

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 JUL./AUG. 1989
VOL.32 NO.4

U.D.C. 168.5:21

● 目 次 ●

生化学分析特集

——臨床化学へのアプローチ——

巻 頭 言

科学と宗教奥山典生- 1

報 文

LCによるアルツハイマー病の診断

.....眞重文子 佐久間一郎

高井信治 大久保昭行 4

光音響分光法による懸濁試料の分
析と免疫分析への応用.....

北森武彦 坂上正治 沢田嗣郎 - 9

黒鉛炉原子吸光度計による尿中
鉛の直接定量法.....道辻広美

大原昭男 山口恭平 藤本幸雄 -13

L-8500形日立アミノ酸分析計の直
線性範囲の検討.....馬場ますみ

青木勝洋 若林清史 鴈野重威 -18

解 説

¹³C/¹H-NMRスペクトルデータベ
ースによる検索/同定システム ..

田中保子 笹淵 仁 橋本正雄 -23

日立高速液体クロマトグラフ用前
処理機能付オートサンブラと、
これを用いたプリカラム誘導体
化.....平田源蔵 荻谷 薫

加地弘典 野上太郎 三浦順吉 -28

トピックス

S-2700/S-2400形日立走査電子顕
微鏡S-2500CA形日立走査電子X線分析
システムE-3100形日立フラットミリング装
置

EP-2000形日立イメージプロセッサ32

日本電子顕微鏡学会関東支部 昭
和63年度学術講演会開催さる第38回日本臨床衛生検査学会開催
さる

David C. Joy教授の講演会を開催17

生化学分析特集——臨床化学へのアプローチ——

巻 頭 言

“科学”と“宗教”

“KAGAKU”(Science) and “SYUKYO”(Religion)

奥山 典生*

今年の科学技術週間のテーマは「科学と歩もう、未来の世界へ」ということになっている。このようなテーマに関連して、今さらのようにいろいろの論議がなされている。たとえば、「科学には国境がないが、科学者には国境がある筈である」とか「日本の科学者に創造性や独創性が存在するか?」とか、あるいはまた、「科学と技術との相互関係」などがそのような論議のいくつかの例である。しかし、「科学」そのものについては自明のこととしてあまり議論されることはないようである。

さて、「科学」という言葉はScienceの訳語であるが、これは適切な訳語であるか否か?あるいはどのような概念上の相違点があるのかという事柄について考えてみたい。もともとScienceという言葉自身、その定義が明確ではないようである。またいつの時代から用いられはじめたのかもはっきりしない。しかし、語源的に見るとラテン語の“scientia”(=知識)から作られたと考えられるし、その時期は17世紀のはじめの頃であったと思われる。もちろん、現在では、“Greek Science”とか“Ancient Science”とか記述されるように、古い時代にもScienceとして取扱い得るような学問分野は存在した筈であるが、その時代にはScienceという用語は存在しなかった筈である。むしろ“philosophy”という用語が一般的であった筈である。現在、Webster, Oxfordなどをはじめ、各種の辞書では“scienceとは知識化された知識”という説明がなされているが、これはHuxleyによるものであるといわれている。しかし、1880年代のEncyclopedia Britannicaには、まだ“science”という項目は取上げられていなかったようである。このような時代においては、当然のことながらphilosophyとscienceとの差も明確ではなく、ただその研究手法の差として認識する他はなかったようである。

このように、scienceそのものの議論がヨーロッパにおいて進んでいる間に、日本においては、すでに1874年に“科学”という和製漢語があらわれてくる。この用語は、福沢諭吉による“一科一学”あるいは、西周による“百学連環”(Encyclopedia)



* 東京都立大学 理学部 教授、理博

に関連して“百科の学術”の縮小語として用いられ始めたということである。このような科目別の学問、あるいは学域別の学問という考え方は、少なくとも当時のヨーロッパにおけるscienceについての概念に新しい解釈を加えたということになる。このような考え方は、日本人にとっては科学を実用の学という面から取入れるのに容易となり、同時に官僚的な管理をするという面においても極めて容易となった。たとえば、文部省の科学研究奨励補助金の分類を眺めると、昭和60年度の場合では、8部門、63分科、171細目にわけられている。また、各大学の講座構成も、大体上記のような分類に従っている。さらにまた、かつては、「東京大学の教授の数だけ学会が存在する」などといわれたこともある。このような大学と学会の管理体制が成立していくと科学者は一つの学域に閉じこもって研究し、他の学域には無関心であってもよいし、また、そうあるべきだという考え方も生まれてくる。このような体制は、後進グループにとっては極めて有効な体制であり、日本の科学の発展はこのような状況のもとに大きく進歩した。また一方このような体制は、一面においてJ.D.Bernalによって指摘された次の批評につながるものである。「日本の研究の大部分は、ドイツとアメリカの双方の科学の欠陥をさらに誇張した形としてもっているように思われる。それは凝りすぎであり、術学的であり、想像力に乏しく、しかも不幸にして多くの場合、無批判で不正確である。」この表現の最後の不正確という点だけは受け入れられないが、あとは、まあまあ妥当な批評ではないかと考える。このような日本の科学の特質、あるいはヨーロッパのscienceとの相違をその文化的な背景の中に求めている。しかし、どのような文化的な特質が日本にはあるかという事柄については何も指摘してはいない。その意味ではBernalの批判は片手落ちであると言うべきであろう。すなわち、日本の科学の特質は、その訳語のなす通り、設定された学域の中でformat化された手法によって徹底的に研究を行うというものである。従って、比較的新しく設定された学域の中での日本の科学者の活躍はむしろ目覚ましいものがある。この点は、Bernalが指摘し得なかったところである。日本の科学者の弱点は新しい学域の設定を行わない点である。あるいは“科学”の定義に立ちもどれば、新しい学域の設定を行わない方が、その定義に合致しているようにも思われる。この点が科学とscienceの差かも知れない。

ところでこのような文化的特質の差というように記述されたものは、究極的には、宗教の相違に求めるべきと考えられる。すなわち、日本のような多神教あるいは汎神教の国と、キリスト教のような一神教という宗教を持つ国との相違ではなからうか？（この“宗教”という用語も、ほとんど和製漢語だそうである。）

さて、上述のような“百科”という学域はどのように設定するのであろうか？ 大きさからいえば、0 mから 10^{26} mまでの領域、つまり0から宇宙の半径の大きさまで、時間ではBig BangからBig Clanchまで（ 10^{23} 年）の2つの座標によって示される領域で、好みの大きさの学域を設定すればよいのであるが、科学であれ、宗教であれ人間の創造物であるから、人間の生活に近いものほど時間-空間領域は

小さいのにも拘わらず、大きい学域として設定される。たとえば、医学は人間の生活上に非常に重要視されており、一見非常に大きく見え、大きな学域として設定されているが、一般的な分類から考えると、生物学の中のヒトの領域であり、しかもその異常な状態を正常化するという小さな領域の話である。また、文学なども同様で、日本人にとっては他の国の言葉よりも日本語が重要なので、日本の中では国文学あるいは国語学は比較的大きな学域となっている。このように、多くの学域がその時代の進歩とともに設定されていくのであるが、これをあるがままに“百科”の学域として受け入れ、学域間の相互関係などについてはあまり議論をしないというのが、日本の科学の立場のようである。すなわち、自己の領域に立てこもって他の領域については批判をしない、あるいはまた全く議論をしないで他の領域を無視するというのがその方式である。このような状況は、全く日本の宗教の傾向と一致している。日本の古来からの宗教は神道ということになっているが、^{ひたすら}八百万の神々が居ることになっている。そよだけでは足りなくて、明治神宮を作り、松陰神社を作り、乃木神社、東郷神社から靖国神社まである。さらにまたこの宗教は、外来の神々をたいした抵抗もしないで受け入れてきた。1984年度の統計によると、神道系の信者数約9,554万人、仏教系の信者数8,272万人、キリスト教系の信者数117万人、その他諸教系の信者数3,768万人合計2億1,711万人となるが、日本人の人口は1億2,000万人である。つまり信者数が人口のほぼ2倍に達するのである。

