

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

MAY / JUN. 1989
VOL.32 NO.3

U.D.C. 616-074 : 543.51

目次

質量分析特集

巻頭言

医学の領域における質量分析……
……………脊山洋右- 1

報文

ミコール酸含有糖脂質の構造解析
と免疫薬理学的生理活性……
……………矢野郁也- 3

アニリド誘導体化による脂肪酸の
LC/MS分析 ……………日下喬史-10

新しいイオン化法, 大気圧スプレー法
を用いた液体クロマトグラフィー/
質量分析法による不揮発性化合
物の分析……坂入 実 神原秀記-13

解説

日立LC/API-MSによる負イオンの
測定 ……………加藤義昭 沼尻陽子-15
R-1000シリーズ日立核磁気共鳴装置
笹瀨 仁 七字邦夫 田中保子-22

トピックス

U-3500/U-4000形日立自記分光光
度計 …………… 2
L-4250形日立UV-VIS検出器 …………… 9
L-5020形日立空気式カラムオープン - 2
AS-2000形日立液クロ用オートサンプラ-21
日立分光光度計/分光蛍光光度計用
データ処理ソフト Spectra Calc™……21
日立液体クロマトグラフデータ集の発
刊について ……………27
1988年度 秋季MRS学会開催さる ……27
第27回分析機器展/応スぺ開催さる -26
第8回日立MSユーザズカンファ
レンスを開催 ……………27
第40回ピッツバーグ会議展示会開
催さる ……………28
第4回行走トンネル顕微鏡/電子分
光国際会議(4th ICSTM/STS)
開催のお知らせ……………28

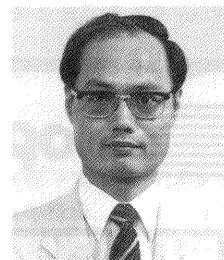
質量分析特集

巻頭言

医学の領域における質量分析

Mass Spectrometry in Medicine

脊山 洋右*



医学部を卒業して大学院に進んだ私が、質量分析計に初めて接したのは1968年のことであるから、もう既に20年以上の歳月が流れたことになる。当時はガスクロマトグラフと質量分析計は別々の分析装置として作られていた時代で、(株)日立製作所・那珂工場の片隅でF-6形ガスクロマトグラフの出口とRMU-6E形質量分析計をステンレススチールのパイプでつないで、ステロールのマススペクトルをとったときの印象が鮮明に脳に焼き付いている。

もちろんコンピュータによるデータ処理装置があったわけではなく、ビジュグラフから1マス毎に物差しで読みとって、測っていた時代で、×1, ×10, ×100の3段になったチャートと格闘した記憶がなつかしく思い出される。

それ以来今日までに、M-80形質量分析計を含めて5種類の質量分析計を使ってきた。格段の技術的進歩をまのあたりにしてきた中で、特に印象に残っている出来事が3つある。

1969年、アメリカに留学する機会に恵まれ、ボストンで2年間を過ごしたが、当時糖脂質の構造解析を行っていたので、早速MITのビーマン教授のところで糖のマススペクトルをとっていただいた。驚いたことには彼の研究室では数台の質量分析計が働いており、それぞれが巨大なIBMのコンピュータにつながれていた。日本ではビジュグラフと物差しでやっていた時代に、ここでは既に今でいうマスキロマトグラフィーという手法を用いていたのである。質量分析で得られる情報は純粋に物理的なものであるから、最もコンピュータ向きのデータといえるが、前年に体験した日本との格差にため息をついた次第である。その後、機械そのものの制御もコンピュータで行われるようになり、それが今日の質量分析の隆盛を招いたわけであるが、ダイヤルを一つ一つ回して調整する体験をしてきたということは、必ずしも徒勞ではなかったような気がする。質量分析の原理を理解し、新たな応用を考える上では、現在のように高度にコンピュータ化されたブラックボックスよりも、当時の機械は教育的であったといえよう。現場からはなれ始めた現在でも、質量分析の話についていけるのは原始的な機械と取り組んできたおかげである。

* 東京大学医学部 教授・医博

1975年に東大医学部の特別事業として、「先天性代謝異常」というプロジェクトが発足して、その一環としてGC/MSが導入された。以来十数年にわたって先天性代謝異常症の診断を中心に研究を進めてきた。脳髄黄色腫（CTX）の診断もその一例で、血清中のコレステロールをマスフラグメントグラフィーの手法で測ろうというものである。生体試料中には多数の物質が存在するので、この方法は実に有効な手段である。ところで、質量分析の臨床医学領域での応用を考えると、2つの特性が要求される。第1は多数検体を処理することであり、第2は臨床医でも扱えるような簡便さと維持管理の容易さである。多くの場合、扱う質量範囲はたかだかm/z 600位までで、高質量領域まで測定したり、高分解能ということは臨床では必ずしも必要ではない。この点から見ると、わが国でつくられている質量分析計は反対方向を目指しているように思われる。高性能な万能機がもてはやされているが、臨床用の安価な単能機があれば利用範囲は格段に広がるような気がしてならない。

第3の節目はGC/MSからHPLCへの脱却である。医学部にあって、日常的な分析を行う上では現在の質量分析計では小回りが効かないことは先に述べた。血清コレステロールの測定も、マスフラグメントグラフィーのおかげで臨床的に行えるようになったとはいえ、「牛刀鶏を割く」の感を拭えない。その点ではHPLCは手ごろであり、維持管理も容易である。そこで我々もカラムの選択とベンゾイル化に

よって、質量分析計と同等の感度で測定できる分析系を開発し、数年前からはHPLCによる分析に切り替えてきた。質量分析計でなければ出来ない分析もあるだろうが、他の方法で出来るものはなるべくそちらに乗り換えるという柔軟さも必要であろう。

ところで最近ではLC/MSが実用化され、市販されたと聞く。まだ実際に手元で使ったわけではないので細かいことは分からないが、MSの部分が簡便化されれば再び臨床応用の途も開けてこよう。技術の進歩に際限はないということをも改めて認識させられたが、ユーザーとしては頼もしい限りである。

筆者略歴

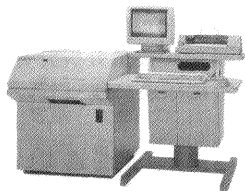
脊山洋右（せやま ようすけ）

東京大学医学部教授 医学博士

昭和40年	東京大学医学部医学科卒業
昭和44年～46年	米国ハーバード大学医学部及びマサチューセッツ総合病院に留学
昭和47年	東京大学大学院医学系研究科修了 東京大学医学部助手
昭和53年	日本生化学会奨励賞受賞
昭和54年	東京大学医学部助教授
昭和58年	東京大学医学部教授、現在に至る
昭和63年	井上學術賞受賞

Topics

U-3500/U-4000形 日立自記分光光度計



バイオテクノロジー、エレクトロニクスの最先端技術は加速的に進行し、寸時もとどまるところを知らないのが現状です。分光光度計は、これまで液体試料の吸収測定を主な対象として発展してきましたが、最近では光産業、半導体製品、新素材開発などの目覚ましい高度技術の発展を遂げている分野にも使用されるようになり、それに付随して分析技術の高精密化、高い信頼性が要求されるようになりました。

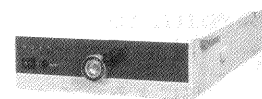
日立製作所では、最新技術を結集して、このような時流にそった新鋭機、

U-3500/U-4000形ダブルモノクロ自記分光光度計を商品化しました。

分光光度計としては、世界で初めての冷却形の近赤外検知器（PbS）を採用し、測定波長範囲を3,200 nmまで高感度で拡大、SN比も従来よりも約一けた向上させるなど、比類のない性能向上を図っています。一方、日立の誇るAI日本語変換機能付きパーソナルコンピュータの結合によって、日本語表示、カラー表示、マウス操作によるマルチウインドウ表示を採用して操作性の向上を図り、また超大形試料室を標準搭載し、多様な形状にも余裕のあるスペース空間を活用できるようにした、従来にない省スペース縦形・フロア置きのざん新デザインと、オペレータへの細かい気配りを図った分光光度計です。

L-5020形日立空気式 カラムオープン

液体クロマトグラフ用の温風循環方式カラムオープンです。小形で、検出器の上に載せて使用可能なため、液体



クロマトグラフシステム全体のコンパクトネスに影響を与えません。インジェクションバルブのボデーを含めて温度制御することができます。またガス検知器、サーモスタット内蔵により、安全性にも十分な対策が施してあります。イオンクロマトグラフシステムにも最適です。

■ 主な仕様

取付可能カラム：長さ300 mm以内、
径25 mm以内のすべてのカラム
温度設定範囲：室温 + 15℃ から 99℃まで
温度設定正確さ：カラム位置で ± 1.5℃
サイズ：幅260 mm、奥行430 mm、
高さ75 mm
質量：6.5 kg
その他：L-3720形電導度検出器用
電導度セル収納可能

報 文

ミコール酸含有糖脂質の構造解析と免疫薬理学的生理活性

Structure Analysis and Immunopharmacological Activities of Mycolic Acid-Containing Glycolipids

矢野 郁也*

(平成元年 2 月 21 日受理)

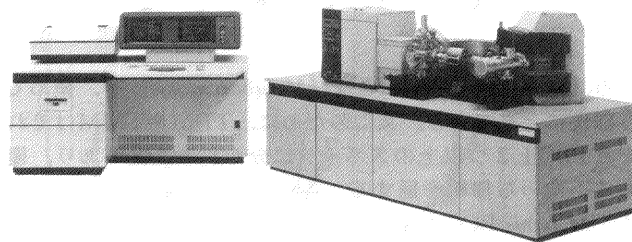
1. 緒 言

Mycobacterium や *Nocardia*, *Rhodococcus* 等の Actinomycetes に属する細菌細胞壁の最も大きな特徴は、天然では疎水性の極めて強い長鎖脂肪酸である“ミコール酸”を含む点である^{1)~4)}。これらの細胞壁脂質成分は、抗酸菌表層の物理化学的性質（抗酸性や疎水性）を特徴づけているばかりでなく⁵⁾、免疫薬理学的にも、アジュバンド活性⁶⁾肉芽腫形成能⁷⁾、マクロファージ活性化能、抗腫瘍性⁸⁾等種々の生理活性を有しているが、一方では又 *Mycobacterium* の“cord factor” (trehalose 6, 6'-dimycolate) のようにマウスに致死毒性を示す成分も含まれている。cord factor は、かつて人型結核菌の産生する毒性糖脂質としてその病原性との深い関わり合いが注目されたが⁹⁾、実際にはヒトに病原性を持たない多数の *Mycobacterium* 属菌種はもちろんのこと、*Nocardia* や *Rhodococcus* 等の土壌細菌細胞壁にも広く分布することが明らかとなつて¹⁰⁾、毒性よりもむしろ免疫反応と関連した各種生理活性の解析に好適な材料と考えられつつある^{6)~8)}。そこで我々は、*Mycobacterium* をはじめ *Nocardia* や *Rhodococcus* 及び *Gordona* 等近縁の各種放線菌から得られるミコール酸含有糖脂質を単離して、親水性部分（糖鎖）及び疎水性部分（ミコール酸分子種）の構造を明らかにするとともに、それらが生体防御反応（広義の免疫反応）にどのように寄与しているかを、主としてマウス及びラットにおける肉芽腫形成能を中心に検討してきた^{10)~15), 19)}。本稿では特にミコール酸分子種や subclass 組成の分析と、ミコール酸含有糖脂質の構造・活性相関について紹介する。

2. 材料と方法

Mycobacterium の迅速及び遅速発育菌、*Nocardia* 及び *Rhodococcus* の各菌種は、1 % glucose を含む PGY 培地 (pH 7.0) に 30 °C、48~120 時間振盪培養し、得られた菌体から 20 倍量のクロロホルム、メタノール (2 : 1, v/v) を用いて脂質を抽出した。各脂質の分離は、Silicagel の薄層クロマトグラフィーを用いて行い、クロロホルム・メタノール・アセトン・酢酸 (90 : 10 : 6 : 1, v/v) により展開して糖脂質を単離した。TLC 上の脂質は、ヨード発色後、ゲルから回収し、単一スポットとなるまで精製純化したのち、各種分析及び生理活性の解析に供した。ミコール酸の分析は n-ヘキサン・エーテル (4 : 1, v/v) を溶媒とする TLC でメチルエステルの各 subclass を分離後、BSTFA により TMS 化し、GC/MS (Hitachi, M-80B), 2 % OV-101, φ 3 mm × 0.4 m ガラスカラム, 200~340 °C) に注入して各

分子種を同定定量した^{16)~18), 21), 22)}。また各糖脂質の糖部分の解析は、メタノリシス後得られる単糖のメチルグリコシドの TMS 誘導体の GC/MS 分析により、また oligosaccharide はアルカリ水解後得られた糖の TMS 誘導体の GC/MS 分析によって行った。ミコール酸アシル基の結合位置及び



M-80B 形日立 GC 質量分析計

数の決定のために BF₃-エーテル触媒存在下でジアゾメタンにより糖脂質を緩和に permethylation を行い、メタノリシス後、NaBH₄還元により得られるアルジトールアセテートを GC/MS 分析に供した。マウス肉芽腫形成能は、ICR 系マウス (♂, 20 g) を用いて調べ、Freund の不完全アジュバンド存在下に糖脂質 10~300 µg を加えて W/O/W ミセルを調製し、尾静脈より注入後、1~4 週の肺・脾・肝重量から各臓器の index を算出した (Index = 臓器重量 × 100 / 体重)。また各臓器の Hematoxylin-Eosin 染色により組織学的所見を観察し、一部は超薄切片により電顕レベルでの肉芽腫組成を観察した^{11), 15), 19)}。

3. 結 果

(1) *Mycobacterium* 属のミコール酸含有糖脂質

図 1 に示したように、slowly growing 及び rapidly growing に属する *Mycobacterium* 属の各菌種は、一般に主なミコール酸含有糖脂質として trehalose dimycolate (cord factor, TDM と略す) 及び trehalose monomycolate (TMM と略す) を主成分として含むが、迅速発育菌ではこれら以外に glucose mycolate (GM と略す) が含まれ、TLC 上ミコール酸含有糖脂質が 3 種以上存在するのが普通である。これらの糖脂質のミコール酸は、菌種により subclass 組成が異なるのみならず、図 2 に示すように GLC により各分子種が明瞭に分離する。*Mycobacterium* では C₇₂ 辺りが中心のもの (*M. diernhoferii*) から C₇₄ が中心となるもの (*M. aurum* 等)、C₇₆ 辺りが中心のもの (*M. fortuitum* 等)、C₈₀ 辺りが中心となる

* 大阪市立大学医学部 細菌学教室 教授・医博



図1 Mycobacteriumの各菌から抽出して得られるミコール酸含有糖脂質

CF: cord factor (trehalose dimycolate, TDM)

TMM: trehalose monomycolate

CL: diphosphatidylglycerol

薄層クロマトグラム: Analtec社製Uniplate.

展開溶媒: chloroform-methanol-acetic acid-acetone (90:10:1:6, v/v)

発色: 50% H_2SO_4 spray後, 180 °C 20分加熱

もの (*M. avium*, *M. bovis* 及び *M. tuberculosis*) 等, 極めて多様性にとんでいる。又このために, TDMやTMMはそれぞれTLC上2つ以上のスポットに分かれることがあり, 極めて不均一な様相を呈する。各ピークの質量分析の結果から, *M. bovis* BCGでは, α -ミコール酸の主な分子種は $C_{78:2}$ であり C_{72} から C_{82} に及ぶが, 人型結核菌*M. tuberculosis* H₃₇ RV株でこれよりさらに長く, C_{74} から C_{86} に及ぶ長鎖のものからなっていた^{(21), (22)}。また α 位の側鎖は, (B) 又は (B-29) イオンの m/z 値から, C_{28} のもの, C_{22} のもの及び C_{24} のものが区別された。*M. fortuitum*の $C_{72, 74, 76}$ 及び*M. tuberculosis*の $C_{82, 84, 86}$ の α -ミコール酸分子種のマススペクトルを図3及び図4に示す。これらの総炭素数 C_{70} 以上で C_{26} 又は C_{24} の α 側鎖を有するミコール酸含有TDMは, マウス及びラットに対して極めて強い肉芽腫形成能を有し (図5), BCGのTDMでは300 μg /匹でlung indexがcontrolの5~7倍にも達した。

(2) *Rhodococcus* subcluster 1-A群の糖脂質

N. rubra-M. 1 や *N. corallina*, *R. rhodochrous*, *R. sp.* 13165, *R. sp.* 13161等の菌種の糖脂質は, 一般に, 総炭素数30~50, α -unit C_{12-16} のやや短鎖のミコール酸を含み, その主なものはglucosemycolate (GM), TDM及びTMMであった。これらの糖脂質の構造式を図6に示す^{(11)~(14)}。又これらの各糖脂質のミコール酸TMSメチルエステルのGLCを図7に, [M-15] イオンをモニターして得られるマスプロットグラムを図8に示した。いずれも $C_{44, 46}$ を中心に C_{38} ~ C_{50} に至る偶数酸及び奇数酸が明瞭に分離し, 各組成が明らかとなった。また一方, *N. rubra*-M. 1株のglucose mycolate (GM) をintactなままTMS化し, GC/MS分析を行なった結果を図9に示した。このようなintactなglucose mycolate誘導体でも, GC/MSによりそのミコール酸及び糖組成は明瞭に同定された。これらのうち C_{40} 以上の長鎖のミコール酸を含有する*N. rubra*その他の菌のGM及びTDMには, いずれも

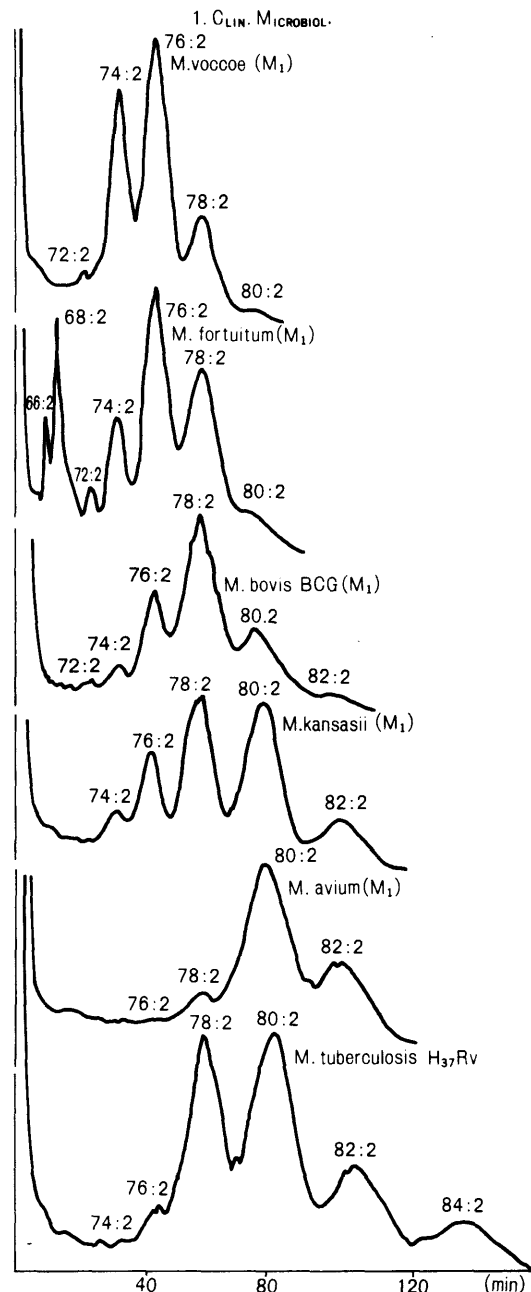


図2 各種ミコバクテリアの α -ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のガスクロマトグラム

M. vaccae, *M. fortuitum*, *M. bovis* BCG, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. tuberculosis* H₃₇Rv (上から)

