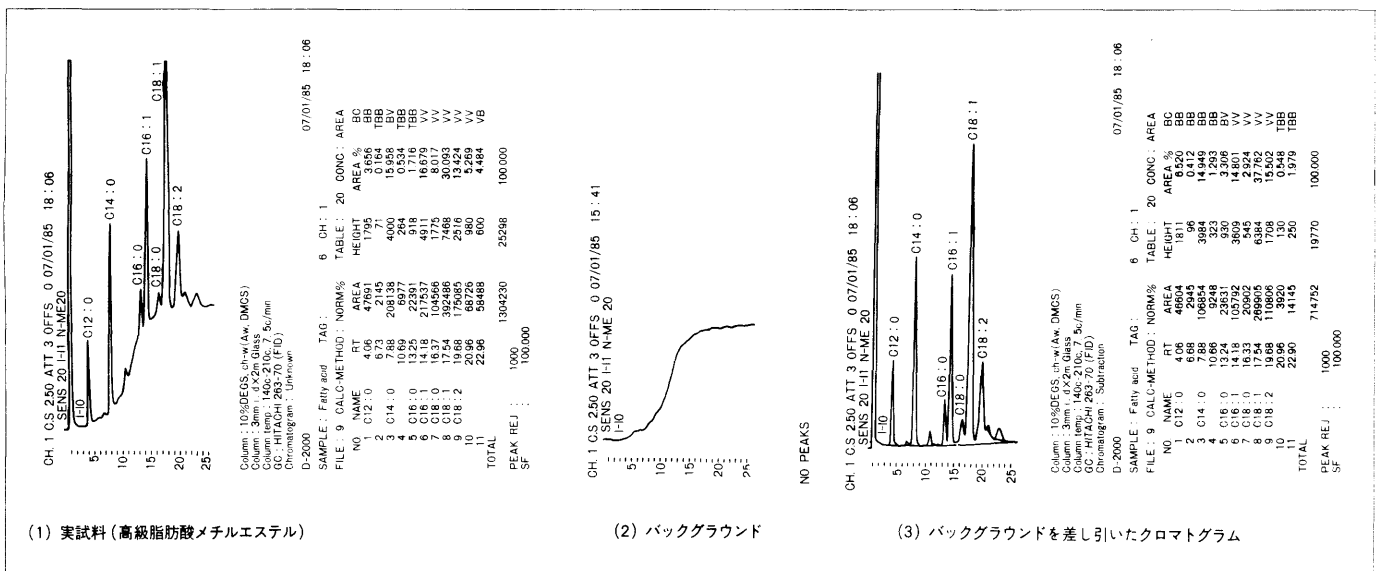


図4 n-Paraffineの分析例



(1)と同じ条件で測定したバックグラウンドのクロマトグラムであり、(1)と(2)はそれぞれ生データを記憶する。(3)は記憶した生データを読み出し、実試料からバックグラウンドを差し引いたクロマトグラムを作りデータ処理をした例である。ベースラインドリフトを補償し、水平なベースライン上で面積測定が可能になり、信頼度の高い計算結果が得られる。又この方法を利用すると、従来デュアルタイプの検出器でベースライン補償を行っていたが、シングルタイプの検出器を用い昇温分析ができることになる。

5. 結 び

D-2000形クロマトデータ処理装置における機能面、操作面の両面の特長について記載したが、小型・低価格も多くの用途において重要視されるところである。今後の課題としては、PANをはじめとする各種インタフェースを用いたクロマトグラフィトータルシステムが種々の分野で一般的なものとなるよう、用途別の応用データを蓄積していくことであろう。

Topics

日本分析化学会 第34年会開かる

日本分析化学会第34年会が、去る10月10日から13日の4日間神戸大学教養部において開催された。講演内容も多岐にわたり、総講演件数511件と大変盛

況であった。また付設の展示会においては、出品メーカー33社による最新の機器、試薬等の展示が行なわれた。

運営も円滑で各会場の案内もわかりやすく、実行委員の方々の御努力がうかがわれ大変気持ちよく参加できた年会であった。

講演内容では、液体クロマトグラフ分析、電極、クーロメトリ等の電気化学分析関連の発表が例年どおり多くあった。当社からは連名を含め5件の発表を行なった。ここ数年、発表件数の増加が著しいフローインジェクション分析については29件の発表があった。

これは昨年の33年会と比較して5件の増加である。内容的には測定再現性CVで0.1~0.2%という高精度分析や、接触分析法による微量分析等が注目された。また検出器についてみると、従来の分光光度計による吸光度測定のみならず、原子吸光度計、蛍光光度計、発光分析装置と多岐にわたり、更には固定化酵素カラム等を使用することによって、分離分析、多成分の同時定量分析の可能性も示され、FIAの将来性に大きな期待を持つことができた。

(黒石忠文 記)

日製産業株式會社

本社別館 電話 東京(03) 504-7211
水戸営業所 電話 水戸(0292) 32-0112
横浜営業所 電話 横浜(045) 671-5421
豊田営業所 電話 豊田(0565) 28-5179
大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
広島支店 電話 広島(082) 221-4514

札幌支店 電話 札幌(011) 221-7241
筑波営業所 電話 土浦(0298) 23-7391
新潟営業所 電話 新潟(0252) 41-3011
名古屋支店 電話 名古屋(052) 583-5841
四国営業所 電話 高松(0878) 62-3391
九州支店 電話 福岡(092) 721-3501

仙台支店 電話 仙台(0222) 64-2211
本郷営業所 電話 東京(03) 815-2051
北陸営業所 電話 富山(0764) 24-3386
京都営業所 電話 京都(075) 241-1591
岡山営業所 電話 倉敷(0864) 25-1316
沖縄出張所 電話 那覇(0988) 78-1311

<編集後記>

■ 本号は、高速液体クロマトグラフィー特集として編集いたしました。辻、前田先生には、化学発光検出HPLCによる生体成分の高感度分析について、牧野先生には、核酸の分析のためのHPLCについての総説を、奥山先生には、タンパク質の分析のためのHPLCについて、高萩先生には、カラムスイッチング法を利用して、生体試料中の薬物の完全自動HPLCを行った例について、それぞれ示唆に富んだ報告をして頂きました。

- 日立科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
科学機器営業本部 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(03) 504-7187

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS WINTER 1985 Vol.28 No.4

発行 昭和61年1月1日(年4回発行)
発行人 岡本匡史
編集人 永谷 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