すなわち、このようないいかげんさが日本の科学にもあるということになる。日本では「理窟はそうであっても、現実とは違っている」というような表現がなされるが、ドイツ人によれば、恐らく「理窟がそうであるから、現実もそうである筈だ」という表現になるであろう。あるいは先日、朝日新聞の論説にもあったように、「文科の人間と理科の人間が相互に不信を抱き合い、あちこちで不協和音を発する」というような表現があった。このような表現は基本的に不合理で、人文科学も自然科学も基本的には合理性に基づいているわけであるから、上記の表現は非合理人間と合理人間とでもしなければならぬし、また「科学的に正しいのに人間が説得できない」というのは現実には起こり勝ちであるが、もし決着をつける必要があるときには、論理的な結論に従うべきであろう。日本の場合には、ある神様に頼ってうまくいかないときには、他の神様に頼るという超理論的な決着を行う場合が多く、そのため、反科学というような立場を採ろうという人々も非常に多い。

このような日本の宗教的な背景に対して、scienceはキリスト教の国々で始まったものである。すなわち、唯一の神の完全性を理解するために、その神が創造した自然を研究するという立場がその出発点であり、natural philosophyというよりも、natural theologyがその基本となっている。単に知識を得るだけならば、ネズミでも行うことができる。これを整理し、まとめ上げて、そこに存在する自然の法則あるいは神の意志を知ることがscienceの目的であるように思われる。このような一つの領域が一つの学域である。従って、多くの学域を統合して、神の意志をさらに知ろうと

試みるのがscienceである。従って全く妥協を許さないし学域相互の間にも整合性がなければならぬし、基本的には立場が異なるから相互に理解しあわなくてもよいという論理は成立しない。この点で、日本語訳の科学と非常に異なっている。従って、知識の集積の状況によっては当然新しい学域を設定しなければならないし、十分に他の分野との整合性も採っていなければならないということになる。このような状況のもとでは、scienceの結果を認めることは神の意志により近づくということになる筈である。もしこれが教会であれば、神を信じない人は、その教会から排除されることになる筈であるし、そのようなことが起こらないように十分な説得が行われる筈である。また教会から破門された人は、その社会では十分な生活がおくれなくなる筈である。このような立場での研究であるために、研究の対象に対して謙虚な姿勢が保たれ、また情熱的な探究が続けられる。単に好奇心のみの研究はネズミの行動と同様であり、日本の科学と立場が似てくることになる。このあたりに、キリスト教に根ざした近代科学の発端があることを十分に評価しなければならないし、この点から考えると、多神教であったギリシャのscienceはphilosophy (=love of wisdom) であり、むしろ日本の科学の立場に似ている。また、用いられた研究手法がscienceのものと異っていたため、次第に没落していくという方向にあった。

アメリカの科学者は必ずしもヨーロッパのものとは一致していない筈であるが、基本的にはキリスト教、ユダヤ教などの一神教が中心であることから考えると、ヨーロッパと同様の線上にあると考えられる。昨年、アメリカのバージニア大学の先生達と、最近の日米貿易摩擦などの問題点とも関連して、上述のような日本の科学とヨーロッパの科学の比較の話をした。非常に興味をもって聴いてくれたようであったが、結局は理解するまでには至らなかった。すなわち、一神教同士の場合には、その対立が先鋭化し勝ち

である。アメリカにはいろいろの宗教の人々が住んでいるが、国としての運営の場合には、その宗教色を消しながら進んでいるようであるが、科学の領域では、キリスト教あるいはユダヤ教のような一神教的な流れが中心のようである。日本の科学は、基本的にはその進む方向を定め切れないので、長い目でみるとヨーロッパの科学の流れによってその進路を常に補正しているようである。このような点を考えると、欧米で良い研究を行った人が日本に帰ってきて研究が発展しないのは、極めて順当な成り行きである。

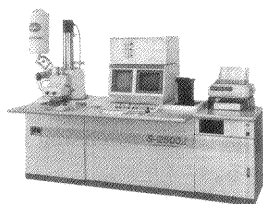
このような事柄を考えていくと、日本の科学の独創性は、一つの学域内の研究を極端にまで押し進めるような研究のみから生じてくるように思われる。また、科学にも科学者にも国境はあるように思われる。たまたま最近、科学の統合についてのシンポジウムが開かれたりする機会が増えているが、このような議論は、むしろscienceの原点に帰ることが重要であり、とくに日本には、そのような原点が存在しないということを認識した上で、ヨーロッパなり、アメリカなりの科学との接点を探る必要があるのではなかろうか？と考えられる。

筆者略歴

昭和27年3月	大阪大学 理学部化学科卒
昭和32年3月	大阪大学 理学研究所(旧制)修了(理学博士)
昭和32年4月	東京都立大学 理学部 化学科助手
昭和34年4月	東京都立大学 理学部 化学科助教授
昭和48年	東京都立大学 理学部 化学科教授 (生物化学講座)
昭和34年~36年	Worcester Foundation for Experimental Biology (Mass. U.S.A.)
昭和45年~46年	Uppsala University (Sweden)
昭和46年	Max Plank Inst. für Biochemie (München BRD)

Topics

S-2500C△形 日立走査電子X線分析 システム



物の表面を拡大し微小な形態を観察する道具として、走査電子顕微鏡が定

着してきました。形が見えるとそれが何であるか知りたくなるということで、走査電子顕微鏡にX線分析装置(EDX: Energy Dispersive X-Ray System)を装着するケースが増えていきます。

従来、走査電子顕微鏡とEDXは独立の装置として別々に操作する必要がありました。S-2500C△形は、最新形の走査電子顕微鏡とEDXをドッキングし、一体操作を可能としたものです。

■ 特 長

(1) モニタと操作卓を一体化

SEMとEDXのCRTモニタおよび操作パネルを集約し、操作位置を移動する必要がありません。

(2) 操作の一体化

SEMのコントローラとEDXのコントローラを通信機能で連結し、データの再入力や転記が不要となり、間違いがなくなり効率が向上し、また連動動作が可能となりました。

■ 主な仕様

SEM分解能:	4 nm
加 速 電 圧:	0.5~30 kV
最大試料寸法:	200 mm径
X線取出角度:	35°
X 線 分 解 能:	146 eV (Mn Kα) 109 eV (Fe Kα)
分析元素範囲:	B~U
ソフトウェア:	定性分析 定量分析(ZAF補正) 画像処理
オプション:	試料微動コントロール

報 文

LCによるアルツハイマー病の診断

The Diagnosis of Alzheimer Disease by an HPLC

眞重 文子* 佐久間一郎** 高井 信治*** 大久保昭行****

(平成元年 4 月 7 日受理)

1. はじめに

現在、我が国は急速に高齢化社会に移行しており、それに伴って様々な問題が提起されている。なかでも老人性痴呆症は、「恍惚の人」で知られているように周囲に多大な影響をもたらす為、その対策は社会の重要な課題となっている。

老人性痴呆症の原因はいまだ解明されていないが、老人性痴呆症においては体液や組織中の神経伝達物質の異常が知られており、診断や治療の上で神経伝達物質の測定は不可欠である。これらの神経伝達物質は、現在知られている物質だけでも40種類を越え、その上極微量しか存在しないので、その測定には高度な分析法が要求される。現在では神経伝達物質は、単一かあるいはグループごとに測定されている場合が多い。しかし多彩な神経伝達機構を知る上には、なるべく多くの神経伝達物質を同時に測定できることが望ましく、神経伝達物質の一斉分析法の開発に大きな期待が寄せられている。

我々はこれまでに土肥健純教授(東大工学部)とともに多波長検出HPLCシステムの開発を行ってきた。その経験をもとに、現在マルチ電気化学検出器(ECD)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による神経伝達物質の一斉分析システムの開発に取り組んでいる。マルチ電気化学検出器による方法は、すでにW.R.Matson¹⁾により報告され、その装置は昨年日本に導入された。それに比較すると我々の研究は遅れているが、我々の特色を生かしたシステムの開発ができれば幸いと思っている。実際に開発に取り組んでまだ日も浅く、現在、4チャンネルの電気化学検出器によるHPLCシステムが軌道に乗り、他方、2チャンネルで生体試料の分析を行っているところである。