明らかな肉芽腫形成能が認められたが, これに対して C_{30} ミコール酸を構成成分とする*R. sp.* IFO 13165株のGMには殆んど肉芽腫形成能が認められなかった^{(12), (14)}。

(3) *Rhodococcus* subcluster 1-C群の糖脂質

R. rubropertinctus, *R. terrae*等subcluster 1-C群の菌種は, 糖脂質組成が複雑でTDMやGMの他これらよりRf値の高い(極性の低い), 未知のミコール酸含有糖脂質を含んでいた (図1)^{(14), (15)}。これらの菌は一般にミコール酸組成も複雑で, C_{54-62} triene~tetraeneミコール酸を主成分とし, いずれも強力な肉芽腫形成能を示した^{(14), (15)}。特に*R. terrae*

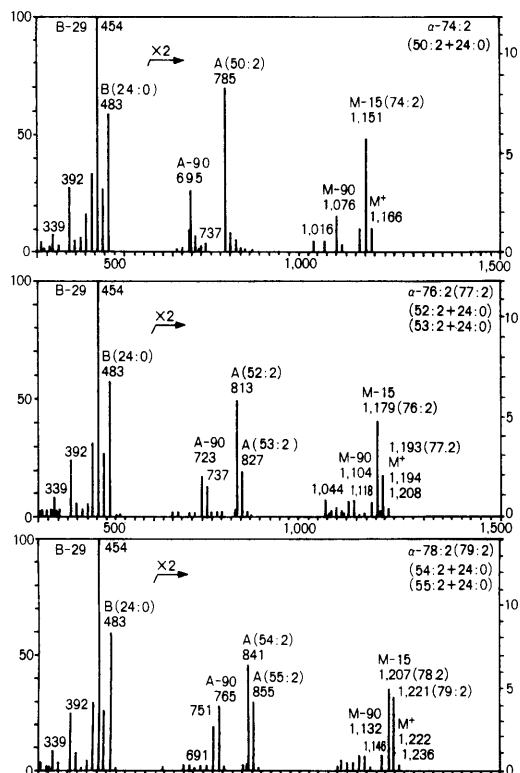


図3 *M. fortuitum* α-ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のマススペクトルと開裂パターン

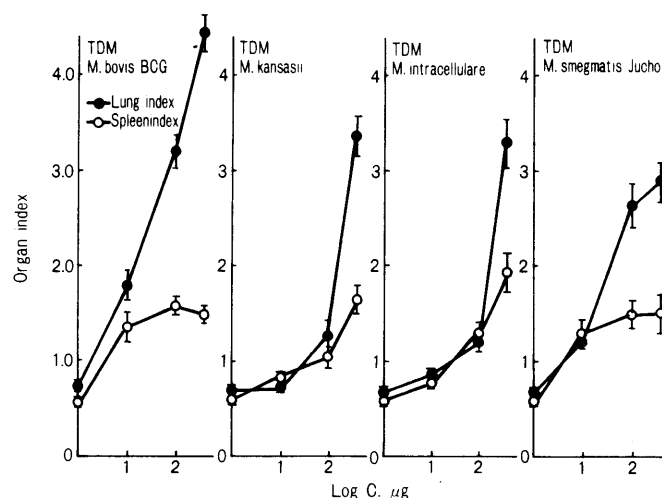
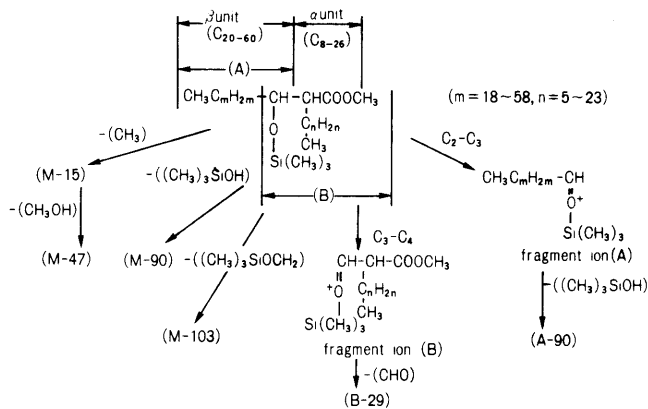


図5 *Mycobacterium*の各菌種から得られるcord factor (TDM) trehalose 6-6'-dimycolateによるマウス肉芽腫形成

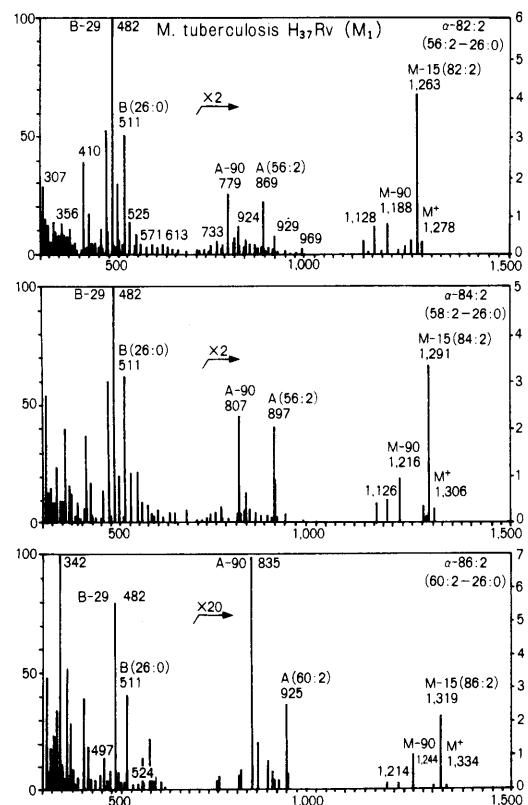


図4 *M. tuberculosis* α-ミコール酸メチルエステルTMS誘導体のマススペクトル

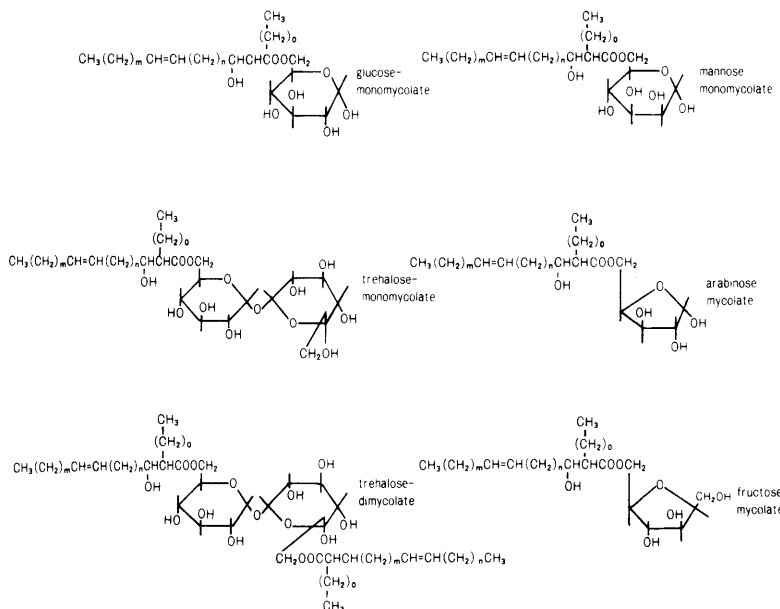


図6 *N. rubra*の産生する代表的なミコール酸含有糖脂質の構造

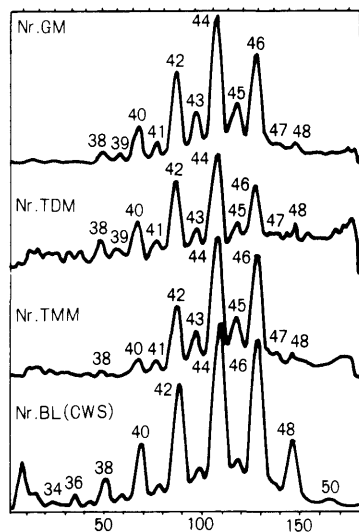


図7 *N. rubra*から得られる各種ミコール酸含有糖脂質のミコール酸メチルエステルTMS誘導体のガスクロマトグラム。数字は炭素数を示す。

GM: glucose mycolate;
TDM: trehalose dimycolate
TMM: trehalose monomycolate;
BL: cell wall bound lipid.

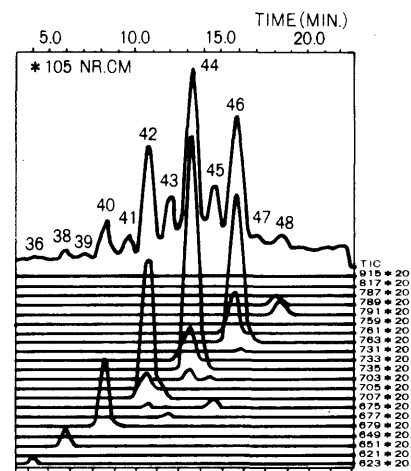
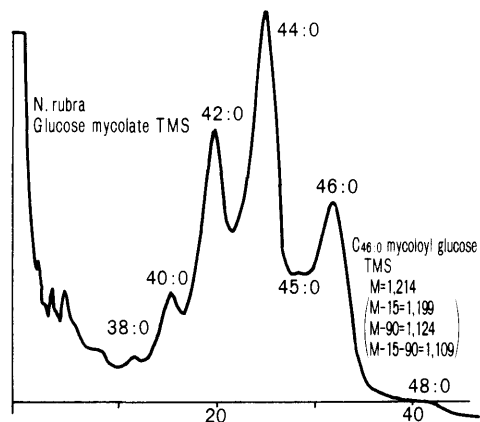


図8 *N. rubra*から得られるglucose mycolate由来のミコール酸メチルエステルTMS誘導体のマスキロマトグラム [(M-15)⁺イオンをモニターしたもの]



Mass fragmentation pattern of monohexosyl monomycolate (TMS) by EI/MS

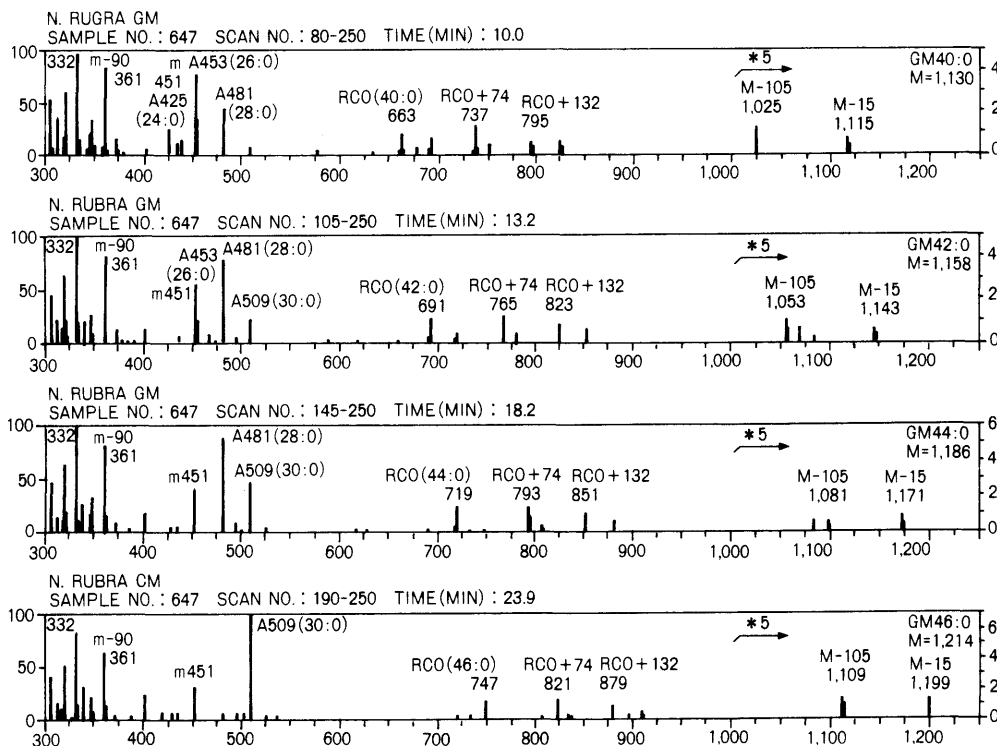
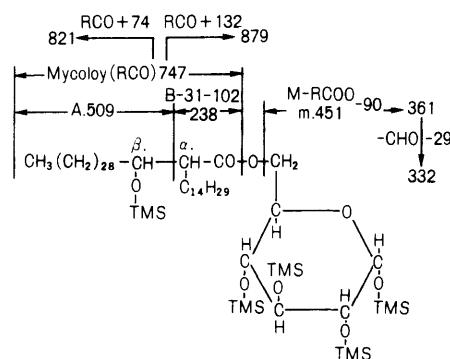


図9 *N. rubra*のglucose mycolateをTMS化し、GC/MS分析を行ったときのガスクロマトグラムと各分子種のマススペクトル

70012 株の炭素数 C_{58} , α -unit C_{18} ミコール酸を含むTDMは、強い肉芽腫形成能を示すとともにマウスに顕著な毒性を示した(図10)。同様に $N. polychromogenes$ の C_{62} ミコール酸含有TDMが強力な肉芽腫形成能を示したにも拘らず、本菌の産生するTDMとRf値の近接した未知の酸性糖脂質は全く肉芽腫形成能を示さず、親水性部分の構造も肉芽腫形

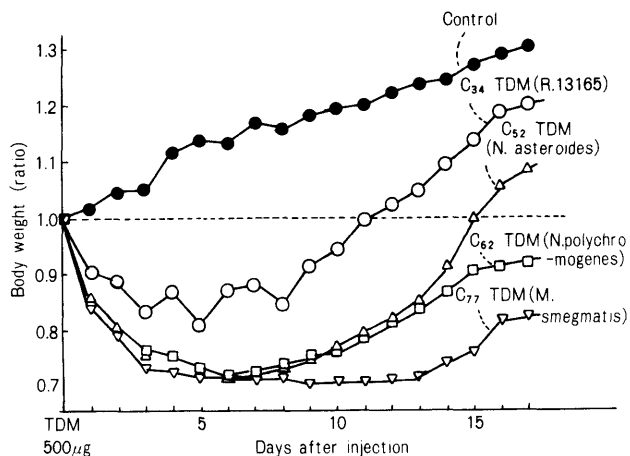


図10 *Mycobacterium*, *Nocardia*及び*Rhodococcus*の“cord factor”(TDM)のマウスに対する毒性の比較を示す。(図中の数字はミコール酸の平均炭素数を示す)。

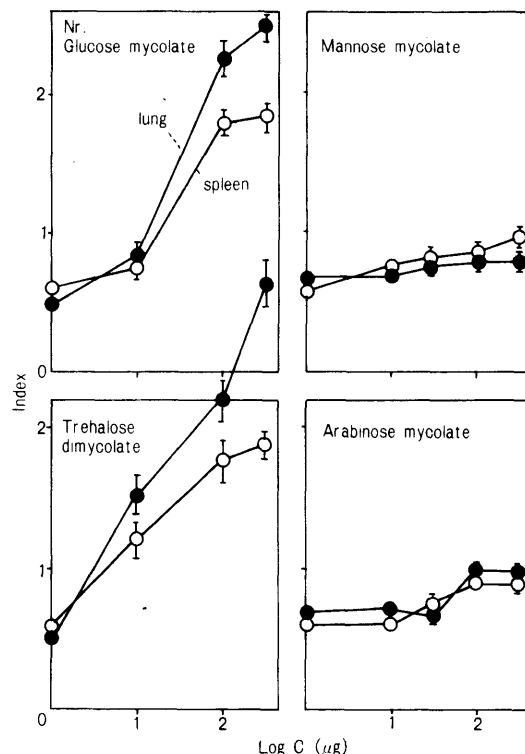


図11 *N. rubra*の産生する各種ミコール酸含有糖脂質によるマウス肉芽腫形成

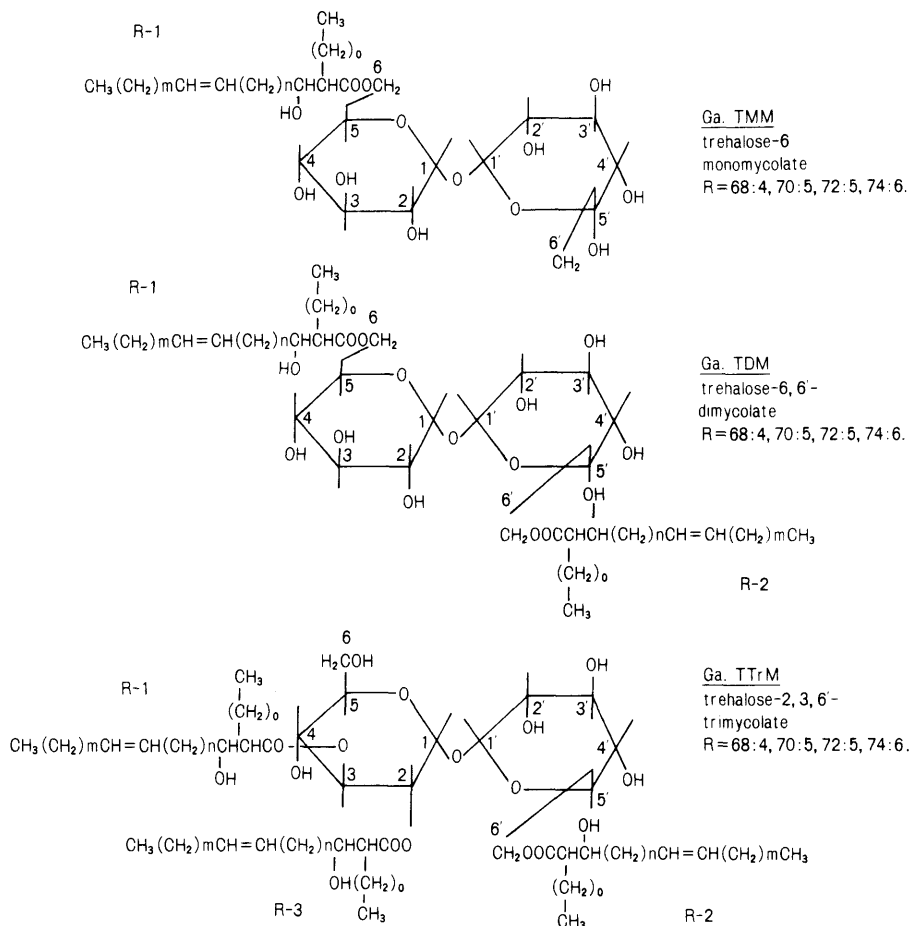


図12 *R. aurantiacus*(*G. aurantiaca*)の代表的なミコール酸含有糖脂質の構造

成に深く関与していることが示唆された¹⁴⁾。

(4) 新しいミコール酸含有天然糖脂質

*Nocardia*や*Rhodococcus*等の土壌放線菌類は、炭素源としてglucoseのほか、mannose, fructose, arabinose, maltose等種々の糖を利用して発育、増殖することが可能である。*N. rubra*-M・1株を炭素源をかえて培養したときに得られる種々の糖脂質のうち、mannose mycolate, arabinose mycolate及びfructose mycolateを単離し、これらの構成糖及びミコール酸の構造を解析した。又これらの糖脂質の免疫薬理学的生理活性をglucose mycolate (GM) や、trehalose dimycolate (TDM)と比較したところ、ミコール酸の分子種組成はほぼ同一でC₄₄又はC₄₆が主であったにもかかわらず、肉芽腫形成能は極めて弱かった(図11)。このことから、ミコール酸含有糖脂質の肉芽腫形成能には、ミコール酸部分の構造のみならず、糖部分も密接に関連し、glucoseやtrehaloseの6(又は6')エステルが特異的に必要なことがみいだされた。又一方、好低温性抗酸菌である*Gordona aurantiaca*からは、従来全く報告のなかった非対称エステル糖脂質であるtrehalose 2・3・6'-trimycolateを分離し同定した²⁰⁾が、この糖脂質はC_{72:4}及びC_{74:5}の高度不飽和ミコール酸(C_{22:1}又はC_{20:0} α unitを有する。)を含有し¹⁸⁾、TDMとほぼ同程度の強い肉芽腫形成能を示した。これに対して、同菌のTMMやtrehalose tetramycolateは活性が低くかった。図12にこれらの新しい糖脂質の構造を示し、図13にマウスにおける肉芽腫形成能を比較した結果を示す。又図14には*Mycobacterium*や*Nocardia*の各菌種から得られる各炭素数の異なるミコール酸を構成成分とするTDMの肉芽腫形成能を比較して示した。この結果、ミコール酸の炭素鎖長はマウスにおける肺肉芽腫形成能に密接な関連を有し、炭素鎖長の長いものほど顕著な肺肉芽腫形成能を示すことが明らかとなった。

4. 考 察

以上の結果から、*Mycobacterium*とその近縁菌*Nocardia*, *Rhodococcus*及び*Gordona*には、C₃₀からC₈₀に及

ぶ広範囲なミコール酸を構成成分とする糖脂質が存在し、その免疫薬理学的生理活性は構造に応じて大きく変化することが明らかとなった。C₃₀~C₈₀のミコール酸分子種は全てメチルエステルのTMS誘導体としてGC/MSが可能であり、intact糖脂質の分析結果と併せて親水基及び疎水基の構造を明らかにすることができた。その結果、マウスに対しては(1)総炭素数40以上のミコール酸残基を1つ以上含む中性糖脂質で、グルコース又はトレハロースを親水成分として

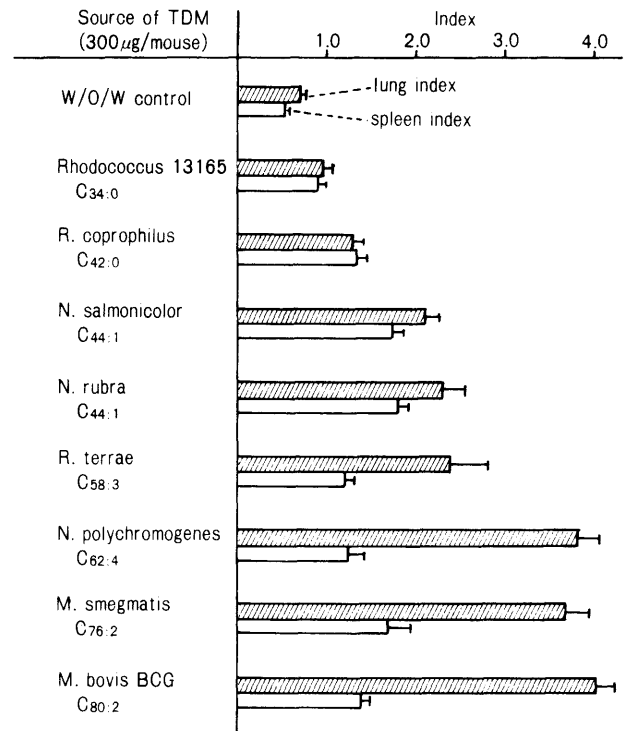


図14 ミコール酸分子種組成の異なる各種trehalosedimycolate (TDM) のマウス肺及び脾肉芽腫形成能

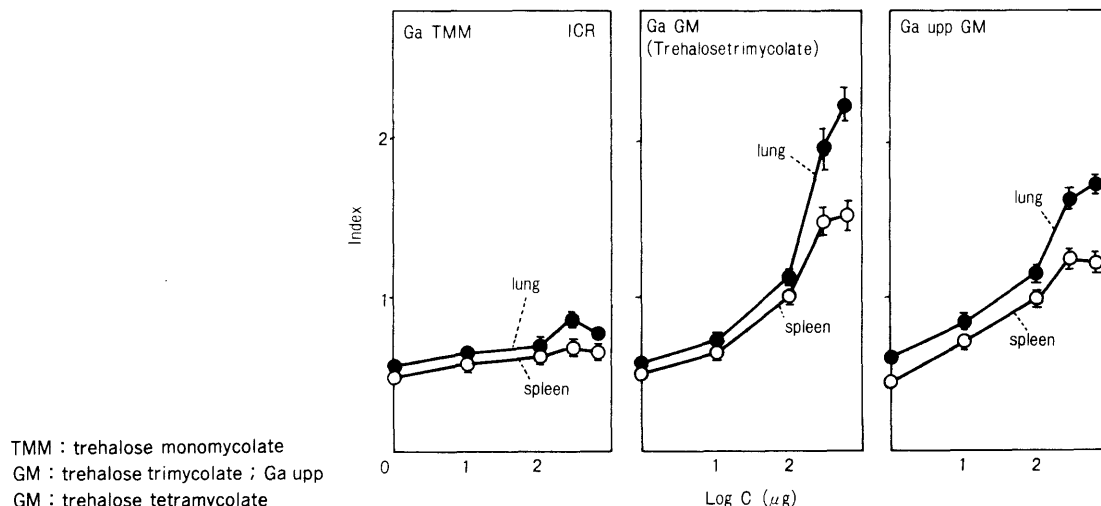


図13 *R. aurantiacus*の代表的なミコール酸含有糖脂質によるマウス肉芽腫形成

有するものが強力な肉芽腫形成能を有すること、又(2)このなかでミコール酸残基が2つ又は3つのものが、1個又は4個のものと比べてより高い活性を有することも明らかとなった。さらに、(3)従来ミコール酸含有糖脂質の生理活性は、ミコール酸部分の構造特異性のみに依存していると考えられていたが、糖鎖を置換した糖脂質mannose mycolate, fructose mycolateやarabinose mycolateの肉芽腫形成能が低かったことから、親水基(糖部分)の構造もこれらに密接に関与していることは明らかで、肉芽腫形成機構を考慮するに際して興味深い。又このようなミコール酸炭素数やアシル基の数及び糖部分が入れ替わったとき、致死毒性にも変化がみとめられることから、天然ミコール酸糖脂質の中にも毒性の少ないアジュバント物質や抗腫瘍性物質として有用なBiological Response Modifiersが見いだされる可能性があり、今後系統的な解析を行ないたいと考えている。

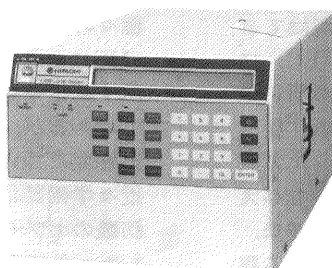
参考文献

- 1) Asselineau, J., "The Bacterial Lipids", Hermann, Paris, 1966.
- 2) Lederer, E., Chem. Phys. Lipids 1, 294-315, 1967.
- 3) Goren, M.B., Bacteriol. Rev. 36, 33-64, 1972.
- 4) Asselineau, C. and Asselineau, J., Progress in the chemistry of fats and other lipids 16, 59-99, 1978.
- 5) Barksdale, L. and Kim, K.-S., Bacteriol. Rev. 41, 217-372, 1977.
- 6) Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J. F. and Wietzerbin, J., Mol. Cell. Biochem. 7, 87-104, 1975.
- 7) Bekierkunst, A., Levij, I. S., Yarkoni, E., Vilkas, E., Adams, A. and Lederer, E., J. Bacteriol. 100, 95-102, 1969.
- 8) Bekierkunst, A., Wany, L., Toubiana, R. and Lederer, E., infect. Immun. 10, 1044-1050, 1974.
- 9) Bloch, H., J. Exp. Med. 91, 197-217, 1950.
- 10) Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M., J. Gen. Appl. Microbiol., 17, 329-334, 1971.
- 11) Yano, I., Tomiyasu, I., Kitabatake, S. and Kaneda, K., Acta Leprologica 95, 341-349, 1984.
- 12) Yano, I., Tomiyasu, I., Kaneda, K., Gondaira, S., Kato, Y., Sumi, Y., Kotera, S., Sugimoto, N. and Sawai, H., Proceedings for The 20th Joint Conference on Tuberculosis (The US-Japan cooperative medical science program), p.50-74, 1985.
- 13) Kaneda, K., Sumi, Y., Kurano, F., Kato, Y. and Yano, I., Infect. Immun., 54, 869-875, 1986.
- 14) 沢井弘行, 角由貴江, 蔵野聡子, 権平 栄, 加藤敬香, 富安郁子, 今泉貞雄, 金田研司, 矢野郁也, 薬学雑誌, 107, 37-45, 1987.
- 15) 蔵野聡子, 杉本信子, 角由貴江, 沢井弘行, 加藤敬香, 金田研司, 矢野郁也, 薬学雑誌, 107, 46-52, 1987.
- 16) Yano, I., Kageyama, K., Ohno, Y., Masui, M., Kusunose, E., Kusunose, M. and Akimori, N., Biomed. Mass Spectrom., 5, 14-24, 1978.
- 17) Toriyama, S., Manui, M. and Yano, I. FEBS LETTERS, 95, 111-115, 1978.
- 18) Tomiyasu, I. and Yano, I., Eur. J. Biochem., 139, 173-180, 1984.
- 19) Kaneda, K., Yano, I., Sumi, Y., Kotera, S., Kato, Y., Dan, C., Motomatsu, K. and wake, K., In "Cells of the hepatic sinusoid, vol. I" (Kirm, A. et al. eds. Kupfer cell foundation), p.421-426, 1986.
- 20) Tomiyasu, I., Yoshinaga, J., Kurano, F., Kato, Y., Kaneda, K., Imaizumi, S. and Yano, I. FEBS LETTERS, 203, 239-242, 1986.
- 21) Kaneda, K., Naito, S., Imaizumi, S., Yano, I., Mizuno, S., Tomiyasu, I., Baba, T., Kusunose, E. and Kusunose, M. J. Clin. Microbiol., 24, 1060-1070, 1986.
- 22) Kaneda, J., Imaizumi, S., Mizuno, S., Baba, T., Tsukamura, M. and Yano, I., J. Gen. Microbiol. 134, 2213-2229, 1988.

Topics

L-4250形 日立UV-VIS検出器

本器は、本格的な液体クロマトグラフ用インテリジェント検出器です。コントローラなしで、波長、オートゼロなどのタイムプログラムが可能です。重水素ランプ、タングステンランプの同時点灯モードがあるため、紫外域と可



視域にまたがって波長プログラムを行ったり、紫外域から可視域に波長を移動して、待ち時間なしに測定を開始することが可能です。フローを停止させて、スペクトルを記憶することができますが、この場合にも紫外域から可視

域にまたがったスペクトル記憶が可能です。また、PAN, RS-232C, 接点の各種インタフェースが標準装備されており、システム構築が容易です。

もう一つの大きな特長は、基本性能で優れることです。特にノイズレベルが低く、 10^{-5} AUオーダーのピークも検出可能です。

■ 主な仕様

- (1) ランプ: D_2 , Wまたは両者同時点灯
- (2) 波長範囲: 195~700 nm
- (3) ノイズレベル: $\pm 1.25 \times 10^{-5}$ AU (時定数 0.5秒)
- (4) 波長プログラム: 紫外域, 可視域または全波長域
- (5) スペクトル: 紫外, 可視または全波長

アニリド誘導体化による脂肪酸のLC/MS分析

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Fatty Acids as Their Anilides

日下 喬史*

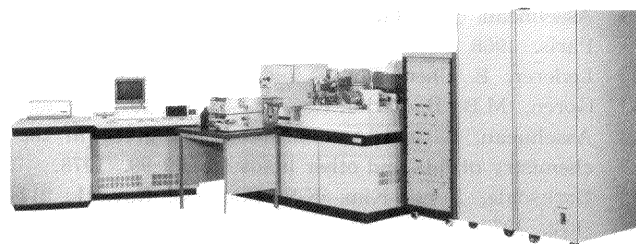
(平成元年 1 月 17 日受理)

1. 序

1952年にJames & Martin¹⁾により脂肪酸のガスクロマトグラフィ (GC) による分離が報告され、次いでその翌年にCropper & Heywood²⁾によりメチルエステル化による脂肪酸の前処理法が発表された。以来、今日に至るまで脂肪酸の機器分析における最も基本的な手段としての脂肪酸メチルエステルのGC分析法が確立された。更に脂肪酸メチルエステルは、その炭素鎖の固有構造により特徴的な質量スペクトルを与えることから、機器の開発研究と相まってGCと質量分析 (MS) を一体化したいわゆるGC/MSによる脂肪酸の分析技術が1960年頃から台頭して以来、この分野での王座を保っていることは周知の事柄であろう。しかしながら、GC/MSが脂肪酸分析のすべてを解決したと言うのはいささか事実に反すると言わねばならない。例えば、最近精子³⁾、網膜⁴⁾や更に大脳⁵⁾などから続々発見されている炭素数26以上40近くの高沸点の極長鎖脂肪酸のGCによる検出のためにカラムを通常の $\frac{1}{2}$ 又はそれ以上に短縮せざるを得ないが、これは脂肪酸どうしの分離度を低下させる要因となることは言うまでもない。更に測定試料によっては、極性の異なる数種類の充填剤のカラムを併行して使用しなければならないとか、沸点の上限、下限の隔りの大きい試料や熱分解しやすい試料に対する特殊の対策ないし前処理の必要性など、数えあげるとGC/MSによる脂肪酸分析には、まだまだ解決すべき多くの難点が残されていると言わざるを得ない。

我々は長らくMycobacteria (抗酸菌) およびその近縁菌の主として細胞壁に大量に含まれるミコール酸 (炭素数30から長いものは80近くに達する極長鎖脂肪酸の一種) と、その前駆体と考えられる極長鎖脂肪酸の分析を手がけてきたが、これらの分離は専ら液体クロマトグラフィ (LC) に頼ってきた。しかし、周知の如くLCによる脂肪酸分析の最大の隘路は脂肪酸に好適の検出器を欠くことである。従って、日立製作所が昨年発売を開始した大気圧イオン化方式 (API) LC/MSが我々の研究にどのようなメリットを与えてくれるであろうか早速検討してみた次第である。従来、アシルグリセロール、リン脂質、糖脂質などに含まれる脂肪酸のLC/MSによるフラグメントイオン検出の報告⁶⁾はあったものの、脂肪酸自身のLC/MS分析に関する報告は筆者の知る限りではBatyら⁷⁾以外は皆無であった。彼らはベルト方式のLC/MSにより炭素数12~22個の脂肪酸のアンスリルメチルエステルを分離、同定しているものの、これよ

りも長鎖の脂肪酸については報じていない。我々は炭素数16~30個の飽和直鎖脂肪酸の他、二重結合1~3個の不飽和脂肪酸についてもLC/MS分析を試みた結果、これらの脂肪酸の分離、同定について満足できる結果が得られた⁸⁾ので以下に報告する。更に、これま



M-2000LC形 日立二重収束質量分析計

でに得られた経験をもとにして、脂肪酸のLC/MS分析を従来のGC/MS分析と比較した場合の長所および短所と思われる点を申し上げ、諸賢の御批判を仰ぎたい。

2. 主な実験材料と実験方法

API方式LC/MSの原理については、日立製作所の技術資料その他に詳しいので省略する。さて脂肪酸のLC/API-MSに最適な誘導体化についてであるが、今まで測定例が皆無であったので、手始めに遊離形とメチルエステル型のパルミチン酸を試料とした。その結果は何れもこのLC/API-MSでの感度は、殆んど無きに等しいものであった。その後種々の試行錯誤の末に、脂肪酸のアミド誘導体がLC/API-MSにかなり、高感度で検出できることが判った。以下に示す測定結果はすべてその内のアニリド誘導体の例についてであるが、これ以外の種々のアミド誘導体についての検出感度についても比較検討しており、その結果については近々学術誌に投稿の予定である。脂肪酸のアニリド化は脂肪酸のナフチルアミド誘導体法⁹⁾に準拠して以下のようにした。約10 mg以下の遊離型脂肪酸をベンゼン 1 mlに溶解し、これをテフロンライナーキャップ付きねじ口試験管 (10 ml容)に移す。これに0.2 mlの塩化オキサリルを加え、よく混和後キャップを閉めて70℃で30分間加熱する。これを室温に戻し開栓した後、約25 mgのアニリンを滴下し、よく混和後37℃に約10分間加温する。これに約1 mlの1N HClを加えた後、アニリド誘導体をヘキサン-ジエチルエーテル (1:1, v/v) 混液 2 mlで2回vortexミキサーを用いて抽出する。溶媒を減圧下に蒸発乾固した後、残渣を少量の

* 川崎医科大学 第二生化学教室教授・医博

テトラヒドロフランに溶かした後、LCに注入する。使用したHPLC装置は日立L-6200形で、ナカライテスク社製逆相カラム (Cosmosil 5 C18, 4.6 mm×150 mm) をAPI-インタフェースに取りつけた。また、マスマスペクトロメーター・コンピューター装置は、日立M-2000形を用いた。