ところで、これらの研究結果を報告する前に、痴呆および神経伝達物質について概略を述べたいと思う。

2. 痴 呆²⁾

痴呆には、脳血管の障害によって起こる脳血管性痴呆と、脳の細胞そのものの変性によって起こるアルツハイマー病およびアルツハイマー型痴呆がある。アルツハイマー病は初老期(40~65歳)に発病して、特有な精神神経症状のみられる進行性痴呆であり、アルツハイマー型痴呆は65歳以上で発病する原因不明のいわゆる老人性痴呆を言う。しか



し、この両者の疾患は病理学的に本質的な差は見出されず、現在は同一の疾患と考えられており、両者を一括してアルツハイマー病あるいはアルツハイマー型(老年)痴呆と呼ばれている。

全痴呆のうち欧米ではアルツハイマー型痴呆が過半数を占めているのに対し、日本では血管性痴呆が過半数を占めている。しかし、日本においても高齢化とともにアルツハイマー型痴呆が確実に増加している。ところで、アルツハイマー型痴呆はまだ原因がわかっていない。現在その原因として考えられているものに遺伝子の異常、極端な脳の老化、免疫異常、スローウイルス感染、アルミニウムなどの微量金属中毒などがある。現在、老人性痴呆の研究は多方面から熱心に行われており、その原因の解明に一步一步と近づいているようである。

3. アルツハイマー病患者における神経伝達物質の異常^{2),3)}

神経刺激が軸索内を伝播し神経終末に達した後、シナプス間隙を通過して次の神経細胞に伝わる。このシナプス間隙の伝達は神経伝達物質を介して行われる。神経伝達物質は現在知られているだけでも40種類はあり、アセチルコリン系、ノルアドレナリン系、ドーパミン系、セロトニン系、アルギニン・バゾプレッシン系、アミノ酸、活性ペプチドなどに分類される。

アルツハイマー病の脳組織では神経伝達機構の異常が明らかにされている。中でもアセチルコリン系(アセチルコリンエステラーゼ活性、コリンアセチルトランスフェラーゼ活性)の低下は最も著明であり恒常的である。その他セロトニン系、ノルアドレナリン系、ドーパミン系、アルギニン・バゾプレッシン系、Corticotropin-releasing hormoneなどにも異常が指摘されている。

ところで日常の痴呆症の検査に脳組織を使用することは不可能である。それに代わるものとして脳脊髄液(髄液)中の神経伝達物質が測定される。髄液は脳や脊髄を覆って

* 東京大学 医学部 臨床検査医学講座 助手(写真)
** 東京電機大学 理工学部 応用電子工学科 助手、工博
*** 東京大学 生産技術研究所 助教授、工博(写真)
**** 東京大学 医学部 臨床検査医学講座 教授、医博

おり脳の生化学的な活動や異常をおおむね反映する。アルツハイマー病の髄液ではアセチルコリンエステラーゼ活性、ソマトスタチン濃度が低下している。またγ-アミノ酪酸濃度、神経ペプチド濃度、モノアミン代謝物ではHVA、5-HIAAの濃度低下傾向がみられる。しかしこれらは症例により異なり、初老期発症の患者の方が高齢発症の患者より著明なことが多い。

4. カテコールアミンおよびセロトニンとその代謝物のECD-HPLCによる測定

今回、我々が測定したのはカテコールアミンおよびセロトニンとその代謝物のうち図1（表1参照）に示した14種類である（以後、これらを神経伝達物質と略す）。これらの電極上での酸化還元反応を図2に示す。電気化学検出器（ECD）を用いたHPLCによる体液中のカテコールアミン類の分析はすでに日常化されているが、体液中にはECDに反

応する物質が多数存在する為、従来では測定目的物質をある程度抽出精製した後測定していた。人体に存在するカテコールアミンとその代謝物はおおの化学的性質を異にする。例えば酸も塩基もあり、極性度も大幅に異なる。また表1のように含まれる濃度もまちまちである。その為神経伝達物質を総て抽出する方法は現在のところ見あたらず、グループごとに抽出し測定しているのが現状である。ところでマルチ電気化学検出器を用いた場合、試料中に電位の低いときには電解されず、電位が高くなって初めて電解が起こる物質と、極めて低い電位でも電解される物質が共存したとき、完全に分離されていなくても、また場合によっては、全く分離できていなくても、分けて測定することが可能である。しかし、マルチ電気化学検出器-HPLCシステムにより生体試料中の神経伝達物質の測定が前処理せずに、あるいは除蛋白の操作だけで測定可能なのであろうか。こ

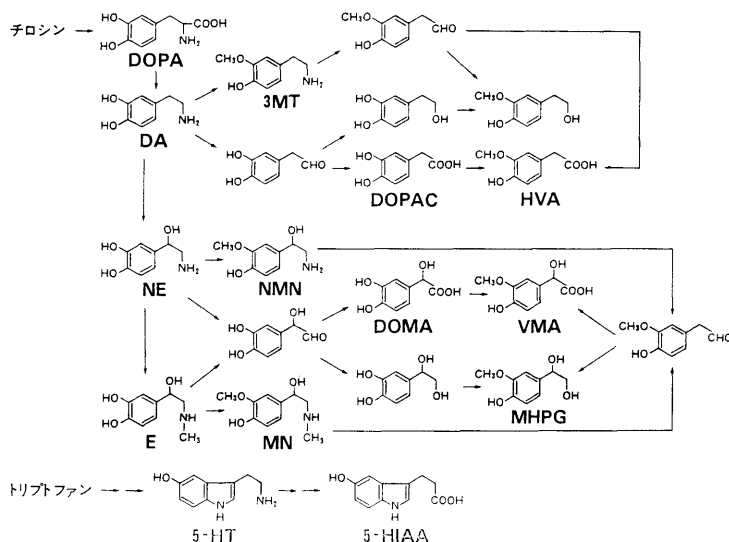


図1 カテコールアミンおよびセロトニンとそれらの代謝物

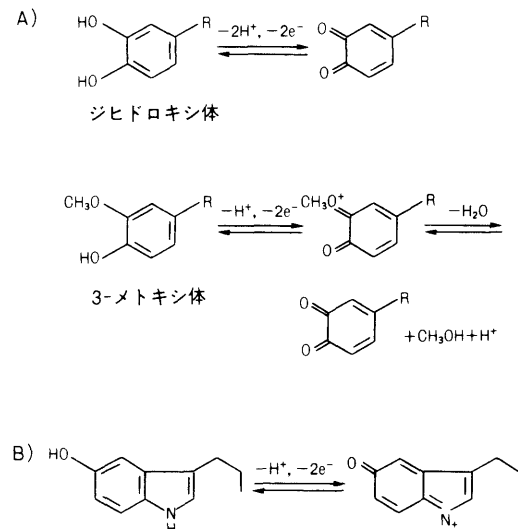


図2 カテコールアミン類(A)および5-HT, 5-HIAA(B)の電極上での酸化反応

表1 記号および正常値の一覧表

記 号	化 学 名	成 人 正 常 値		
		髄液(ng/ml)	血しょう(pg/ml)	尿(μg/day)
DOPA	ドーパ		2080 ~ 3386	30
DA	ドーパミン		0 ~ 66	177 ~ 298
NE	ノルエピネフリン	0.1	187 ~ 372	25 ~ 37
E	エピネフリン		28 ~ 42	6 ~ 10
3-MT	3-メトキシチラミン			
DOPAC	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸	0.4 ~ 11	700 ~ 2000	1004
HVA	ホモバニリン酸	10 ~ 47	9800 ~ 31800	3200 ~ 6200
NMN	ノルメタネフリン	0.164	458	30 ~ 284
MN	メタネフリン		433	34 ~ 174
DOMA	3,4-ジヒドロキシマンデル酸		0 ~ 360	
MHPG	3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルエチレングリコール	0.9 ~ 36	3200 ~ 14500	1408 ~ 3126 *
VMA	バニルマンデル酸	0.3 ~ 0.7	9000 ~ 11800	2300 ~ 4900
5-HT	セロトニン	0 ~ 13 *	100000 ± 192000 *	60 ~ 160 *
5-HIAA	5-ヒドロキシインドール酢酸	5 ~ 34.7 *	200 ~ 400 *	2000 ~ 10000 *

* 日本臨床, 1985年秋季増刊, 血液・尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか—(上巻), 日本臨床社, P.862~P.864, P.1129~P.1142から引用。
他はB. KAGEDAL, J. Chromatogr., 429, 177~233, 1988. から引用。

の点については疑問の多いところである。

今回我々の研究結果を(1) 2チャンネルECD-HPLCによる神経伝達物質の測定, (2) 4チャンネルECD-HPLCでの神経伝達物質の測定に分けて述べる。

4.1 2チャンネルECD-HPLCによる神経伝達物質の測定⁴⁾

(1) ECD

作用電極にグラッシーカーボンを使用したボルタンメトリックECDを用いた。

(2) 分離モードとカラム

分離モードは逆相分配クロマトグラフィーで行った。シリカゲルC₈, C₁₂, C₁₈シランで化学修飾したシリカゲルを充填したカラム (4 mm×150 mm) について分離条件を検討した。どのカラムも溶離液中のメタノール濃度と1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム (HSA) の濃度を変えることによ

って、神経伝達物質を分離することができた。最も良好な分離を示したのがC₈およびC₁₈であった。今回は日立3057 (ODS, 3 μm, 4 mm×150 mm) での基礎検討結果を述べる。

(3) 溶離液

溶離液のpHが高くなるに従って、DOPAと5-MTの保持時間がやや短くなる以外は殆ど変動はみられなかった。(図3)。HSA濃度が高くなるにつれて、側鎖に一級あるいは二級アミノ基を持つものは保持時間が長くなった(図4)。メタノール濃度が高くなると総ての物質の保持時間は短くなった(図5)。以上の結果から用いた溶離液は2.15 mM HSA, 20 mg/l EDTA, 10%メタノールを含む0.05 Mクエン酸緩衝液 (pH 3.0) である。

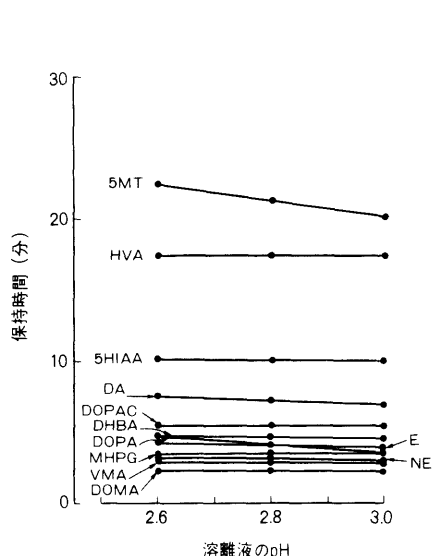


図3 溶離液のpHと保持時間の関係

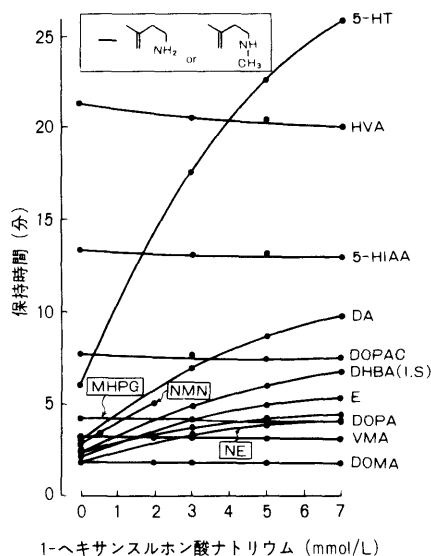


図4 イオンペア試薬の保持時間への影響

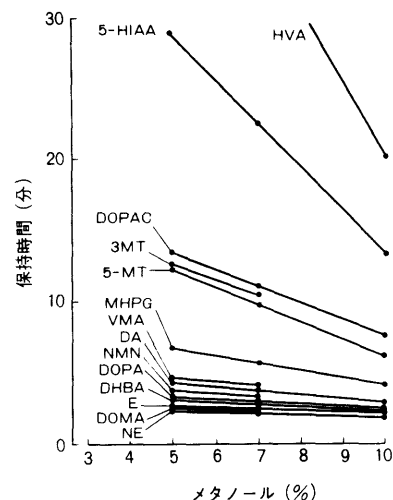


図5 メタノール濃度と保持時間の関係

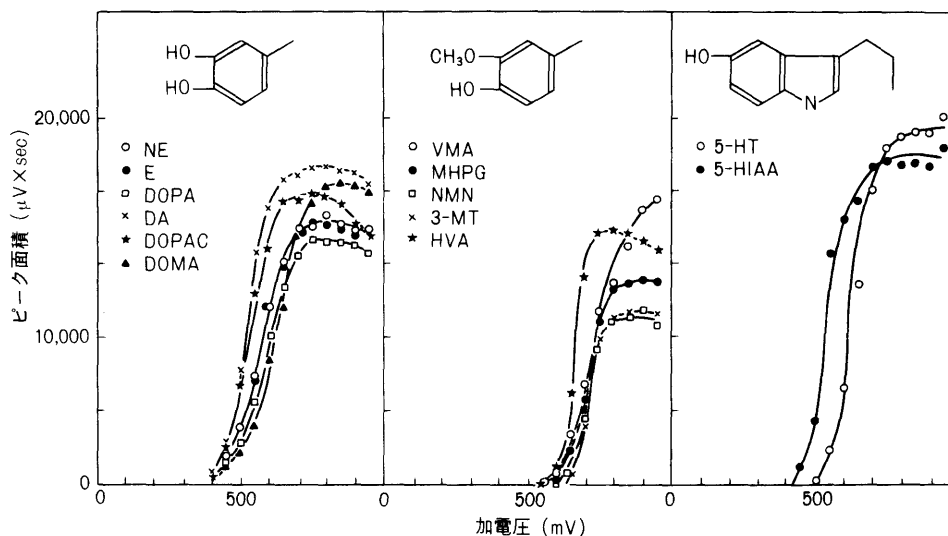


図6 ボルタムグラム

表2 測定条件

E C D ; 二作用電極方式 (E1 : 500mV, E2 : 700mV vs Ag/AgCl)
 分離カラム : 日立3057(ODS, 3 μ m, 4mm $\times$ 150mm)
 移動相 : 0.05M クエン酸緩衝液(pH3.0)
 2.15mM HSA
 10% メタノール
 20mg/l EDTA
 流速 : 0.5ml/min
 カラム温度 : 室温

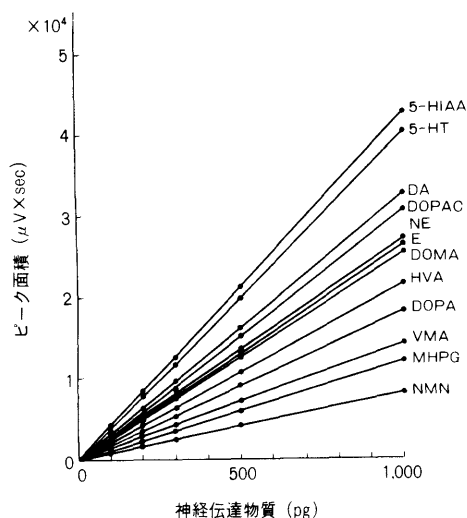


図7 直線線 (700 mV)

(4) ボルタムグラフ

図6は標準物質を使用して作成したボルタムグラムである。カテコール核を持つ物質 (同図左) は400 mVから、C₃位がメトキシ基である代謝物 (同図中央) は600 mVから、5-HT及び5-HIAA (同図右) はそれぞれ400 mVおよび500 mVから酸化電流が生じる。

電極の加電圧の選択は、ボルタムグラムから最も効果がある電圧を低い電位から高い電位の順に選ぶことであるが、他にサイクリックボルタンメトリーで測定する場合は異なった選択をする。生体試料中には電極上で可逆的に酸化還元反応を示す物質と不可逆的に反応する物質が存在している。このような場合、最初にある程度高い電圧をかけ、その後、還元電流が流れるぐらいの低い電圧をかけると応答の良い、逆性物質を測定することができる。また、この方法で、共存する不可逆性の影響物質を除くことも可能である。