3. 実験結果

図1Aは偶数炭素数16から30までの8種類の直鎖状飽和脂肪酸等量混合物のアニリド誘導体を、上記LC/MSに注入したときのマスキロマトグラムであり、カラム溶出液はスタート時、95%メタノールと5%2-プロパノール混液、その後は毎分1%の割合に2-プロパノールのパーセント濃度を上げるように設定した。なお、溶出液の流速は常に1 ml/分とした。APIインタフェースについては、ドリフト電圧は100 Vで、霧化 (Nebulizer) と脱溶媒器 (desolvator) の温度はそれぞれ290℃と380℃に設定した。TICはトータルイオン電流を指す。図1Bは図1Aのマスキロマトグラムにおける各ピークトップのマスマスペクトルを示したもので

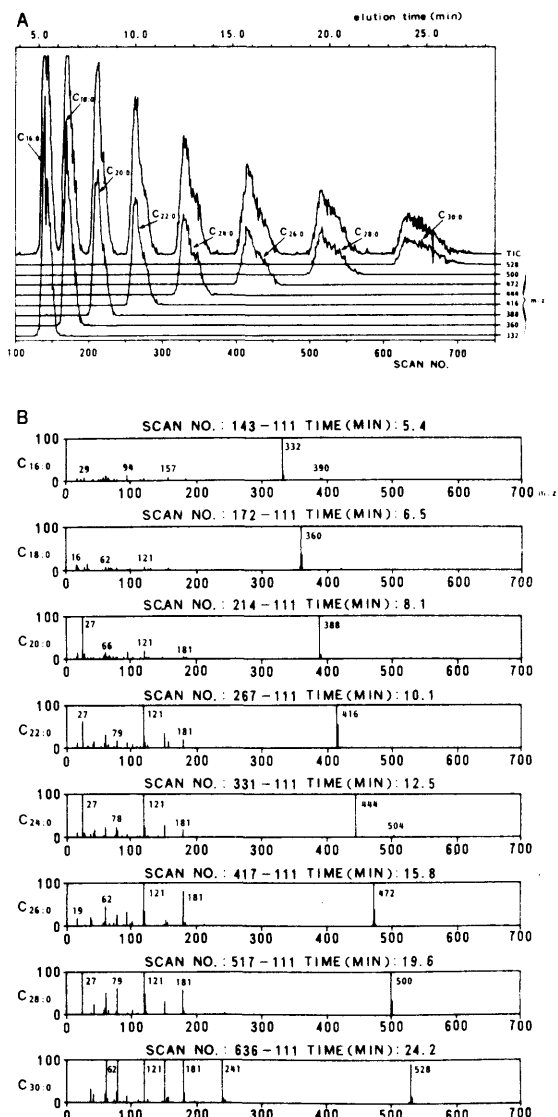


図1 直鎖状飽和脂肪酸アニリド誘導体混合物のLC/MS

あり、すべて各脂肪酸アニリドの擬分子イオン (M+H)⁺ がベースピークとなっていることを示す。但し、溶出時間の増加につれてm/z: 121, 181, 241のイオンが漸増しているが、これらはすべて2-プロパノールのクラスターイオンで、それぞれ(2分子+H), (3分子+H) および(4分子+H) イオンに該当する。図2Aは炭素数14から18までの7種類の飽和、および各種不飽和脂肪酸の等量混合物アニリド誘導体のLC/MSによるマスキロマトグラムであり、LC/MSの測定条件は溶出液の組成を除いて、他はすべて図1Aの場合と同じである。この場合の溶出液は100%メタノールのみである。図2Bは図2Aのマスキロマトグラムにおける各ピークトップのマスマスペクトルを示したもので、図1Bの場合と同様にすべて各脂肪酸アニリドの(分子+H)イオンがベースピークとなっている。この場合は、メタノールのクラスターイオン (m/z, 97, 129) が所々に散見される。また、図1Aと図2Aにおいて、飽和脂肪酸の系列では炭素数の増加に伴って規則的に溶出液量の増加が認められるのに対して、同じ炭素数の直鎖脂肪酸の系列においては二重結合数の増加に伴い溶出液量の減少が認められる。次にパ

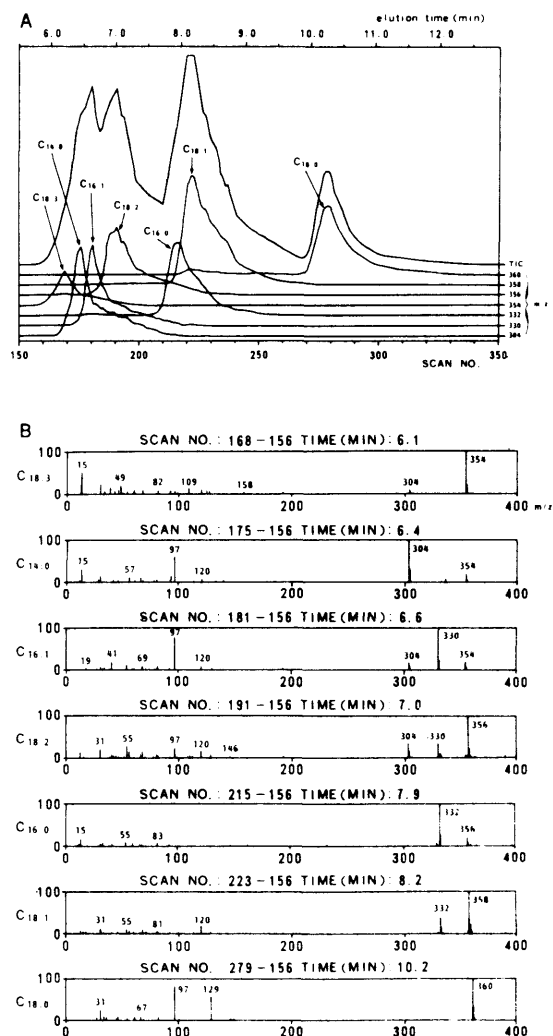


図2 直鎖状不飽和脂肪酸アニリド誘導体混合物のLC/MS

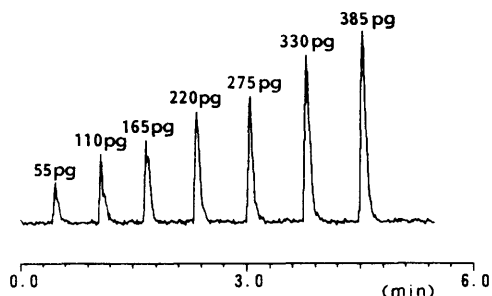


図3 LC/MSによるパルミチン酸アニリドの検出感度

ルミチン酸アニリドに対する検出感度を測定するため、(分子+H) イオンの m/z 332におけるシングルイオンを最高検出感度でモニターしたところ、図3のような結果が得られた。同図から明らかなように、我々の用いた測定条件下でp mol.オーダーを検出することは充分可能であることが明らかとなった。

4. 考 察

以上述べたごとく、脂肪酸のアニリド誘導体はGC/MSとほぼ匹敵する高感度でLC/API-MSにより検出し得ることが明らかになった。しかし、アニリド以外のアミド誘導体についてのLC/MSについては前述のごとく近々報告の予定であり、アニリド以上に高感度のアミド誘導体もあるが、アニリド誘導体はUV吸収能を保持するので、将来このLC/MSにUV検出器をオンラインで接続することが可能になると、分取などの取扱いが容易となろう。但し、すべての脂肪酸が本報に述べた方法でアニリド化されるわけではない。例えば、水酸基をもつ脂肪酸の場合は本報のような塩化オキサリルによる脂肪酸のクロル化には不適当と思われる。これらの点についても目下研究中である。

我々は本報に述べた以外に抗酸菌など天然物に含まれる種々の脂肪酸につき、これらをアミド誘導体化してLC/MS分析を試みており、現在までに得られた経験をもとにした脂肪酸のLC/MS分析を従来のGC/MS分析と比較した場合の長短所を以下にかいつまんで述べて見たい。まず長所としては2つ考えられる。1つは言うまでもなく極長鎖脂肪酸の分析に有利ということである。逆相型シリカゲルカラムを用い、メタノールを基準溶出液にし、これにグラジエントに濃度を上昇させる添加溶媒としては種々の極性のものを自由に選択し得る。未報告の実験例として我々は炭素数50以上の脂肪酸のLC/MSに成功している。第2の長所として、図1のごときマスクロマトグラフィを活用することにより、トータルイオン電流の溶出パターンとしては必ずしも分離が不十分な場合であっても飽和、モノ、ジ、トリ不飽和というような各系列の脂肪酸が極短鎖から極長鎖まで広範囲にわたる極めて雑多の脂肪酸混合物でさえ、唯一度のLC/MS操作のみで、それぞれの脂肪酸の検出が可能であることである。このような実験例を抗酸菌の材料を用いて我々は得ている。この点、GC/MSでは各脂肪酸のGCによる相互分離度が分析上クリティカルポイントとなるから、短鎖脂肪酸の分離をよくするために長鎖脂肪酸の分離度を犠牲にし、逆に長鎖脂肪酸の分離をよくするため

に短鎖脂肪酸の分離度を犠牲にするなどの測定条件を余儀なく設定せざるを得ない場合の多いことは周知の通りである。しかし、LC/API-MSによる脂肪酸分析の短所としてマスペクトルが単純すぎることが挙げられる。すなわち、ほとんどの場合に擬分子イオン $(M+H)^+$ 以外に情報が得られぬために、マスペクトルのみからの物質の同定は危険又は不可能の場合もかなり存在する。このような場合、現状では同定不能な画分を分取して、GC/MSその他の分析手段に頼るしかないと思う。これらの点を総合すると、現段階では脂肪酸の分析法としてのLC/MSの意義としては従来のGC/MSと併用することにより上述のような固有の利点を得られるが、LC/MS単独では未だ万能とはいえないと言わなければならない。

参考文献

- 1) James, A. T. and Martin, A. J. P. (1952) : Gas-liquid Partition Chromatography. The Separation and Micro-Estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. *Biochem. J.* 50, 679~690.
- 2) Cropper, F. R. and Heywood, A. (1953) : Analytical Separation of the Methyl Esters of the C_{12} - C_{22} Fatty Acids by Vapour-Phase Chromatography. *Nature* 172, 1101~1102.
- 3) Poulos, A., Johnson, P. W., Beckman, K., White, I. G. and Easton, C. (1987) : Occurrence of Unusual Molecular Species of Sphingomyelin Containing 28-34-Carbon Polyenoic Fatty Acids in Ram Spermatozoa. *Biochem. J.* 248, 961~964.
- 4) Avelaño, M. I. and Sprecher, H. (1987) : Very Long Chain (C_{24} to C_{36}) Polyenoic Fatty Acids of the n-3 and n-6 Series in Dipolyunsaturated Phosphatidylcholines from Bovine Retina. *J. Biol. Chem.* 262, 1180~1186.
- 5) Poulos, A., Sharp, P., Johnson, D. and Easton, C. (1988) : The Occurrence of Polyenoic Very Long Chain Fatty Acids with Greater than 32 Carbon Atoms in Molecular Species of Phosphatidylcholine in Normal and Peroxisome-Deficient (Zellweger's Syndrome) Brain. *Biochem. J.* 253, 645~650.
- 6) Privett, O. S. and Erdahl, W. L. (1981) : Lipid Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry *Methods Enzymol.* 72, 56~108.
- 7) Baty, J. D., Willis, R. G. and Tavendale, R. (1985) : Liquid Chromatography / Mass Spectrometry of Fatty Acids as Their Anthrylmethyl Esters. *Biomed. Mass Spectrom.* 12, 565~569.
- 8) Kusaka, T., Ikeda, M., Nakano, H. and Numajiri, Y. (1988) : Liquid Chromatography / Mass Spectrometry of Fatty Acids as Their Anilides. *J. Biochem.* 104, 495~497.
- 9) Ikeda, M., Shimada, K. and Sakaguchi, T. (1983) : High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Fatty Acid with 1-Naphthylamine. *J. Chromatogr.* 272, 251~259.

新しいイオン化法，大気圧スプレー法を用いた液体クロマトグラフィー／質量分析法による不揮発性化合物の分析

Analysis of Nonvolatile Compounds by Liquid Chromatography / Atmospheric Pressure Spray Mass Spectrometry

坂入 実* 神原 秀記**

(昭和 63 年 12 月 1 日受理)

1. 緒 言

近年，分析の分野では，分離能力に優れた液体クロマトグラフィーと同定能力に優れた質量分析法とを結合した手法，すなわち液体クロマトグラフィー／質量分析法 (LC/MS : Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) の開発が重要な課題のひとつになっている。著者らは，以前に大気圧イオン化法を用いた LC/MS を開発し，この手法がアルカロイド，アミノ酸，ステロイド，抗生物質などの不揮発性化合物の分析に有効であることを示した^{1),2)}。最近では，この手法が実際にいくつかの分野で活用されるようになってきた^{3)~6)}。著者らはこの大気圧イオン化法の基礎検討を踏まえて，さらに LC/MS に適したイオン化法の研究を続けてきたが，この研究の過程で興味あるイオン化現象に遭遇した⁷⁾。すなわち，流量が 1 ml/min 程度の試料溶液を大気圧下で単にスプレーするだけで糖，ペプチド，リン脂質，糖脂質，ビタミン B₁₂ などの特に熱分解しやすく，不揮発性化合物の分子イオンが強度強く観測されることを見いだした。著者らは，この手法を大気圧スプレー (APS : Atmospheric Pressure Spray) 法と命名した⁷⁾。ここでは，大気圧スプレー法によって得られるマススペクトルの特徴，および大気圧スプレー法を LC/MS に応用して得られた糖の分析結果について報告する。

2. 実 験

実験には，新しく開発した液体クロマトグラフ／大気圧スプレー質量分析計を用いた。この装置の構成を図 1 に示したが，液体クロマトグラフ (L-6000 形日立液体クロマトグラフ) からの試料溶液はスプレー器により大気圧下でスプレーされ，生成したイオンは細孔から真空中に導入され，二重収束質量分析計 (M-80 形日立二重収束質量分析計) によって分析される。データ処理装置には，日立 0101 を用いた。

γ -シクロデキストリンのマススペクトル測定では，試料 5 μ g を含む水溶液 10 μ l を液体クロマトグラフの試料注入口に注入し，このときの液体クロマトグラフの移動相には 100 % 水を流量 1 ml/min を用いた。また，大豆から取り出した糖の混合物の分析では，逆相クロマトグラフィー用の充てん剤である日立ゲル #3056 を充てんしたカラム (4 mm $\times$ 150 mm) を用い，移動相に 100 % 水を流量 1 ml/min で用

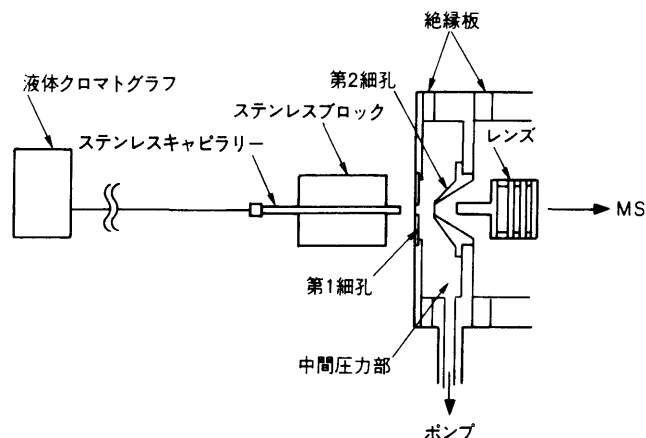


図1 大気圧スプレー法を用いた液体クロマトグラフ／質量分析計の構成図

いた。このとき，質量分析計の走査範囲と走査速度は，それぞれ 1-600 a.m.u.，1,500 a.m.u./4 s とした。

3. 結果および考察

糖の一種である γ -シクロデキストリン (分子量 1,296) の大気圧スプレーマススペクトルを図 2 に示した。この物質は非常に熱に弱いと同時に揮発性に乏しく測定が困難である物質として知られ，開発されたイオン化法のソフト性を判断するのによく使用される化合物のひとつである。同図に示したように，大気圧スプレー法ではカチオンの付加した分子イオン種 ($M+Na$)⁺ (m/z 1,319, ($M+K$)⁺ (m/z 1,335) が強度強く得られている。糖のように酸素原子を多く含む物質では，Na⁺やK⁺のようなカチオンの付加した分子イオン種が強度強く得られ，しかもフラグメントイオンが少ないことが，大気圧スプレー法の大きな特徴となっている。また，バックグランドイオンには，液体クロマトグラフの移動相に水を流量 1 ml/min で使用しているのにもかかわらず，H₃O⁺よりもNa⁺やK⁺のほうが強度強く観測されている。このバックグランドイオンに関して，移動相に水を用いた場合にはH₃O⁺やH⁺(H₂O)₂などのクラスターイオンが強く観測される大気圧イオン化法の場合とは好対照である。

大気圧スプレー法を用いた LC/MS による糖の混合物の分析結果を図 3 に示した。この糖は大豆から採ったもので，主な成分はグルコース (質量数 180)，シュクロース (質

* 株式会社 日立製作所 基礎研究所
** 株式会社 日立製作所 基礎研究所 理博

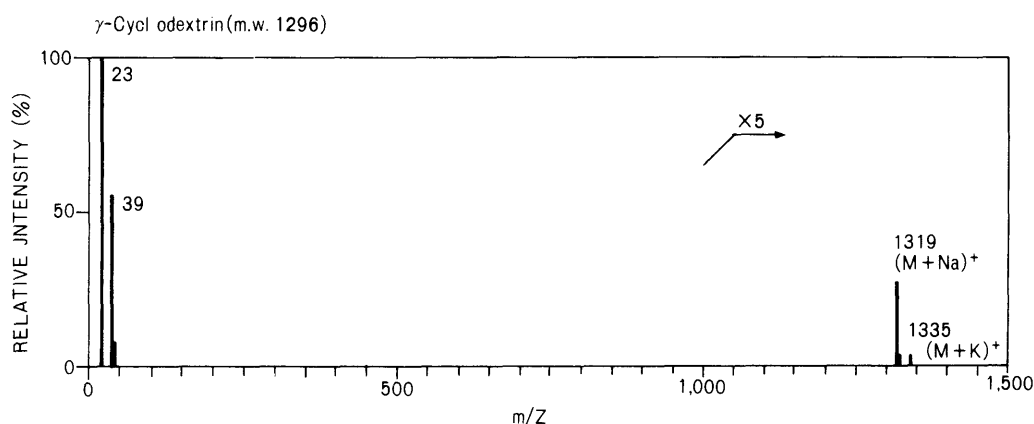


図2 大気圧スプレー法で得られる γ -シクロデキストリンのマススペクトル

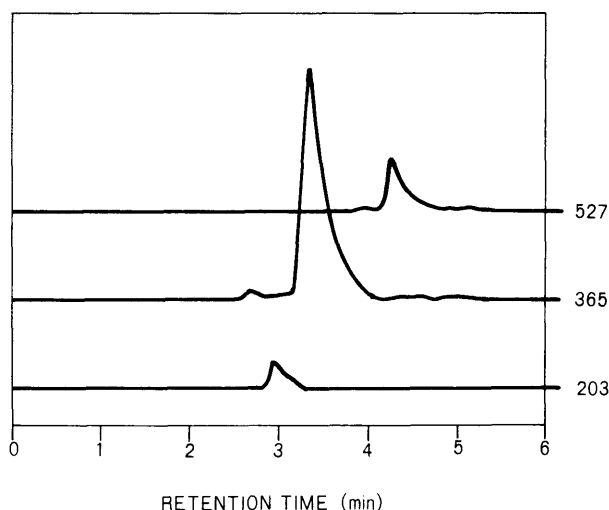
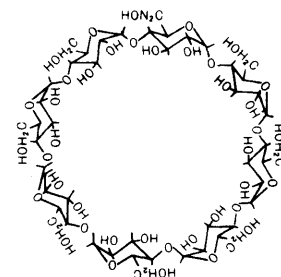


図3 大気圧スプレー法を用いた液体クロマトグラフィー/質量分析法による糖の混合物（グルコース、シュクロース、ラフィノース）の分析

量数342), ラフィノース 8 質量数504) の3成分である。先にも述べたように、糖の場合には Na^+ の付加した分子イオン種が強度強く観測されるので、これらの糖の Na^+ の付加した分子イオンに相当する質量数 (グルコース: $m/z=203$, シュクロース: $m/z=365$, ラフィノース: $m/z=527$) のマスプロトグラムを出力すると、これら3種の糖の存在が明確にわかると同時に、保持時間が決定できる。現在、液体クロマトグラフィーの分野では、糖は通常のUVモニタでは検出できないため、示差屈折計による検出や蛍光剤で標識して蛍光による検出などを行っている。前者では感度が低いことが問題であるし、後者では糖を標識しなければならないことが問題である。このような観点から、糖を無修飾で高感度に検出できる大気圧スプレー法を用いたLC/MSは、糖分析に大きな威力を発揮すると考えられる。また、ラフィノースはシュクロースにさらにヘキソースが結合した構造をとっており、ラフィノースのフラグメントイオンとしてシュクロースの構造に対応したイオンが観測されやすいが、ラフィノースの溶出位置には質量数365の

ピークが観測されておらず、これからもこの測定条件下では、ラフィノースのフラグメントイオンが観測されていないことがわかる。さらに、マスプロトグラムのピークも安定して得られており、ピークのテーリングも少ないことから、定性分析ばかりでなく定量分析を行うことも可能であると考えられる。

4. 結 言

以上、糖の簡単な分析を例にあげて大気圧スプレー法の特徴について述べてきたが、溶液中の試料を大気圧下で単にスプレーするだけで、糖のように熱に弱く不揮発性の物質の分子イオンが強度強く観測される大気圧スプレー法は、LC/MSのイオン化法として非常に有効であることが確認された。また、従来の大気圧イオン化法とは同じ大気圧で動作することから装置上の互換性もよく、大気圧スプレー法と大気圧イオン化法を組み合わせたLC/MSは、今後この分野で大きく発展していくと考えられる。

参考文献

- 1) M.Sakairi and H.Kambara: Anal. Chem., **60**, 774 (1988).
- 2) M.Sakairi and H.Kambara: Analytical Sciences, **4**, 141 (1988).
- 3) 櫛, 飯田: 日本医用マススペクトル学会講演集, p.73 (1988年).
- 4) 児玉: 日本医用マススペクトル学会講演集, p.157 (1988年).
- 5) 辻野, 東, 鈴木, 比嘉, 水野および佐古田: 日本医用マススペクトル学会講演集, p.183 (1988年).
- 6) 矢野, 夏原, 井川, 韓, 岡, 沼尻および加藤: 日本医用マススペクトル学会講演集, p.207 (1988年).
- 7) M. Sakairi and H. Kambara: Anal. Chem., to be published.

解 説

日立LC/API-MSによる負イオン測定

HITACHI LC/API-MS and It's Applications by Negative Ion Mass Spectrometry

加藤 義昭* 沼尻 陽子**

(平成元年1月26日受理)

1. はじめに

LC (液体クロマトグラフィー) とMS (質量分析) の結合は、LCの持つ卓越した分離能力とMSの定性、定量能力を結びつけた理想の分析手法と言える。現在まで多くの研究者やメーカーから種々の原理に基づくLC/MSインタフェースが発表されてきた。しかし、それらの多くは淘汰され、現在残っているものは次の3手法およびそれらの変形手法である。サーモスプレー法 (TSP法)、連続フローFAB (Continuous Flow FAB, CFF) と大気圧イオン化法 (API法) である。これらの中でAPIは以下のような特長を持っている。

- (1) 0.1~2 ml/minの流量でLC/MS分析ができる。

CFF法は $\frac{1}{100}$ のスプリットまたはマイクロカラムの使用が必要である。

- (2) 水100%からヘキサン/THF系まで幅広い移動相の選択ができる。

CFF法やTSP法では有機溶媒100%の系での分析は困難である。

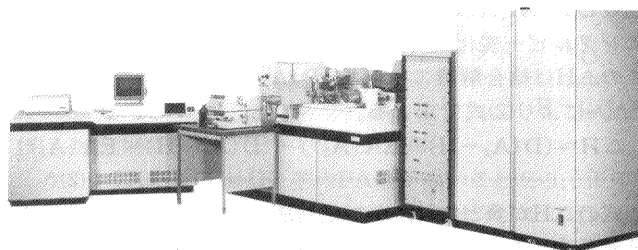
- (3) 低質量領域のバックグラウンドが低い。

CFF法では、移動相とともに流すグリセロールに由来するバックグラウンドピークが低質量領域の解析を困難とする。

- (4) LC/MSインタフェース、MSに液体窒素などのトラップ不要、汚染に強い。

このほかにもAPI法は多くの特長を持っているが、本旨と直接関係ないため省略する。

LC/MS手法のうち、TSP法 (Filament on, Discharge) とAPI法は、熱噴霧と移動相溶媒を試薬とする化学イオン化 (Chemical Ionization, CI) をイオン化の手段としている点で共通の基盤に立っている。しかし、API法とTSP法ではイオン化室の圧力が全く異なっている。すなわち、TSP法では百~数十パスカル (1~0.1 Torr) であるのに対し、API法では 10^5 Pa (大気圧, 760 Torr) である。化学イオン化はイオンと分子が衝突し、その結果イオン分子反応が起き新たなイオンが生じることである。そのためイオンと分子の衝突が頻繁に起きることが必要である。APIの圧力がTSPのそれに比べて1,000倍近く高いことから、APIはTSPに比べて1,000倍以上効率の良いイオン化即ち微量成



M-2000LC形 日立二重収束質量分析計

分を感度良く測定することが期待できる。また大気圧ではイオンの空間移動が著しく抑えられるため、せっかく生成したイオンが器壁に衝突して電荷の消失するようなこともない。TSP法が霧化器の温度や流量などの変化に非常に敏感に影響を受けるのに対し、API法では条件変化に影響を受けにくいのはこのためである。

CI法を用いたLC/API-MSインタフェースでは、試薬イオンとしてさまざまな溶媒を選択でき、「化学者による化学者のための化学情報を得る。」ことが可能となる。

日立はAPI法によるLC/MSを開発し、装置の改良とともに応用面の拡大を図ってきた。今回、電気陰性度の高い官能基 (カルボキシル基、スルホン酸基、グルクロン酸など) を持つ化合物に有効な負イオン測定モードを開発し、いくつかの測定を試みた。

CI法では一般に正および負イオンが生成する。生成したイオンのうち、正負どちらか一方を加速、質量分散、検出することで正イオンマススペクトルまたは負イオンマススペクトルを得ることができる。CI反応は気相中での化学反応であるから、正負両イオンがすべての化合物で同一比重 (同一イオン量) で得られるわけでない。ある化合物群では正イオンを、また別の化合物群では負イオンを多量に生成し、逆極性のイオンを生成しないことがよく観察される。また同じ化合物でありながら、ある溶媒では全くイオン化されないのに、溶媒を変更したところよくイオン化され、擬分子イオンを感度よく与えることがある。CI法の原理は、溶媒イオン (反応イオン) と試料分子との反応であり、種々の応用が可能である。そのため、分析目的に応じた条件などをあらかじめ設定する上で、イオン分子反応の知識を持つことは有意義であろう。以下に、大気圧下でのCI法による負イオン生成の簡単な解説及び測定例を示す。

2. 負イオンCI (NCI) の概要

CI法に関しては、平岡¹⁾、中田²⁾、飯田³⁾らによって優れた

* 株式会社 日立製作所 那珂工場 科学機器システム部

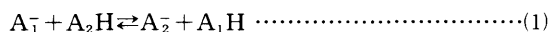
** 日立計測エンジニアリング株式会社 テクノリサーチセンタ

総説がすでになされている。ここではLC/NCI-MSを使いこなしていく上で、考慮すべき点だけにとどめる。

負イオンは多くの条件下で、いくつかのプロセスを経て生成される。この中で、有機化合物の大気圧イオン化で優先して起こる負イオン生成プロセスは反応イオン型、付加反応型などである。

2.1 反応イオン型NCI

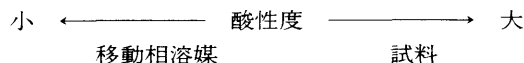
負イオンが関与する反応イオン型NCIとして、プロトン移動反応(1)式がよく知られている。



ここで A_1^- はコロナ放電、イオン分子反応で生じた反応イオン、 A_2H は試料分子である。反応イオン A_1^- はBrönstedの塩基として、 A_2H はBrönstedの酸として働いている。(1)式のエンタルピー変化 ΔH は両分子AHの酸性度により決まる。この ΔH は結合解離エネルギー $D(A-H)$ とAの電子親和力 $EA(A)$ により(2)式で求まる。

$$\Delta H = [D(A_2-H) - EA(A_2)] - [D(A_1-H) - EA(A_1)] \quad \cdots \cdots (2)$$

(2)式の ΔH が負となり、かつ絶対値が大きくなるほど大きな発熱反応となり、平衡は右にずれる。すなわち、試料分子 A_2H が効率よく A_2^- イオンへとイオン化される。これから、負イオン測定対象となる溶質分子としては $D(A-H) - EA(A)$ が小さいもの、すなわち酸性度の大きいもののほうが負イオンを生成しやすい。また、反応イオンとなる溶媒を選ぶなら $D(A-H) - EA(A)$ の大きいもの、すなわち酸性度の小さいものを選べば多くの化合物をイオン化できる。



以上、溶質分子と溶媒分子の関係について定性的に理解できた。より厳密には表1に示す酸性度を参考にするとよい。

表1 気体AHの酸性度(D-EA)

単位: kJ/mol¹⁾

AH	D-EA	酸性度
H ₂	362	小
H ₂ O	323	
CH ₃ OH	265	
C ₂ H ₅ OH	257	
CH ₃ SOCH ₃	256	
i-C ₃ H ₇ OH	251	
CH ₃ CN	251	
t-C ₄ H ₉ OH	248	
Acetone	236	
HF	236	
CH ₃ CHO	224	
Phenol	152	
CH ₃ COOH	146	
HCOOH	132	
Benzoic acid	113	
Malonitrile	94	
Barbituric acid	90	
HCl	84	
CF ₃ COOH	38	
HI	3	大

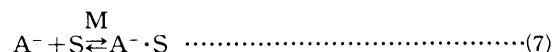
表1から明らかのように、マロン酸ニトリル $CH_2(CN)_2$ やバルビツール酸などは気相中で強酸である。このような化合物は、LCで使用するたいていの溶媒を用いても負イオンマススペクトルを得ることができる。しかし、一般の有機化合物の酸性度は大きいものばかりとは限らないため、使用する溶媒、溶質の酸性度をあらかじめ考慮することは測定に有効である。水やメタノールよりも酸性度の大きい化合物、例えば、安息香酸の分析は正イオン測定でなく負イオン測定を行うべきで、移動相としては水/メタノール系で十分安息香酸をイオン化できる。一方、HClは Cl^- の共役酸であるHClの酸性度が大きいので、プロトン移動反応の反応イオンとしては不適当である。 H_2O や $R-OH$ （アルコール）は、以下に示すように酸としても塩基としても働くことができる両性溶媒である。そのため、これらはLC/APIの正負両モードで有用な溶媒と言える。



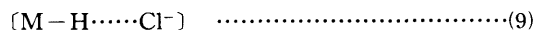
(3)式、(5)式では H_2O 、 ROH はBrönstedの酸として、また(4)式、(6)式ではBrönstedの塩基として働いている。

2.2 付加反応型NCI（イオンのクラスタリング反応）

負イオン生成プロセスには、前述のプロトン移動反応のほかに付加反応や置換反応などがある。この付加反応は、とくに溶媒分子の極性が大きい場合かなり大きな発熱反応となる。付加による結合自身はそれほど強固でないため、付加イオンの安定化のためには第三の分子Mの衝突による安定化（失活）が必要である。APIでは、この衝突による失活が十分に行えるため安定な付加イオンが生成しやすい。



(7)式は付加反応、(8)式は置換反応を表している。反応イオン A^- としては、 O_2^- 、 Cl^- 、 Br^- など非共有電子対を持つものがよく用いられる。これらの共役酸である HO_2 、 HCl 、 HBr などがいづれも酸性度が大きいので、直接プロトン移動反応(1)式で一般の有機物をイオン化できない。しかし、付加反応(7)式で負イオンを作ることができる。 Cl^- イオンなどは試料分子中の分極した水素（例えばアルコール性OHのH）と水素結合で結び付いていると考えられる。



このような水素結合型付加イオンは、一般に80～130 kJ/mol程度安定化されているため、プロトン移動反応などで擬分子イオンを与えないような不安定な化合物でも付加イオンを明確に観察できるものがある。共役酸の酸性度の小さい CH_3O^- イオンの場合は $[M-H \cdots OCH_3]$ のような付加イオンは生成しない。この場合 CH_3O^- イオンの塩基性が強いのでプロトン移動が起き、 $(M-H)^-$ イオンが生成する。

APIで噴霧の段階で空気中の O_2 が取り込まれるため O_2^- が生成する。そのため移動相中に酸素源を追加する必要はない。 Cl^- 付加イオンの観察のためには移動相中に CCl_4 、 CCl_3H などを数パーセント混入してやればよい。この程度なら H_2O

にも混入が可能で分離を損ねることもない。さらに、Cl付加イオンはマスペクトルの高質量領域にClの同位体に基づく強度比3対1のピークが出現し、分子量確認の大きな助けとなる。

3. LC/NCI-MSでの移動相溶媒の選択

プロトン移動反応を主とする場合、移動相溶媒として酸性度の小さい H_2O 、 CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、 $i\text{-PrOH}$ などがよい。またこれに $n\text{-Hexane}$ 、 THF など負イオン反応に関与しない溶媒と上記溶媒を混合して使用することはなんら障りがない。酸性度の大きい CF_3COOH などは、プロトン移動反応で自らがイオン化され(CF_3COO^-)、溶質分子をイオン化できなくなることがあるので、使用に当たっては注意が必要である。

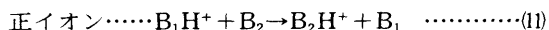
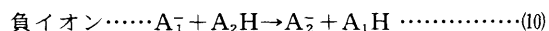
付加イオンを観察したい場合で、プロトン移動反応を並行して起こさせないためには $n\text{-Hexane}$ や THF と CHCl_3 との混合溶媒を用いればよい。この場合、 CHCl_3 の量は数パーセントでよい。

LC/MSの場合移動相溶媒の選択は、イオン化機構だけによって左右されるわけにはいかない。クロマトグラム上の分離を十分に行うための選択も当然必要である。イオン化、分離の満足(妥協といってもいいかもしれないが)のために、カラム(クロマトグラフィーの選択)、移動相の選択などが必要となる。

4. LC/NCIマスペクトルの特長

4.1 擬分子イオン

プロトン移動反応により負イオン(10)式も正イオン(11)式も同じように生成する。



両反応で A_2H 、 B_2 の分子量を M とするなら、負イオン反応(10)式での擬分子イオン A_2^- の質量は $(M-1)$ である。また正イオン B_2H^+ では $(M+1)$ となる。正イオンの関与するプロトン移動反応(10)式では、新たな結合が B_2H^+ イオンに生じる。これに対し負イオンの関与するプロトン移動反応(10)式では、新たな結合が中性分子 A_1H に生じる。

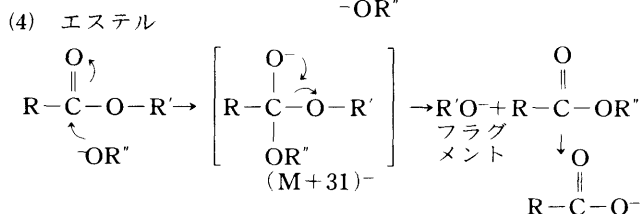
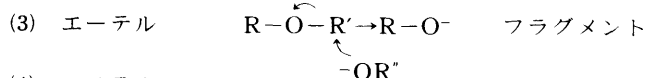
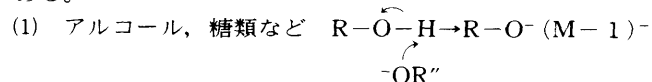
発熱性のプロトン移動反応では、反応エネルギーのほとんどが新しく生成する結合に付与される。そのため、大きな発熱性プロトン移動反応では(B_1 と B_2 のプロトン親和力PAの差が大きい場合) BH^+ は分解しやすくなる。一方、 A^- には新たな結合が作られなかったため分解しにくくなる。これが負イオンCIのほうが正イオンCIより反応が緩やかで、擬分子イオンを生成しやすい理由である。ひいてはNCIマスペクトルがPCIマスペクトルよりも単純であることになる。また付加イオンで生じた擬分子イオンも、水素結合による安定化 $80 \sim 130 \text{ kJ/mol}$ の寄与で A^- と同じように安定化し、フラグメントイオンを生成しにくくしている。

以上からNCIマスペクトルは、酸性度の大きい化合物の分子量確認には最適な手法と言える。

4.2 NCIマスペクトルのフラグメンテーション

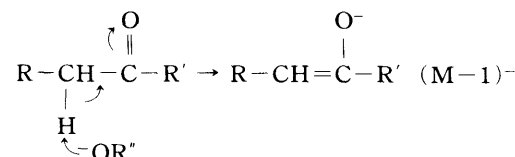
NCIは4.1で述べたように、極めて安定なイオン化と言えるが、フラグメンテーションが全く生じないわけではない。化合物によってはフラグメントイオンが顕著に現れる場合がある。NCIでは反応イオン(例えば、 CH_3O^- イオン)が