今回は、2チャンネルにおいて、500 mV (カテコールアミンは酸化電流を生じ、3-メトキシ体では酸化電流が生じない) と700 mV (両方とも酸化電流が生じる) を選んだ (800 mV以上になると生体試料中の共存物質の影響が大きくなる)。

(5) 検量線

表2の測定条件で (ただし加電圧は700 mV)、市販標品を用いた検量線を図7に示した。いずれも良好な直線性を示している。

(6) クロマトグラム

図8に標準物質 (300 pg) のクロマトグラムを、図9に髄

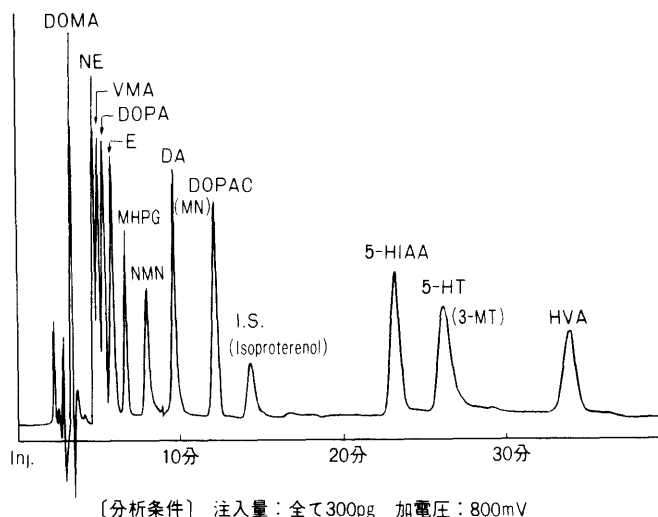


図8 標準液のクロマトグラム

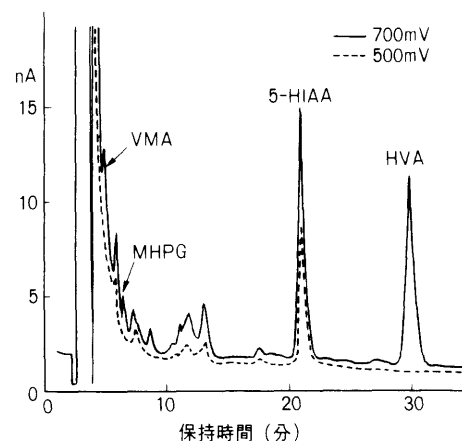


図9 髄液のクロマトグラム

液を50 μ l注入したクロマトグラムを、また図10に尿からの抽出液のクロマトグラムを示した。

(7) 髄液中

40例の患者髄液を測定したところ、水頭症で5-HIAA、HVAが著明に増加していた。神経伝達物質の相互の関係は5-HIAAとHVAの間に高い相互関係 ($r=0.842$) がみられたが、5-HIAAとMHPG、HVAとMHPGの間には相互関係は見られなかった (表3)。

4.2 4チャンネルECDを用いた神経伝達物質の多成分同時検出システムの開発^(5,6)

(1) ハードウェアの構成

本システムは生体液などの試料液中の神経伝達物質を分離する分離部、分離した各成分を検出し、定量する検出部、検出部からの出力値を処理する計測データ処理部からなる。図11に開発したシステムの構成図を示す。

(2) HPLCの測定条件

分離カラム、溶離液、流量は2チャンネルと同一である。

(3) 検出部

測定形式は、ボルタンメトリーで作用電極にグラッシー

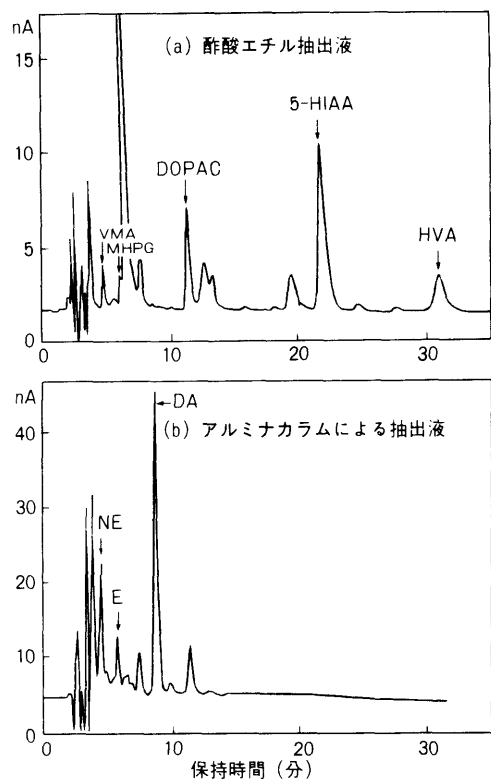


図10 尿抽出液のクロマトグラム

表3 患者髄液中成分の相互関係

	総蛋白	細胞数	MHPG	5HIAA
MHPG	0.369 * (47)	0.029 (47)		
5HIAA	0.215 (47)	0.144 (47)	0.387 * (51)	
HVA	0.067 (47)	0.070 (47)	0.291 (51)	0.842 *** (51)

数字：相関係数，() 検体数，* $t=5\%$ ，*** $t=0.1\%$

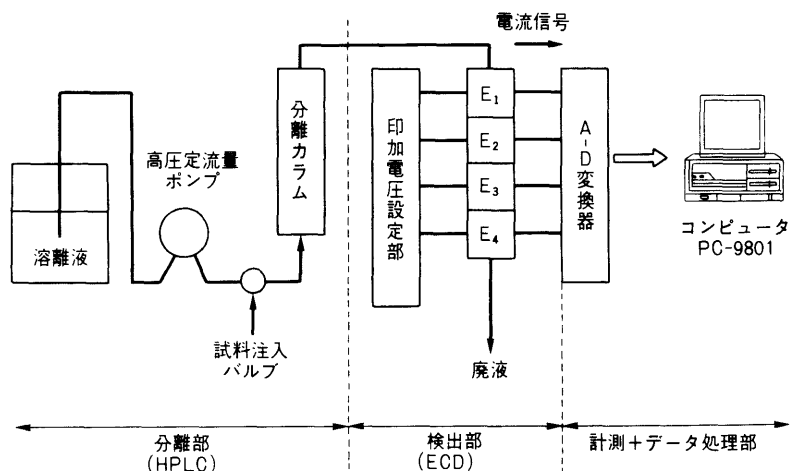


図11 システム構成図

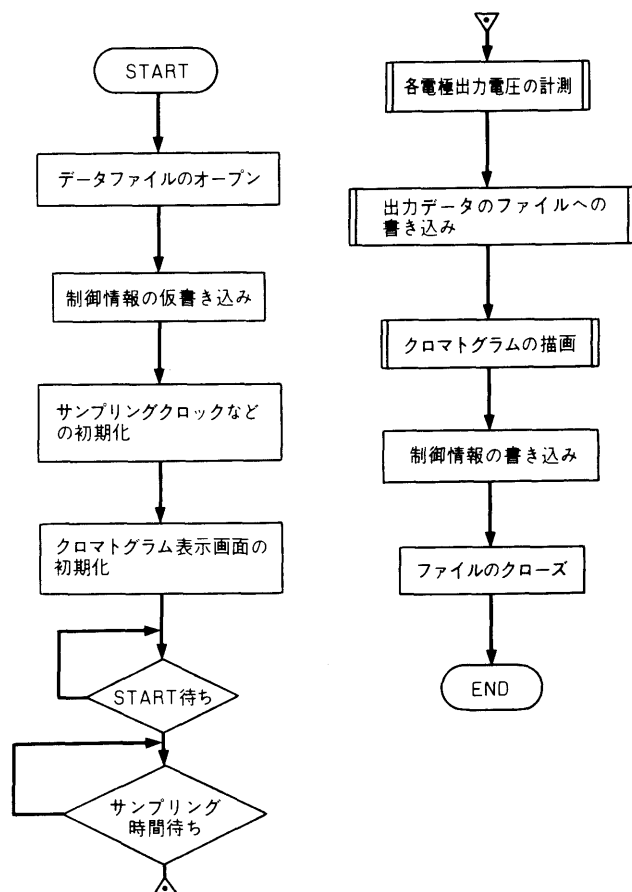


図12 計測ソフトウェアのフローチャート

カーボンを用いた。電極 $E_1 \sim E_4$ の印加電圧はそれぞれ600 mV, 700 mV, 800 mV, 900 mVである。

(4) 計測・データ処理部

この計測・データ処理部では酸化還元電位、酸化電流、保持時間などのデータからクロマトグラムを表示し各成分の定量を行う。また、各酸化還元電位での特定成分の酸化還元電流パターンからの成分種を推定する。ソフトウェアの概略を図12のフローチャートに示した。