試料分子に対し求核反応を考えると考えれば説明しやすい。以下に反応例を示す。ここで、 R'' は H 、 CH_3 、 C_2H_5 などである。



(5) ケトン

ケトン類は($>\text{C}=\text{O}$)基のPA値が高いことから、正イオンでも十分測定できる。負イオンマスペクトルでは、 α 位の水素に求核的に反応していると考えられる。



また、 $>\text{C}=\text{O}$ の炭素への求核的反応も考えられる。

5. LC/API-MS装置(正イオン測定と負イオン測定の切換え)

日立LC/API-MSインタフェースの概要を図1に示す。LCに導入された試料はカラムで分離され、内径 0.25 mm のテフロンチューブを通してLC/MSインタフェースに導かれる。移動相溶液は、加熱された内径 0.1 mm のステンレスチューブを通り大気中に噴霧される。さらに、内径 5 mm の脱溶媒室を経て溶媒は気化する。 $6 \sim 8 \text{ kV}$ に印加された針電極からのコロナ放電により、多量に存在する溶媒分子がイオン化される。この溶媒イオンが溶質分子と衝突し溶質分子がイオン化される。

負イオン測定に当たっては、LC/MSインタフェース各部に印加されている電圧の極性を反転させる必要がある。すなわち、図1に示すようにイオン加速電圧、イオンドリフト電圧、コロナ放電電圧の極性を正から負へと反転させる。

これはスイッチで簡単に切換えができる。質量分析計の電場、磁場の極性を同時に反転し負イオン測定モードにすれば、負イオン測定が可能となる。

6. 負イオンマスペクトル

6.1 マスキャリブレーション

試料の測定の前に質量校正(マスキャリブレーション)が必要である。キャリブレーション用の試料としては、質量既知のピークが安定に、かつ強度高く広範囲にマスピークを与えるものが望ましい。筆者らは、この目的のためPEG(Polyethylene Glycol)を使用している。PEGは正イオン用のキャリブレーションに用いられているが、負イオンで

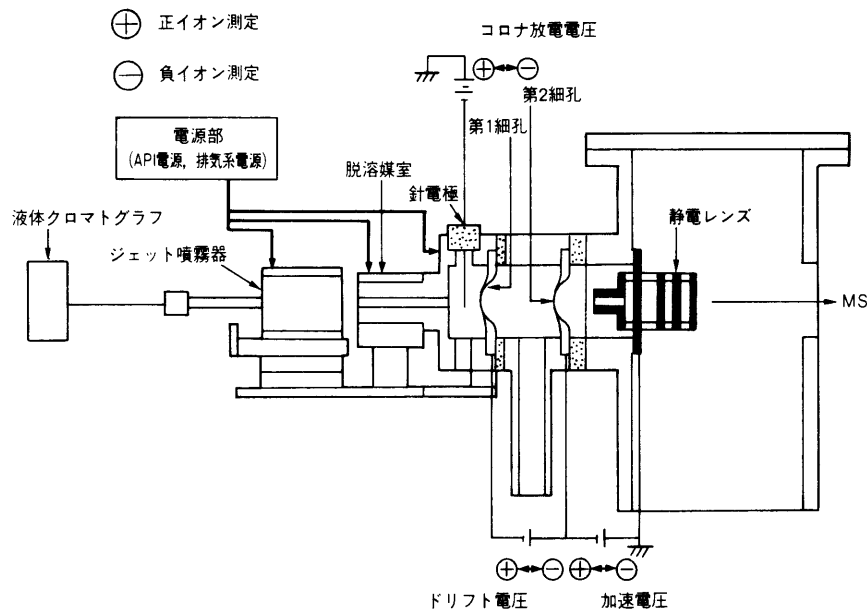
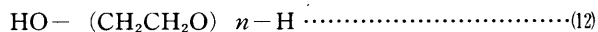


図1 日立LC/API-MSインタフェースの概要

もきわめて有効な物質である。PEG-600の負イオンマスペクトルを図2に示す。移動相はメタノールを用い、インジェクション試料量は $1\text{ }\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$ である。4 mm×150 mmのODSカラムでほとんど保持されずに溶出する。同図は収集したマスペクトルを10回積算したものである。 m/z 622を基準ピークとしたきれいなマスパターンを与える。このマスペクトル上に出現しているマスピークは、 O_2 付加イオン $(\text{M}+\text{O}_2)^-$ と $(\text{M}-1)^-$ の二つのシリーズがある。PEGを(12)式のように表すと



付加イオン $(\text{M}+\text{O}_2)^-$ の質量 m は、

$$m=44n+18+32=44n+50 \quad (13)$$

また $(\text{M}-\text{H})^-$ イオンの質量 m' は、

$$m'=44n+18-1=44n+17 \quad (14)$$

となる。ゆえに、得られる負イオンマスペクトルは間隔11と33ごとにマスピークが出現する。付加イオンと $\text{M}-1$ イオンの強度はドリフト電圧や霧化器の温度などにより多少変化する。測定対象によりPEGの重合度の異なったものを用いればよい。

6.2 負イオンマスペクトル測定例

(1) Valproic Acid

比較的小さな脂肪酸はEI, CIなどでもよく測定されているが、フリーの脂肪酸は脱水が起きて分子量の確認が困難な場合が多い。メタノールを試薬にしたAPI/NCIでは、擬分子イオン $(\text{M}-1)^-$ を感度良く与え脱水ピークは見当たらない。

(2) Bisphenol A

Bisphenol Aはエポキシやポリカーボネート樹脂などの重要な原料である。擬分子イオン $(\text{M}-1)^-$ が基準ピークで他にピークは見当たらない。

m/z 260に非常に小さなピークがあるが、これはフェノールのOH基に O_2 が付加したイオンと思われる。

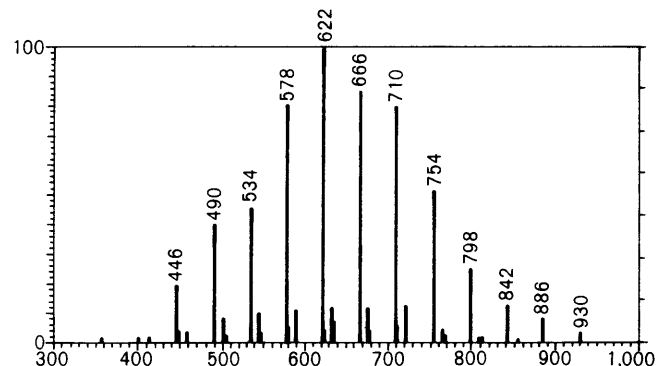
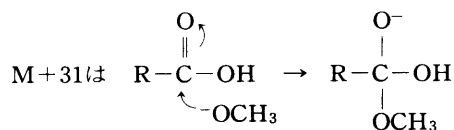


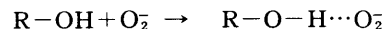
図2 PEG-600の負イオンマスペクトル

(3) Cholic Acid

胆じゅう酸のLC/MS分析は非常に多く報告されている。正イオンマスペクトルでは、移動相に酢酸アンモン水溶液を用いてアンモニウム付加イオンを出現させている。正イオンマスペクトルでは、 $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$ イオンのほか $(\text{M}+\text{NH}_4-n\text{H}_2\text{O})^+$ $n=1, 2, 3$ などの脱水ピークが出現し、試料が既知でなければ解釈に苦労しそうである。API/NCIではメタノールを移動相としたとき $(\text{M}-1)^-$ が強度高く出現し、脱水ピークは見当たらない。 $(\text{M}-1)^-$ のほかにパターン係数2%以下の $\text{M}+31$, $\text{M}+32$ が観察されるだけである。



$\text{M}+32$ は、 O_2 付加イオンと考えられる。



(4) Testosterone β -D-glucuronide

擬分子イオン $(\text{M}-1)^-$ が出現し、他に付加イオン、フ

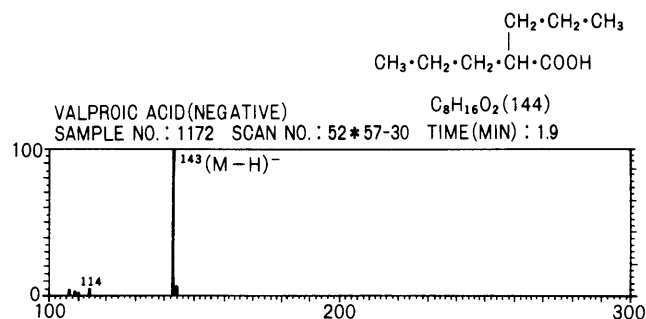


図3 Valproic Acidの負イオンマススペクトル

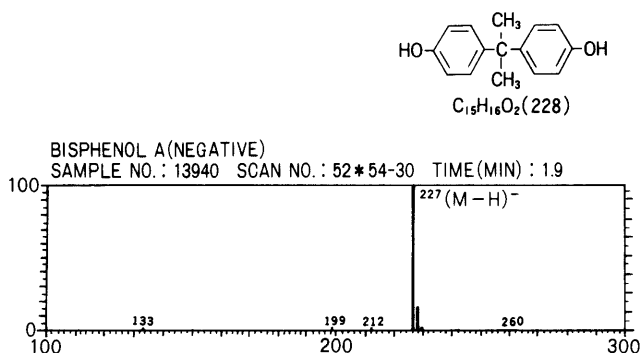


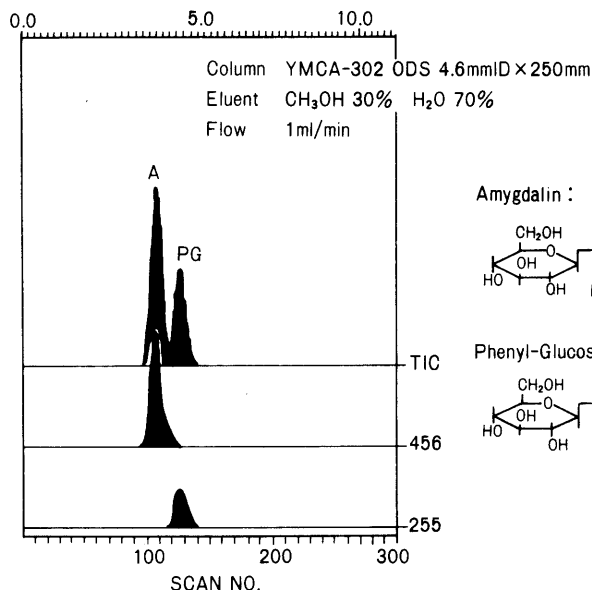
図4 Bisphenol Aの負イオンマススペクトル

ラグメントイオンなどは出現しない。正イオンでアグリコン部に由来するピーク m/z 289が強度高く検出されたのとは対照的である。

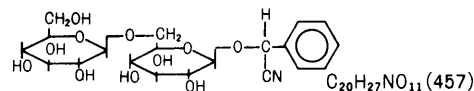
(5) Amygdalin + Phenyl-glucoside

メタノールに溶かした混合試料を注入した。LCカラムは YMC A-302 4.6 mm×250 mm, 移動相はメタノール30%, 水70%であった。流量は1 ml/minである。約4分と5分に二つのピークが検出され、前者がAmygdalin, 後者

SAMPLE: 13130 AMYGDALIN & PHENYL-GLUCOSIDE (NEGATIVE)
 TIME (MIN.)



Amygdalin:



Phenyl-Glucoside:

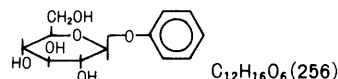


図7 Amygdalin + Phenyl-glucosideの負イオンLC/API-MSクロマトグラム

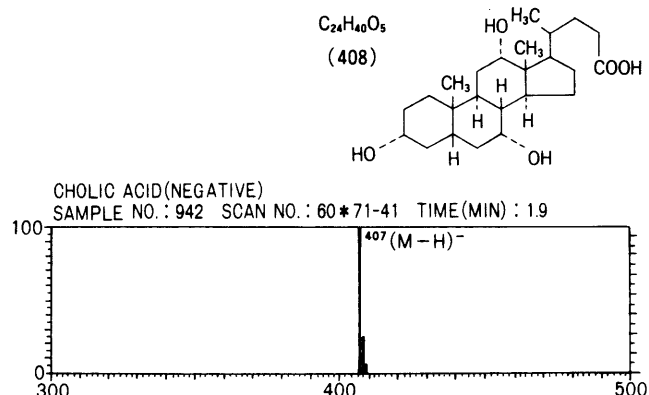


図5 Cholic Acidの負イオンマススペクトル

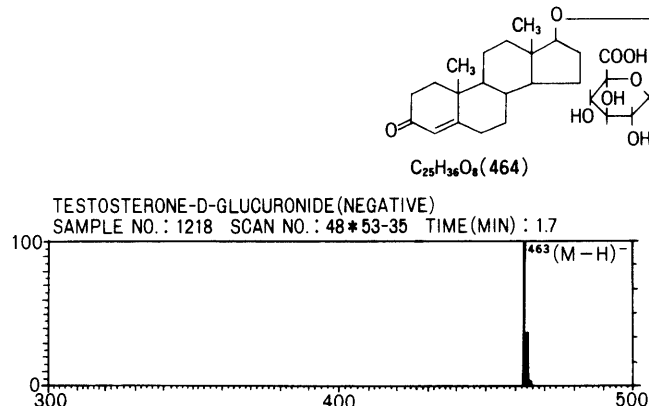


図6 Testosterone β-D-glucuronideの負イオンマススペクトル

がPhenyl-glucosideであることがNCIマススペクトルから同定できた。Amygdalinのマススペクトルでは、 $(M-1)^-$ が基準ピークであり、他に $M+32$, $M+46$ のピークが観察された。 $M+32$ は O_2 付加イオン, $M+46$ は NO_2 付加イオンと



0.0 5.0 10.0

Column : LiChrosorb RP-18
Eluent : Methanol 100%
Flow rate : 1ml/min

1. Glycyrrhizin (MW822)
2. Glycyrrhetic acid (MW470)

4.0mmID × 250mm

645 469

821 * 5.0

645

469

SCAN NO.

CC(=O)O[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)O)C)C

$C_{42}H_{62}O_{16}$ (822)

図9 Glycyrrhizin+Glycyrrhetic Acidの負イオンLC/API-MSクロマトグラム

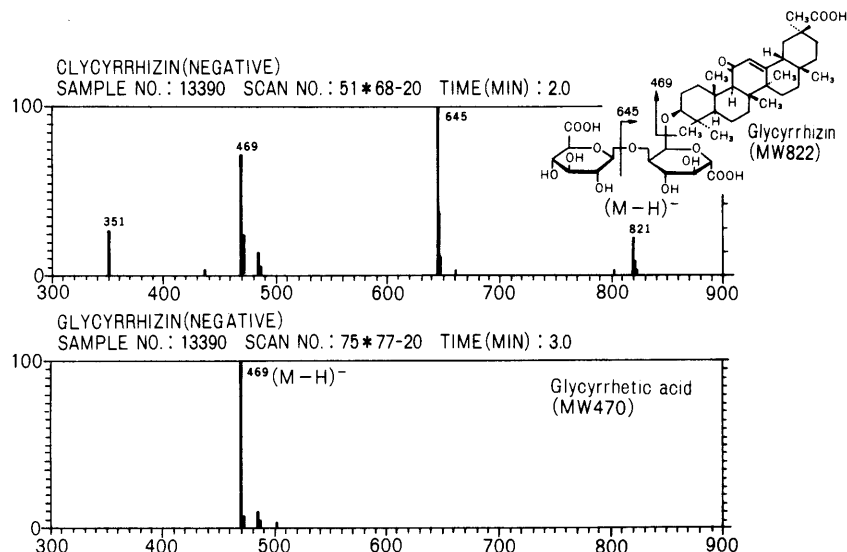


図10 Glycyrrhizin, Glycyrrhetic Acidの負イオンマスペクトル

考えられる。また、同様にPhenyl-glucosideは、 $(M-1)^-$ が基準ピークであり、 O_2 、 NO_2 付加イオンが観察された。ほかに $(2M-1)^-$ のピークも観察された。

(6) Glycyrrhizin+Glycyrrhetic Acid

カラムは、LiChrosorb RP-18 4 mm×250 mmを用い、100%メタノールで二成分を分離した。最初に溶出した成分は、そのマスペクトルからGlycyrrhizin、後に溶出した成分はGlycyrrhetic Acidであることが判明した。

7. 最後に

LC/API-NCIについて概要を述べたが、筆者らの経験も浅く、誤りや見落としも多いと思われる。多くのご教示、ご叱責を望む次第である。

APIの手法はNCIの導入によりその応用範囲を広げることができた。さらに、神原、坂入による大気圧スプレー⁴⁾なども開発され、いっそう適用範囲の拡大が図れそうである。筆者らは、今後さらに装置の改良、開発に努力する考えである。

参考文献

- 1) 平岡：質量分析，28，185（1980）
- 2) 中田：質量分析，28，293（1980）
- 3) 飯田，代島：質量分析，30，1（1982）
- 4) 神原，坂入：第8回日立マスユーザーズカンファレンス予稿集（1989）

■訂正

去る3月にお送りしましたVOL. 32 NO. 2に、下記の様な誤りがありました。謹んでお詫びの上、訂正させていただきます。

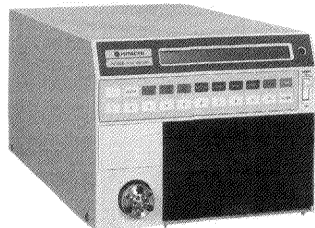
頁：12 位置：左列 図4 「鳥観図表示したグラフィットのSTM像(上)と単位胞」で、STM像(上)の写真を天地が逆に訂正します。

頁：22 位置：左列 図5の説明文

訂正前	ブドウ球菌（緑色）の表面に抗原抗体反応により付着したコロイド金（黄色）の所在が容易に確認できる。
訂正後	ブドウ球菌（緑色）の表面に付着したコロイド金（黄色）の所在が容易に確認できる。

Topics

AS-2000形 日立液体クロマトグラフ用 オートサンブラ



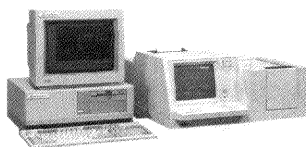
AS-2000形オートサンブラは、液体クロマトグラフと接続し、分析の自動化を実現します。実験室の自動化（LA）が注目を集めている現在のシステム化に対応し、品質管理から最先端の研究まで幅広い分野で使用することが出来るオートサンブラです。

■主な仕様

- (1) 他に類を見ないコンパクトなオートサンブラです。幅260 mm、高さ210 mmです（L-6200形ポンプと同等寸法です）。
- (2) 高精度、低コンタミネーションを実現しました。ニードルや流路は1検体測定ごとに洗浄します。洗浄液量は試料や試薬に応じて自由に設定することができます。