5. おわりに

本研究はハードウェアは高井，計測データ処理を佐久間，システムの臨床分析に適した方法へのアレンジおよび臨床応用を大久保，眞重がおのの担当して行っている。今後試行錯誤を繰り返し実際の医療に役立つシステムの開発を行いたいと考えている。

参考文献

- 1) W.R.Matson, et al. : Clin. Chem., 30, 1477~1488, 1984.
- 2) 朝長正徳編著：アルツハイマー型老年痴呆，藤田企画出版，1988
- 3) 加藤智信：Dementia, 2, 25~32, 1988
- 4) F.Mashige, et al. : 13th Internat. Symp. of CLC (Stockholm), 1989, P. 148
- 5) N.Takai, et al. : 13th Internat. Symp. of CLC (Stockholm), 1989, P.167
- 6) I. Sakuma, et al. : 13th Internat. Symp. of CLC (Stockholm), 1989, P.190

光音響分光法による懸濁試料の分析と免疫分析への応用

Analysis of Turbid Solution by Photoacoustic Spectroscopy and It's Application to Immunoassay

北森 武彦* 坂上 正治** 澤田 嗣郎***

(平成元年4月7日受理)

1. はじめに

光音響分光法 (PAS) は固体試料や気体試料に励起光を断続的に照射し、発生した音響波をマイクロホンで検出する方法が一般的であるが、圧電素子を検出器とする方法が開発されてから、PASは液体試料に対しても応用されるようになった^{1)~3)}。この方法はPZTなどの圧電素子を液体試料に直接接触させ、液体中で発生した光音響信号を圧電変換して検出する。圧電素子と液体との音響インピーダンスの整合性が良いため、光音響信号を効率よく検出でき、またレーザのような高輝度光源を用いることによって超高感度化することができる。液体におけるPASの検出限界吸光係数は 10^{-8} cm^{-1} に達し⁴⁾比色分析の分野ではサブppt~pptレベルの超微量分析も実証されている^{5)~7)}。

超高感度性に加え、光散乱性の強い懸濁試料などでも試料の吸光量を正確に測定できることもPASの大きな特長の1つである。例えばBaSO₄やTeなどの懸濁粒子でもppt~ppbレベルの微量分析が可能であり^{8),9)}また光音響信号の位相から懸濁粒子の粒径や熱物性値も測定できることも示されている^{10),11)}こうした特性は、生物学あるいは生化学的試料などの懸濁試料に対しても有効に応用できるものと期待される。

本稿ではPASによる懸濁試料の分析に関して解説し、次に生化学分析への応用の一例として、ラテックス凝集法と呼ばれる免疫分析法との組み合わせによる光音響免疫分析法について紹介する。

2. PASによる懸濁試料の分析

2.1 測定原理

図1にフロー型の液体用光音響セルの構成を示す。図2には図1のセルに懸濁試料を充填し、中心軸に沿って励起光を入射した場合における圧電素子を含むセル中央部の断面模式図を示す。また、図2には励起光に照射されている懸濁粒子を拡大して示した。懸濁粒子は照射された光を吸収し、そのエネルギーの一部を熱に変換する。即ち、粒子は光により加熱される。そのため粒子と媒質との間に温度勾配ができ、粒子に与えられた熱エネルギーは熱流束として媒質中に放出される。放出された熱により媒質は熱膨張する。そこで、励起光を断続すると、粒子の吸光から媒質の熱膨張までの過程も断続して繰り返され、媒質は励起光の断続に同期して熱膨張振動する。この熱膨張振動が音源となり、励起光の断続周波数と同じ周波数の音響波、即ち光音響信号が発生する。発生した光音響信号は媒質中を伝播

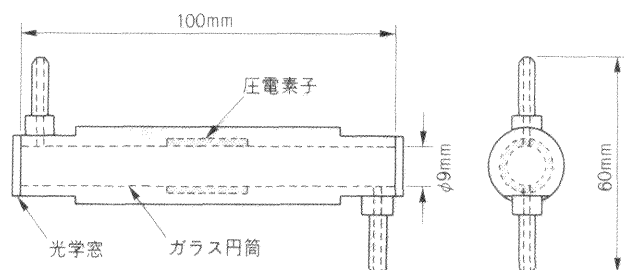
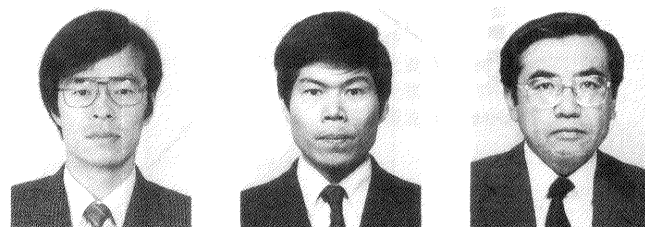


図1 セルの構造

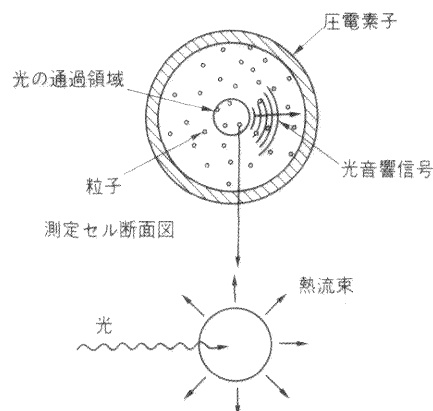


図2 懸濁試料から発生する光音響信号

し、セルの一部を構成する圧電素子によって検出される。

光音響信号の強度は試料による吸光量に比例するため、懸濁粒子の数密度や濃度にも比例する。したがって、光音響信号の強度と濃度の関係から懸濁粒子の検量線を得ることができ、定量分析が可能となる^{8),9)}。また、信号強度は励起光強度にも比例するため、真溶液の場合と同様にレーザのような高輝度光源を用いることにより超高感度化することができる。一例として、 $0.5 \mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を分散させた超純水を試料とし、光出力1.8 W、波長488 nmのArレーザの発振線を181 Hzに断続して励起光とした場合の

* 東京大学 工学部 工業化学科 工博

** 株式会社 日立製作所 エネルギー研究所 主任研究員 理博

*** 東京大学 工学部 工業化学科 教授 工博

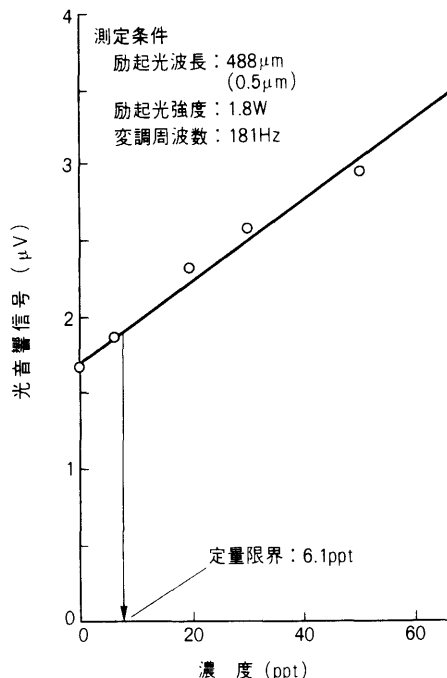
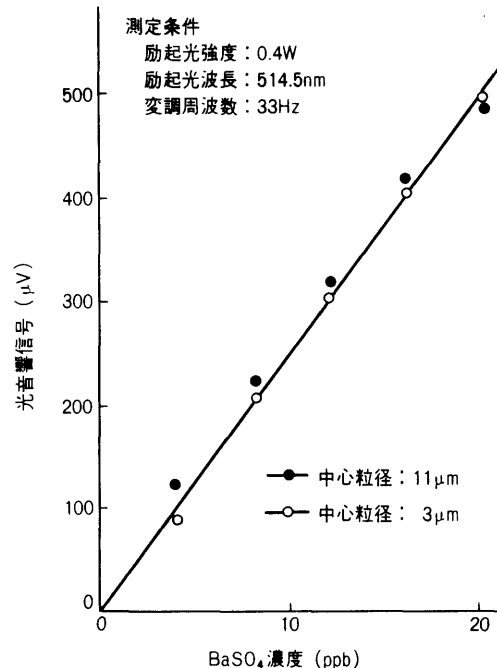