- (3) 使いやすさを追求しました。日常使用する分析条件はバッテリーバックアップされたメモリに記憶され、電源を切っても消えません。
- (4) システム化対応機能が豊富です。RS-232C、PAN（日立LCネットワーク）、入出力端子などがあり、外部システムとの効果的な連携が可能です。

分光スペクトルのデータ 処理ならお任せください。 日立分光光度計/分光蛍 光光度計用データ処理ソ フト Spectra Calc™



実験室で得られるX-Y座標系のさまざまなデータ、例えば波長対吸光度、時間対強度など、Spectra Calcはそのようなデータを収集・演算し、より有効な情報を引き出すため、あらゆる科学用データ処理機能を集大成した汎（はん）用ソフトパッケージです。

■主な特長

- (1) PC（パーソナルコンピュータ）上で動作し、ミニコン並みの機能を実現。単純な四則演算、微積分、ピーク検

出などから、FFT、ディコンボリューション、カーブフィッティングなど高度な機能を満載し、あらゆる用途におこたえます。スピードを追求した独得のアルゴリズムと演算専用プロセッサの機能により、今までミニコンクラスでだけ可能であった処理もPC（IBM-AT™またはコンパチ機）上で高速に処理します。

- (2) オンラインデータ収集がマルチタスクで行なえます。

U-2000、U-3210/U-3410形日立分光光度計、F-2000、F-3010/F-4010形日立分光蛍光光度計とオンラインで接続し、機器制御からデータ収集、レポートまで、最適な自動化システムを提供します。しかも、データ処理中にバックグラウンドジョブでデータ収集や出力をする、マルチタスク機能を実現しました。

- (3) 科学用BASICによりユーザープログラマブル。

科学用データ処理に最適化されたBASIC言語を搭載し、データ処理専用コマンドを駆使した効率的なプログラミングにより、独自の処理を高速で実現します。各種流通ソフトやネットワークとのデータ相互授受機能により、さらに世界が広がります。

注：Spectra CalcはGalactic Industries Inc. の、IBM-ATはInternational Business Machines Inc. のそれぞれ登録商標です。

R-1000シリーズ日立核磁気共鳴装置

HITACHI Model R-1000 Series Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer

笹渕 仁* 七字 邦夫* 田中 保子**

(平成元年 1 月 20 日受理)

1. はじめに

NMR (核磁気共鳴装置) は、理学・工学・薬学など有機化合物を扱う広い分野で、有機化合物の構造解析や定量・定性分析に不可欠の分析装置として利用されている。さらに、有機合成の各段階でその過程のチェック用として、また、品質管理用としても広く利用されている。このような利用分野の拡大に伴い、装置に対する要求も多様化しており、高磁場機が要求される一方、有機合成材料の進歩やいっそう厳しい品質管理の面から、小形でより高性能、かつ操作性の良い装置が望まれている。

R-1000シリーズは、このようなルーチン分野での要求にこたえるため、最新のマイクロコンピュータ技術を導入して開発された水素核専用のコンパクトなNMR装置である。性能・機能・操作性各面から改良を進め、だれでも手軽に操作でき、かつ高品質のデータを提供することを目的としている。

2. R-1000シリーズの概要

現在市販されているNMR装置には、共鳴現象を観測する手法として、パルスを用いるパルスフーリエ変換法 (FT-NMR) と、連続波を照射しながら磁場または周波数を掃引する連続波法 (CW法) がある。今回さらに高速掃引を利用する高速掃引相関NMRを開発し、次の3機種のラインアップとした。

- (1) R-1500形フーリエ変換NMR
- (2) R-1200形高速掃引相関NMR
- (3) R-1100形CW-NMR

R-1500形はR-1000シリーズ最上位機種として、豊富なデータ処理機能を持ち、微量試料の測定や複雑な解析にも対応できる。R-1200形は初の高速掃引相関NMR専用機で、非常に簡単な操作で高分解能・高感度の測定ができる。R-1100形は小形NMRのパイオニアとしてベストセラーとなったR-24シリーズの後継機で、連続波法を採用しているが、分解能を自動調整する機能やデータ積算機能を加え、だれでも容易に高品質のデータを測定できるよう工夫されている。

R-1500形の外観を図1に、R-1200形の外観を図2に示す。

3. R-1500形FT-NMR

R-1500形FT-NMRは、3機種の中で最上位の機種で、パルスフーリエ変換法を採用している。この方式は感度・精度共に優れており、上位大形機種に一般的に採用されている方式である。また、R-1500形は多彩なデータ処理機能を持ち、多様な測定用途に対応できる。

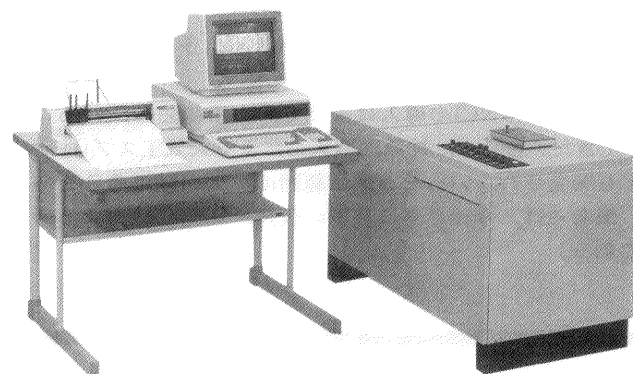


図1 R-1500形日立フーリエ変換核磁気共鳴装置

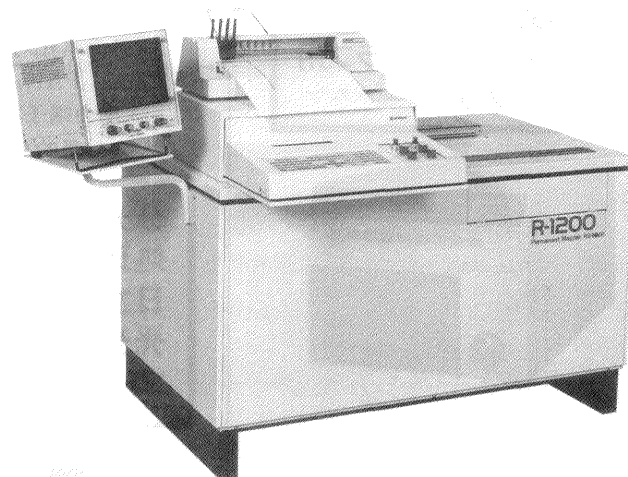


図2 R-1200形日立高速掃引相関核磁気共鳴装置

3.1 特徴

(1) 高感度

1回の測定時間が短く (5~10秒)、データ積算によるSN比改善効果大きい。

(2) 高安定・高精度

重水素核内部ロック方式を標準装備している。測定系・ロック系の周波数は相互に相関しており、周波数変動の影響を除去できる。高安定・高精度な測定が可能となった。

(3) メニュー方式によるワンタッチ操作

あらかじめ記憶されている標準的な測定条件で、簡単に測定可能である。

ユーザー独自の測定条件も、一度登録すれば、後はワンタッチで測定可能である。

* 株式会社 日立製作所 那珂工場 科学機器システム部
** 日立計測エンジニアリング株式会社 テクノリサーチセンター

(4) データ保存

5 インチフロッピーディスクに、8 k点データで40データ保存・再処理ができる。

(5) マルチペンカラープロット出力

スペクトル、スケール、パラメータ、ケミカルシフト値など、すべてのデータ情報を自動出力する。レポート形式でまとめられるので、その後の解析も容易となる。

4. R-1200形/R-1100形

R-1200形およびR-1100形は、共に磁場掃引型のNMRである。R-1200形はR-1100形の機能をすべて持つ上に、さらに高速掃引関連NMR機能、その他の特徴的な機能を付加されている。このため測定時間が従来の連続波法の $\frac{1}{10} \sim \frac{1}{20}$ と短時間で済み、測定効率が大幅に向上するとともに、感度・精度とも著しく向上している。

R-1200形、R-1100形ともに、マイクロプロセッサの導入によって分解能自動調整機能やデータ積算機能を備え、だれでも容易に高品質のデータを測定できるように工夫されている。

4.1 特長

(1) データ積算で大幅な感度向上

NMRの感度は積算回数 N の $\sqrt{N}$ 倍に比例して向上する。積算機能を備えることで、大幅な感度向上が可能となった。

(2) ノーロック自動分解能調整

NMR測定でデータの質を最も大きく左右するのが分解能で、従来個人差が大きく、また測定時間のかかる一因でもある。今回開発されたノーロック自動分解能調整システムは、特別な溶媒（重水素化溶媒など）もめんどろなロック操作も必要とせず、ワンタッチで調整可能となった。

(3) 磁場ドリフト補正機能

NMRのデータ積算のためには、高い磁場安定度が要求され、従来磁場ロックが不可欠であった。R-1200形/R-1100形では、磁場ドリフトをマイクロプロセッサで自動的に補正する機能を持ち、磁場ロックなしでも安定な積算が可能となった。

(4) 基準信号の指定

データ収集後に基準信号を指定し、スペクトルとケミカルシフトスケールを併せてチャート上に出力できる。この指定機能により、精度・操作性とも向上する。R-1200形では、各ピークのケミカルシフト値を併せて同一チャート上に出力するので解析も容易になる。

(5) デジタル積分

メモリ内のデータについてコンピュータ上でデジタル積分できるので、精度・測定効率・操作性とも向上する。

(6) マルチカラーペン付プロット出力

スペクトル、スケール、パラメータなどを、同一チャート上にカラー出力でき（4色）、レポート形式にまとめられる。

(7) データ通信機能

測定データをRS-232Cインタフェースを介して外部機器に出力可能である。これを利用してパーソナルコンピュータなどにデータを送れば、フロッピーディスクにデータを保存したり、さまざまなデータ処理を付加できる。

4.2 関連NMR

すでに述べたように、R-1200形は初の高速掃引関連NMR専用機であり、多くの特徴を持っている。

(1) 1回の測定時間が10～20秒とCW法に比べて短く（ $\frac{1}{10} \sim \frac{1}{20}$ ）、データ測定の効率が非常に高い。

(2) 1回の測定時間が短いため、多数回のデータ積算ができ、SN比が大幅に向上する。

(3) 1回の測定時間が短いため、室温変動など周囲の影響を受けにくい。高安定・高精度の測定ができる。

(4) 掃引によるピークのブロードニングがなく、分解能が向上する。また、ウィグルが現れないため、近接したピーク間の分離能力も向上する。

(5) ウィグルが現れないため、コンピュータによるケミカルシフトの自動出力が可能となり、データ解析の効率が向上する。

(6) 位相補正がデータ測定後でも可能で、測定効率が向上する。

(7) 部分測定が容易で、FT法では測定しにくい信号強度比の大きい試料の測定も可能である。

このように、高速掃引関連NMRは多くの優れた特徴を持つ手法であるが、データ処理演算量が多く複雑なため実用化が難しく、従来一部のFT-NMR装置で付属システムとして利用された例があるだけであるが、今回高速演算プロセッサの導入によって関連NMR専用機として初めて実用化したものである。

以下に、関連NMRの原理について簡単に説明する。

CW（連続波）法で、正しい線形をもったスペクトルが得られるには磁場、あるいはRF（ラジオ波）周波数の掃引速度が $1/T_1$ （ T_1 ：スピン-格子緩和時間）または $1/T_2$ （スピン-スピン緩和時間）に比べて十分小さい場合である。掃引速度が大きくなって、緩和速度のオーダーになると定常状態が崩れ、吸収線に過渡現象が現れてくるようになり、さらにはウィグルまたはリングングと呼ばれる現象を伴うようになってくる。

高速掃引したときの過渡現象がシグナルピークに及ぼす影響は、

- (1) 共鳴周波数のずれ
 - (2) シグナルの広幅化
 - (3) ウィグルがあらわれ近接したピークの観測が不能
 - (4) SN比の低下
- などである。

この過渡現象は、適当な高周波磁場の強さと掃引速度の範囲では掃引速度にだけ依存するものであり、掃引による単位時間当たりの周波数変化を b (rad/s²) とすると、時刻 t での角周波数 ω は bt であるため、過渡的現象 $E(t)$ は次式で表される。

$$E(t) = \exp(jbt^2) \dots\dots\dots(1)$$

(1)式の関数は図3に示すように、時間とともに周波数が高くなる。これは図4(a)に示すスペクトルのシグナルピーク後に続くウィグルに相当するものである。

このように高速掃引によって得られるスペクトルは、(1)式で示す過渡的現象を含んだものである。このスペクトルをフーリエ逆変換により、周波数領域から時間領域に移すと(2)式となる。

$$F(t) = h(t) \cdot \exp(jbt^2) \dots\dots\dots(2)$$

したがって、これを(1)式との相関をとれば、 $F(t)$ から磁

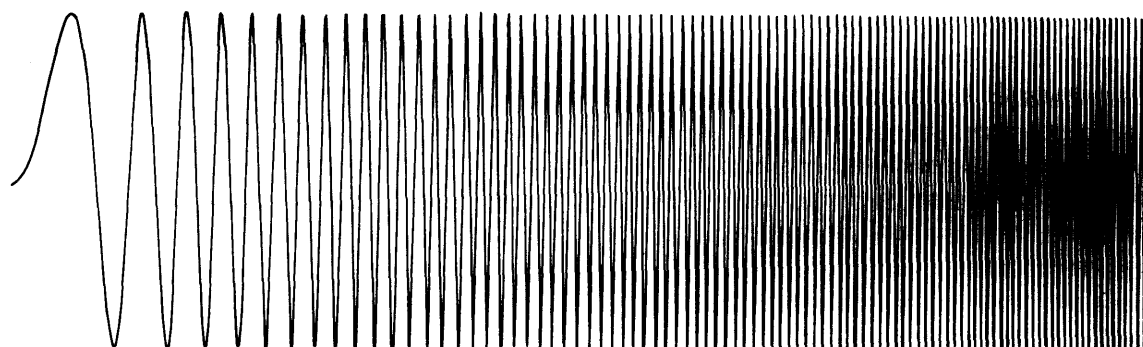
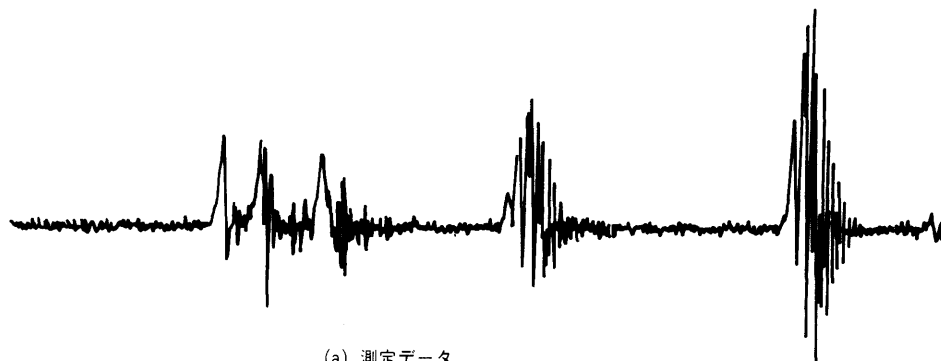
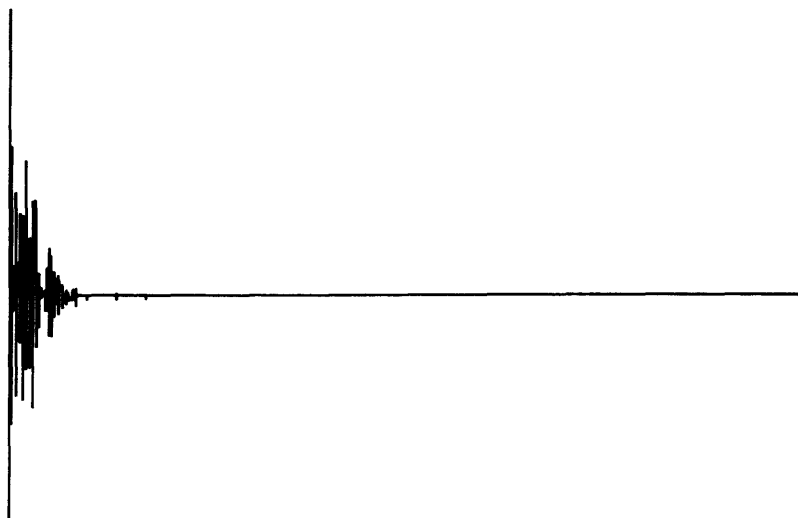


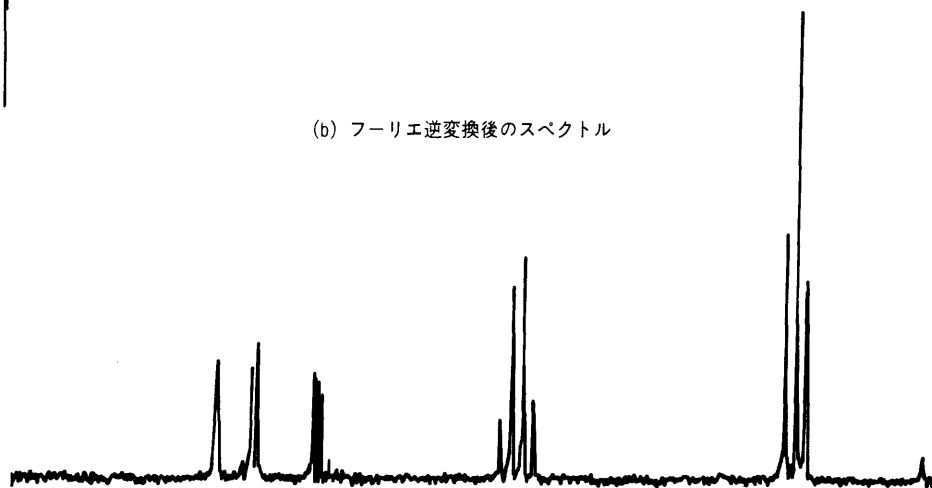
図3 $\exp^{jbt^2}$ 関数（虚数項の例）



(a) 測定データ

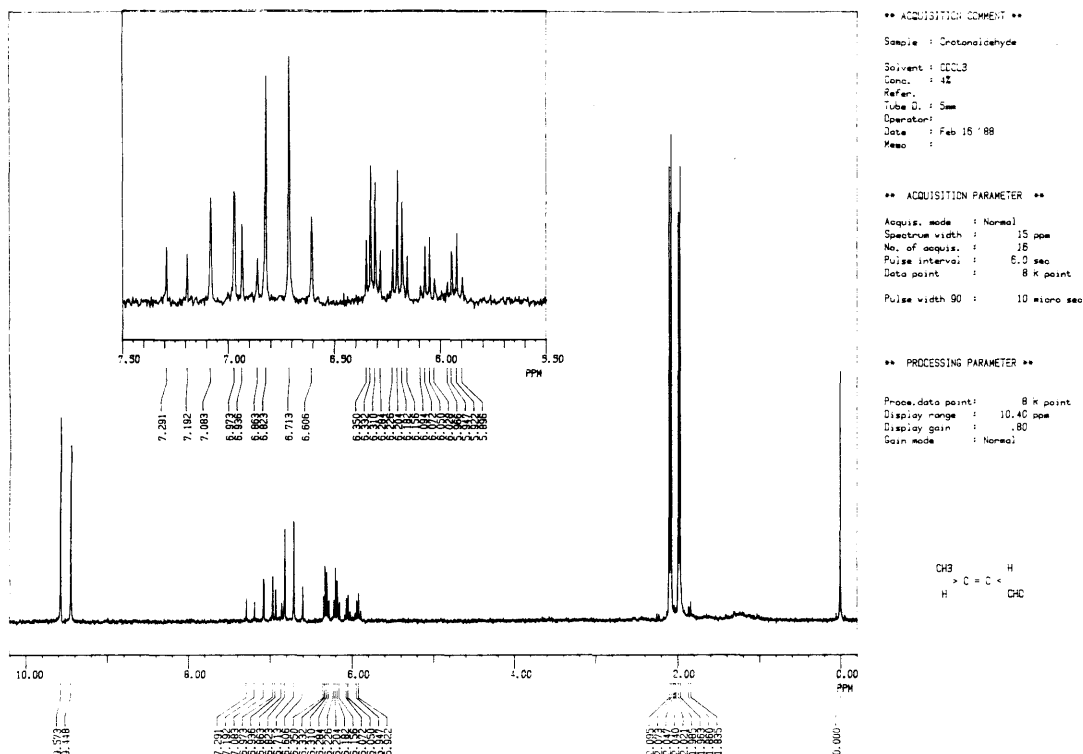


(b) フーリエ逆変換後のスペクトル



(c) 相関NMR処理後のスペクトル

図4 相関NMRデータ



[HITACHI R-1500]

図5 R-1500測定例-1 Crotonaldehyde

スペクトル・ケミカルシット・測定条件などをまとめて自動出力します。
近接したピークも良く分離できます。

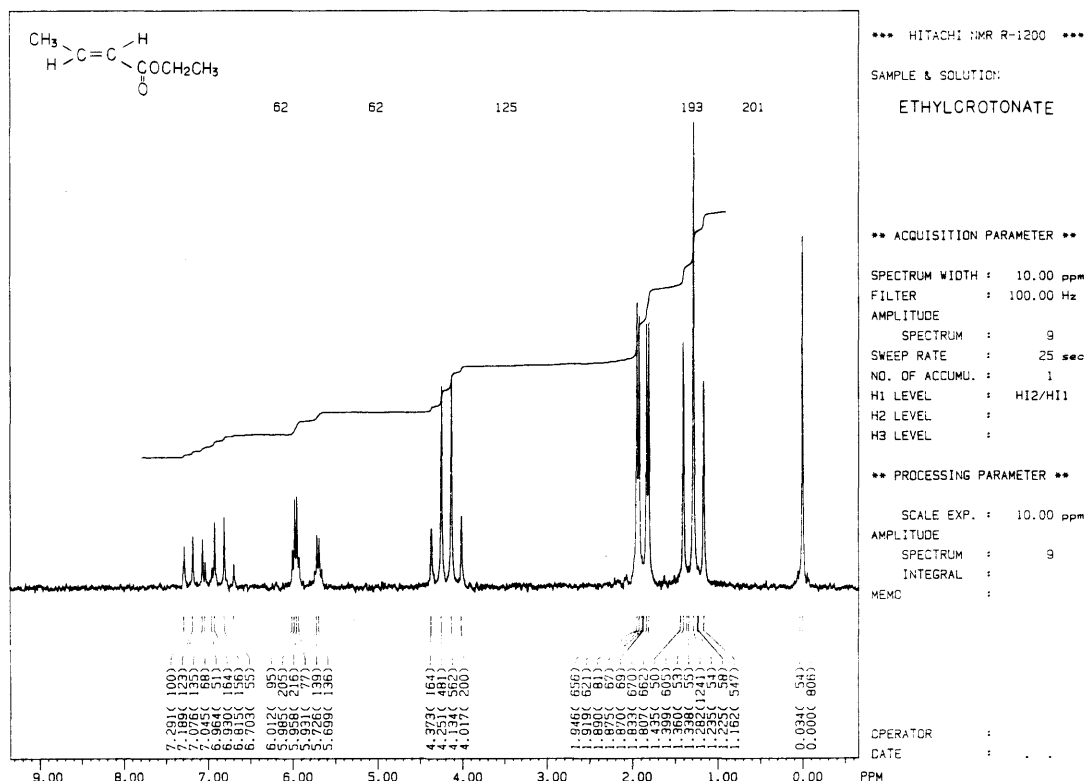


図6 R-1200測定例-1 Ethylcrotonate

ウィグルが現れないため、近接したピークもよく分離される。
ケミカルシフトやピーク強度も併せて出力できる。

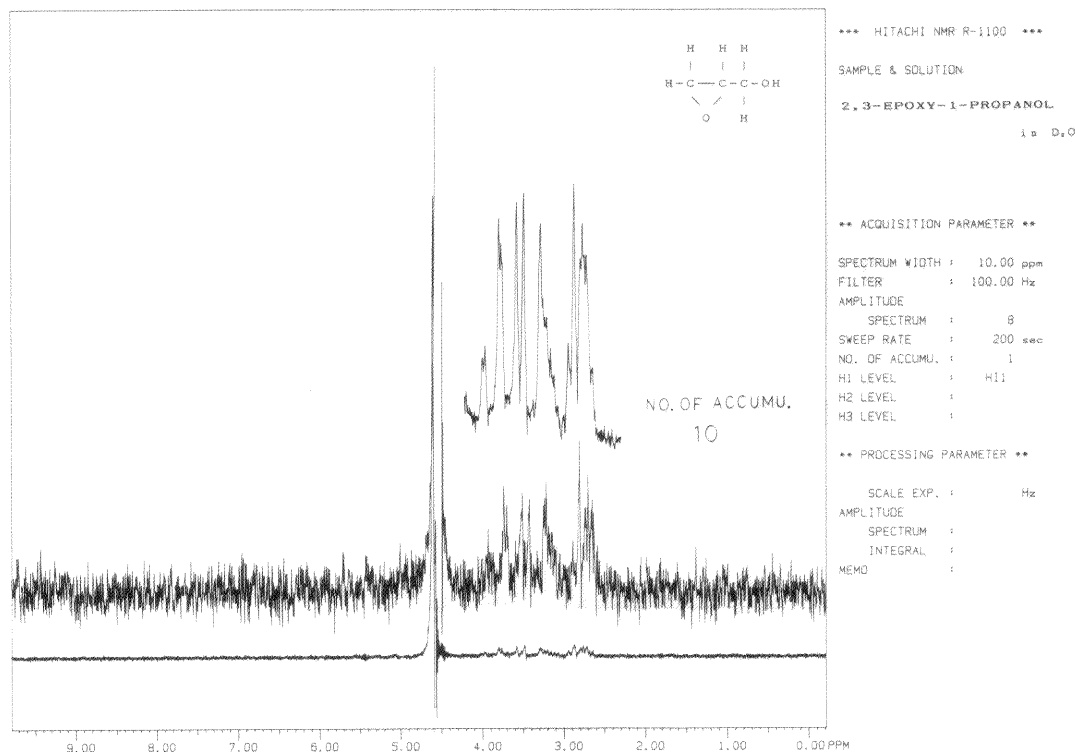


図7 R-1100測定例-1 2,3-Epoxy-1-propanol

SN比の小さい試料でも、部分積分により短時間で解析可能なSN比のデータが得られる。

場掃引による過渡的現象を取り除いて、純粋に緩和による減衰の効果だけを含む信号 $h(t)$ を取り出すことができる。ここで得られる $h(t)$ はパルス法によって得られるFID信号と等価である。したがって、 $h(t)$ をフーリエ変換することによって相関スペクトルが得られる。

次に具体的な処理手順を示す。

- (1) 高速磁場掃引によってデータのサンプリングを行う〔図4(a)〕。
- (2) サンプリングデータをフーリエ逆変換を行うことにより、周波数領域から時間領域にする〔図4(b)〕。
- (3) データに $\exp(-jbt^2)$ を掛けることにより、過渡現象

を取り除く。

この処理は、複素数の極座標表現で、座標系を逆に戻すことを意味する。

- (4) フーリエ変換を行い、時間領域から周波数領域に変換する〔図4(c)〕。

5. 測定例

R-1000シリーズで測定した例を、図5～7に示す。

6. おわりに

以上説明したように、R-1000シリーズは、マイクロコンピュータ採用による機能・性能・操作性の向上によって、いっそう研究・開発に役立つものと考えられる。

Topics

第27回分析機器展 開催さる

第27回分析機器展が、本年2月27日から3月2日まで4日間にわたり東京晴海で開催された。

今回は新館2階と西館を使用し、ゆったりとした雰囲気での展示会であった。

天候に恵まれない日もあったが、入



場者数約2万5,000人を数えた。

日立グループブースでは、超大形試料室を標準装備したU-4000自記分光光度計、FT-IRシリーズや、光度計用とLC用インテリジェントオートサンブラ、R-1100/1200形核磁気共鳴装置など

を新製品として展示し好評を博した。

今回の分析機器展では、新技術説明会が併設され4会場で60件の講演が各メーカーによって行われた。日立グループからは7件の講演を行い、多くの来場者を集めた。

例年本展と併行して行われる第24回応用スペクトロメトリー東京討論会は、3月1日から3日まで東京商船大学で行われた。日立からの発表は(1)イナートLC用セラミックポンプの開発、(2)分光イメージング装置の開発、(3)光学定数評価を目的とした分光光度計(U-4000)の3件であった。(松平俊次 記)

Topics

1988年度秋季MRS学会 開催さる



材料開発を志向したMRS (Materials Research Society) 学会が、昨年11月28日から12月3日の6日にわたって、ボストンのMarriott/Westinホテルの両会場で開催された。

本学会は、日本の応用物理学会の材料関連分野を抜き出したような性格を持っており、材料開発および評価に関しては、最も情報量の多い学会といえる。発表論文数は、ポスターセッションも含めて、2,116件に及び、参加者としては、7,000人を超えた（事務局からの情報）。

論文発表は、分野ごとに、AからYまでの25のシンポジウムに分類され、ポスターセッションも含めて、並行して進められた。

本学会のトピックスを拾ってみると次のとおりである。材料関連では、イオンビーム照射下の非平衡状態でのエレクトロニクスおよびトライボロギー関連の新材料の創造や高温超電導材料の探索、超電導ICを志向した超電導薄膜製作技術の開発などがあげられる。一方、材料評価関連では、超高分解能電子顕微鏡と試料作製法およびSTM (Scanning Tunneling Microscopy) を基本技術とした新しいAFM (Atomic Force Microscopy) の提案とその実験結果などが報告され、脚光を浴びた。

展示会は、出展数は144件と多かったが、会場のユーティリティの関連で大物装置は持ち込めず、装置とパネル展示がほぼ半々程度であった。主な展示内容は、半導体製造装置、超電導材料の評価を目的としたクライオスタット（冷却装置）、真空部品、電子顕微鏡な

どの材料評価装置などが挙げられる。

1989年度は、春季MRS学会として、San Diegoで4月24日から28日に開催され、また秋季学会は、今回と同一場所（ボストン）で、11月27日から12月2日にわたって開催される予定である。（田村一二三 記）

第8回日立MSユーザー ズカンファレンスを 開催

第8回日立MSユーザーズカンファレンスを平成元年1月11日日本工業倶楽部（東京）、1月12日、京都会場（京都）の両会場で開催致しました。本会も回を重ね8回となり、日立MSを通してユーザー間、ユーザーとメーカー間などの重要なコミュニケーションの場として定着してまいりました。東京、関西両会場とも150人を超える参加者があり、講師の先生方からの実際的なお話や活発な意見交換などが行われました。

東京会場では東大（医）の脊山先生から臨床病理診断へのMSの有効性について、東大（農）の山口先生からは極微量天然物分析へのGC/MSおよびバイオアッセイの併用について、先生方の苦労話を交えて門外漢にもわかりやすくご紹介がありました。関西会場では大阪市立大（生活科学部）の中谷先生から食用植物の化学物質の構造決定にGC/MS、SIMS、リンクドスキャンなどMSの種々の手法が役立っていることが紹介されました。大日本製薬（株）の吉田先生からはマスマスベクトル集積に際し、マスマスベクトルの「質」を保つための考慮すべき点などについての報告がありました。東京、関西両会場共通には、鐘紡（株）の栗田、能海両先生からLC/MSへの薬物代謝への応用、塩野義製薬（株）の中川先生からSIMS/MS/MSを駆使することによる配糖体構造決定について報告がありました。

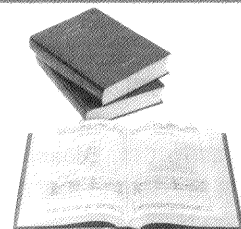
日立からは、新しいLC/MSのイオン化法として、大気圧スプレー法（APS）の紹介と応用、LC/API-MSによる負イオン測定などが紹介され、

よりLC/API-MSの応用面の拡大が示されました。

また講演会の後、約2時間の討論の場が設けられ、ユーザー側から忌憚（きたん）のないご意見、ご注文などが相次ぎ、メーカー側として責任の重さを痛感させられました。今後とも日立MSを通して、有意義な情報の交換の場として本会を盛り上げていきたいと考えております。皆様のご参加、ご活用のご希望申し上げます。

（加藤義昭 記）

日立液体クロマトグラフ 分析データ集の 発刊について



1962年、日立製作所では国産初のアミノ酸分析計（KLA-2形）を発表して以来、液体クロマトグラフィーに関して数々の装置の改良と分析法の開発を積み重ねてきました。

生体成分や無機イオンのように、多成分の分離分析を行う手段としての液体クロマトグラフィーは、カラムと溶離液の選択など、最適条件を得るための予備実験を行う時間を必要とします。したがって、得られた最適条件は分析に関係する皆様の共通のデータベースとしての価値を持っています。日立でもその蓄積に鋭意努力しており、テクニカルデータやHitachi Scientific Instrument Newsなどの技術資料として公表してまいりました。

今回、上記のような分析手法の蓄積の中から、約700例の代表的なクロマトグラフ測定例を選別し、私どものノウハウを解説として付け加えて1冊の本に集大成致しました。測定データは化学での分野別に分類するとともに、物質名の索引を添付して検索に便利のように工夫致しました。価格は5万3,000円で、日製産業株式会社各支店、営業所で取り扱っています。

第40回ピッツバーグ会議/ 展示会開催さる

本年のピッツバーグ会議は、ジョージア州アトランタで開かれた。講演会・展示会の規模が大きいため、例年、別の建物に会場を分割する方法がとられていたが、今回の会場であるGeorgia Congress Centerは講演会場と800社を超える展示会場のすべてを収容する巨大なものであった。

最近のピッツバーグ会議の傾向として、原理的に新しい技術ではなく、従来技術の延長線上の機器の用い方に重点の置かれていることが挙げられる。今回も、LC/MSをはじめとする各種の機器複合技術、分析機器のネットワーク、目的別専用システム化が脚光を浴びていた。展示会場で目についたのが、PCの活用及び各種機器のユーザーインターフェースのPCへの同化である。講演に関しては、Bioanalysis, Life Science関係の内容の比重がさらに高くなっていた。

日立関係は、Nissei Sangyo AmericaとHitachi Instrumentsを一体化して一つのブースでSEM、及び各種光度計の

展示を行った。またこのブースに今回初めて液体クロマトグラフが展示され、総合科学機器メーカーとしてのイメージが打ち出された。

講演会場では、日立から液体クロマトグラフ関係2件、FT-UV関係1件、原子吸光関係2件が報告され、それぞれに反響を得た。特に原子吸光での多項目同時分析に関する講演は、大会場が満杯になるほどの盛況であった。

(野上太郎 記)

第4回走査トンネル顕微鏡／電子分光国際会議(4th ICSTM/STS)開催のお知らせ

1986年にノーベル物理学賞を受賞した走査トンネル顕微鏡(STM)は、現在最も先端的な原子レベルの表面観察装置／電子分光装置として注目され、その多面的な装置開発が内外の多くの研究者によって進められています。さらに、その応用面は金属、半導体、セ

ラミックス、有機材料などの新素材開発だけでなく、DNA免疫などの生化学分野にまで広がろうとしています。今回は、初めてわが国で、しかも当地茨城県大洗町で開催されることになりました。以下にその要項をご案内させていただきます。

(永谷 隆 記)

記

1. 名 称

4th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy

2. 会 期

平成元年7月9日(日)～14日(金)

3. 会 場

大洗パークホテル

〒311-13 茨城県東茨城郡大洗町

磯浜8249-7

電話 (0292) 67-2171

4. 主 催

同上組織委員会

5. 共催／協賛

(社)応用物理学会ほか16団体

6. 連絡先

西川 哲治 (東京工業大学 総合理工学研究所)

〒227 横浜市緑区長津田 4295

電話 (045) 922-1111 (内線2621)

FAX (045) 922-5173

日製産業株式會社

本 社 電話 東京(03) 504-7211
 筑波支店 電話 土浦(0298) 23-7391
 千葉営業所 電話 千葉(0472) 47-4151
 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

札幌支店 電話 札幌(011) 221-7241
 北関東営業所 電話 大宮(048) 653-2341
 横浜支店 電話 横浜(045) 671-5421
 豊田営業所 電話 豊田(0565) 28-5191
 大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
 広島支店 電話 広島(082) 221-4514

仙台支店 電話 仙台(022) 264-2211
 西関東営業所 電話 八王子(0426) 43-0081
 新潟営業所 電話 新潟(025) 241-3011
 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

<編集後記>

■本号は質量分析の最新の応用について特集致しました。
 ■脊山先生には、医学における質量分析の役割と将来展望について巻頭言を頂きました。矢野先生には、ミコール酸含有糖脂質の構造と免疫薬理学的生理活性との関連について、日下先生には、LC/MSによる高級脂肪酸分析の高感度化のための誘導体化について、それぞれ報告して頂きました。日立・基礎研からはLC/MSの新手法であるAPSについて報告致しました。またLC/API-MSの新応用、負イオン測定及びR-1000形NMRについて解説させて頂きました。

■日立科学機器による報文のご投稿を歓迎いたします。
 ■本ニュースに関するお問い合わせは、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。

○日立計測エンジニアリング株式会社
 テクノリサーチセンタ

〒312 茨城県勝田市市毛882番地
 電話 勝田(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

〒105 東京都港区西新橋1-24-14

電話 東京(03) 504-7195(ダイヤルイン)

HITACHI
 SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
 MAY/JUN. 1989 VOL.32 NO.3

発行 平成元年5月1日(年6回発行)

発行人 岡本匡史

編集人 永谷 隆

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