図3 0.5 μmポリスチレン粒子の検量線

図4 BaSO₄の検量線

ポリスチレン粒子の検量線を図3に示す。検量線は10¹pptレベルのポリスチレン懸濁試料に対して良い直線性を示した。この例の他にもppt～ppbレベルのBaSO₄やTeの分析例が報告されている^{8),9)}。

懸濁粒子が光を吸収してから熱を媒質中に放出するまでには放熱時間を要し、励起光の照射から放熱時間ほど遅れて光音響信号が発生する。この遅れ時間は光音響信号の波としての性質では位相として発現する^{11),12)}。粒子の放熱時間は粒子の大きさや熱物性値に依存するため、光音響信号の位相もこれらの物理量を反映する。本稿では懸濁粒子の定量分析と免疫分析への応用が主題であるため詳細は割愛するが、位相計測から懸濁粒子の粒径や媒質への熱伝達率などの測定例が報告されている^{10),11)}。

以上のように、PASでは懸濁試料の複合計測ができ、生物学的試料などの非均質系液体試料の分析評価に対してユニークな測定法となることが期待される。

2.2 感度の粒径依存性

PASによる懸濁試料の定量分析において、その感度、即ち検量線の傾きは特徴ある特性を示す。まず、励起光の波長と粒径が一致しない場合、PASの感度は粒径に依存しない。この特性はPASの測定原理に示すように、光音響信号の強度は試料の吸光量に比例するため、懸濁試料においても光の吸収物質の総量が同じであれば、信号強度も等しくなるためと考えられている。中心粒径が3 μmと11 μmの粒径分布を持つ2種類のBaSO₄懸濁水を試料とし、励起光の波長を514.5 nm (0.5 μm) とした場合の検量線を図4に示す⁸⁾。両粒径の試料に対する検量線の傾き、即ち感度は一致し、感度は粒径に依存しないことが示されている。

一方、励起光の波長と粒径が一致する領域では感度は粒径に強く依存する。図3に示す0.5 μmのポリスチレン粒子

の検量線を測定した条件と同一の条件で、0.1～5 μmのポリスチレン粒子に対する検量線を測定し、それぞれの検量線の傾きを求めて図5に示した¹³⁾。図5に示す結果から、感度は粒径に強く依存し、特に励起光の波長と粒径が一致すると感度は共鳴的に増加する。この感度特性の物理的な意味はまだ解明されていない。しかし、粒子1個当たりの信号強度と粒子の光散乱に伴う吸光断面積との比較から、感度の共鳴的増加は粒子内における光の共鳴によるものと考え

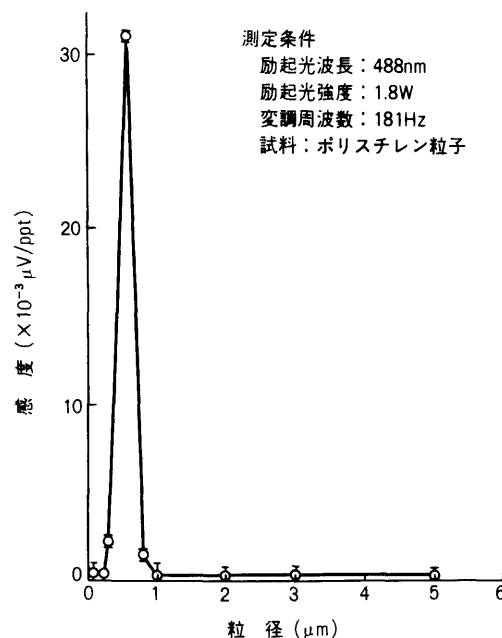


図5 感度の粒径依存性

られている¹³⁾。

以上の感度特性を利用すると、励起光の波長と粒径との相関からPASによる特色ある分析が可能となる。即ち、励起光波長と粒径を一致させなければ、試料中に様々な粒径の懸濁粒子が混在しても光散乱の影響などを受けずに正確な定量分析ができる。一方、励起光波長と粒径を一致させれば、さまざまな粒径の粒子が混在する中から特定の大きさの粒子のみを選択的に定量することができる。

3. 光音響免疫分析法—PIA—

3.1 光音響免疫分析法の原理

光音響免疫分析法 (PIA) はPASの懸濁粒子に対する特異的な感度特性を利用し、ポリスチレン粒子を用いた免疫分析法の一つであるラテックス凝集法と呼ばれる免疫分析法の検出手段としてPASを用いた高感度免疫分析法である。図6にラテックス凝集法の原理を示す¹⁴⁾。血清中の抗原を定量する場合、ポリスチレンラテックス粒子の表面に抗原に対応する特定の抗体を担持させて試薬とし、血清に添加する。血清中に抗原が存在すれば、抗原と抗体との結合反応、即ち免疫反応により、ポリスチレン粒子は図6に示すように抗原を介した凝集体を形成する。凝集体の大きさの分布は試薬粒子の濃度や反応温度などの免疫反応条件で決まり、また凝集体の濃度は抗原の濃度に比例する。したがって、特定の大きさの凝集体を定量すれば、血清中の抗原濃度を求めることができる。

そこで試薬となるポリスチレン粒子の大きさをPASの励起光波長よりも小さくし、ラテックス凝集法における凝集体の大きさが励起光波長に実質的に等しくなるように免疫反応の条件を設定する。このような測定条件下では、図5に示したPASの感度特性により、未反応粒子から選択的かつ高感度に凝集体を検出し定量することができる¹³⁾。以上がPIAの測定原理であるが、凝集体の大きさを適切に設定することにより、血清中に存在する様々な粒子状夾雑物から凝集体を選択定量する可能性もある。また、前章で述べたように、PASは比濁法に比較して2～3桁高感度であるため、PIAは従来のラテックス免疫分析法に比較して飛躍的な感度向上が期待される。

3.2 リューマチ因子の定量

PIAの原理を検証するため、リウマチ因子 (RF: Rheumatoid Factor) の定量を試みた^{13), 15)}。PASの励起光

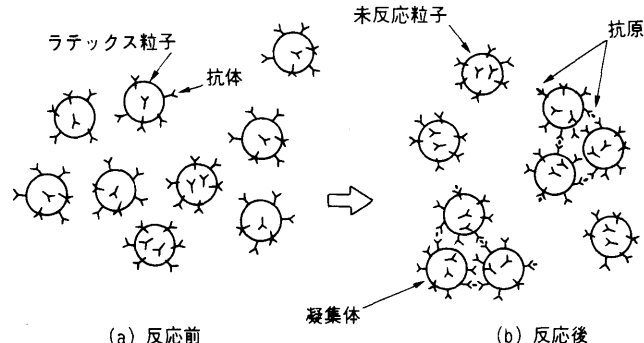


図6 ラテックス凝集法の原理

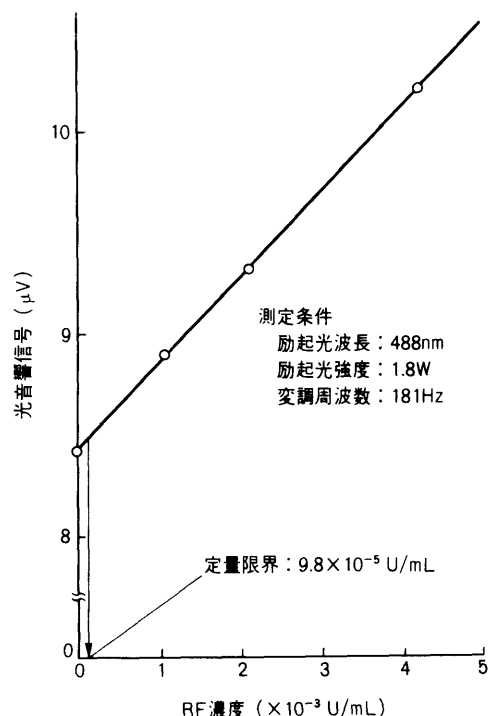


図7 リューマチ因子 (RF) の検量線

波長を488 nm (約0.5 μm) とし、ポリスチレン粒子の大きさを0.2 μm とした。ポリスチレン粒子に変性 γ -グロブリンをRFに対する抗体として担持させ、試薬とした。グリシン緩衝液、ウシ血清アルブミン及びトリス緩衝液を混合した生理的食塩水3.5 ml中に0～84 U/ml (U: WHO基準のRF国際単位) のRFを30 μl 添加し、5分間37°Cに保持した。反応終了後、試料を1/20000に希釈し、測定試料中の凝集体濃度がRF換算で、0～4.2 $\times 10^{-3}$ U/mlとなるように調製した。調製した各試料をPASで測定し、図7に示すRFの検量線を得た。

検量線は良い直線性を示し、PIAの原理を検証した。また、再現性も3回の測定に対して相対標準偏差は0.6%と良好であった。検量線に対する測定値の分散の2倍 (2σ) を定量化限界とすると、その値は9.8 $\times 10^{-5}$ U/mlとなり、吸光度計を用いた濁度法に比較して約3桁高感度であった。この結果からPIAはRIA (放射免疫分析) やEIA (酵素免疫分析) に匹敵するか、それ以上に高感度となることが予想され、ホルモンやCEAなどの超微量生理活性物質や免疫物質の定量への応用が期待される。

従来、ラテックス免疫分析法の検出法には比濁法が用いられていたが、感度は必ずしも十分でなくRIAやEIAなどに比較して高い濃度領域の免疫分析に用いられていた。しかし、ラテックス免疫分析法では非密封放射線源や反応条件に鋭敏な酵素などの物質は用いず、また反応も簡便かつ短時間に進めることができる長所から、生化学自動分析などへの応用も進められている¹⁶⁾。したがって、ラテックス免疫分析法の感度を著しく向上させるPIAは極めて有力な免疫分析法となることが期待される。

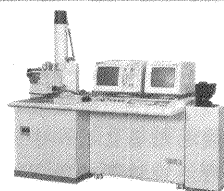
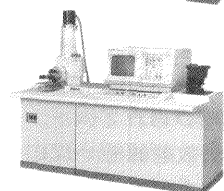
4. おわりに

本稿で紹介したPIAの基礎実験では反応試料を1/20000に希釈し、測定試料中にわずかに存在する凝集体を定量できることを示したものであり、この意味ではいわゆるHeterogeneousな免疫分析に近い条件での測定原理を検証した。しかし、実血清を用いたHomogeneousな系では多くの夾雑物の混在が予想され、PASの超高感度性と表裏一体の問題であるバックグラウンドレベルの変動などが実際の臨床的应用には問題となろう。また、装置の小型化も実用面では重要な課題であろう。一方、分析試薬に関しても現状では比濁法を念頭において開発されたものであり、必ずしもPASの超高感度性に対応するものではない。以上のようにより、PIAにはPAS、即ち分光分析化学的な点からも、試薬・分析ソフトの点からも実用上の問題が多い。こうした問題点の幾つかには二光束PAS¹⁷⁾や半導体レーザーの応用などからの対応が可能となろう。今後、さらにPASのみならず試薬や分析ソフト開発からの協力を得て、超高感度PIAの実用化に向けての研究開発が進むことを期待したい。

参考文献

- 1) T.Sawada, S.Oda and H.Kamada : Proc. Jpn. Acad., 54 B, 184 (1978)
- 2) C.K.N.Patel, A.C.Tam : Rev. Mod. Phys., 53, 517 (1981)
- 3) T.Sawada, T.Kitamori : "Physical Acoustics (W.P. Mason, R.N.Thurston, ed.)", Academic Press, New York, pp.347~401 (1988)
- 4) T.Kitamori, M.Fujii, T.Sawada and Y.Gohshi : J. Spectrosc. Soc. Jpn., 34, 359 (1985)
- 5) S.Oda, T.Sawada and H.Kamada : Anal. Chem., 52, 650 (1978)
- 6) W.Lahmann, H.Ludewig and H. welling : Anal. Chem., 49, 549 (1977)
- 7) T.Kitamori, K.Suzuki, T.Sawada, Y.Gohshi and K.Motojima : Anal. Chem., 58, 2275 (1986)
- 8) S.Oda, T.Sawada, T.Moriguchi and H.Kamada : Anal. Chem., 52, 650 (1980)
- 9) N.Nomura, S.Oda and T.Sawada : J. Photoacoust. 1, 28, (1982)
- 10) T.Kitamori, K.Suzuki, T.Sawada and Y.Gohshi : J. Spectrosc. Soc. Jpn., 35, 478 (1986)
- 11) T.Kitamori, M.Fujii, T.Sawada and Y.Gohshi : Jpn. J. Appl. Phys., 24, Suppl. 1, 210 (1985)
- 12) T.Kitamori, M.Fujii, T.Sawada and Y.Gohshi : J. Appl. Phys., 58, 1456 (1985)
- 13) T.Kitamori, K.Suzuki, T.Sawada and Y.Gohshi : Anal. Chem., 59, 2519 (1987)
- 14) J.M.Singer, C.M.Plotz : Am. J. Med., 21, 888 (1956)
- 15) T.Kitamori, K.Suzuki, T.Sawada and Y.Gohshi : Opt. Sci., 58, 561 (1988)
- 16) 牧口恭子, 野村 靖 : Hitachi, Sci. Instrument News, 27, 15 (1984)
- 17) T.Sawada, S.Oda : Anal. Chem., 53, 539 (1981)

Topics

S-2700/S-2400形
日立走査電子顕微鏡S-2700形
日立走査電子顕微鏡S-2400形
日立走査電子顕微鏡

走査電子顕微鏡は、光学顕微鏡に比べて約二けた大きい解像度に加え、立体的な形態観察、X線による元素分析が可能などの機能から用途がますます拡大

しており、ユーザーからはより操作性の良い装置が望まれています。

S-2700/S-2400形日立走査電子顕微鏡は、このようなニーズにこたえるため開発されたもので、画像メモリを内蔵して、SN比の良いスロースキャン像をいったん記憶し、これをTV画像として出力表示するものです。また、ビームをTVレートでスキャンする場合にはリカーシブフィルタを用いてSN比の改善を行い、鮮明な画像をTV静止画として表示し、明るい部屋で効率よく観察することができます。

また両機種とも、外形が60度テーパのコニカル対物レンズを採用したことによって、大形試料の傾斜観察およびX線分析が、短焦点位置で行なえるため、高分解能の観察が可能です。

■ 主な特長

(1) TV静止画表示

鮮明なスロースキャン像をTV静止画で観察し、TVスキャン時にはリカーシブフィルタでSN比を改善します。

S-2700：全スキャンモード

S-2400：全画面スキャンモードのみ

(2) コニカル対物レンズ

高角度傾斜観察およびX線分析位置での高分解観察が可能です。

(3) X線分析

EDX, WDX, 同時装着が可能です。

S-2700：X線取出角=35°

S-2400：X線取出角=30°

(4) 簡易操作

大幅な自動化機能に加えて、次の操作が簡単に行えます。

S-2700：CRT対話形オペレーション、フルキーボードデータエントリ

S-2400：シンプルな操作パネル

■ 主な仕様

項目	形式	S-2700	S-2400
分解能		4 nm	4.5 nm
倍率		×15~×300,000	×20~×300,000
加速電圧		0.2~30kV	0.3~25kV
試料寸法		200 mm(最大直径)	150 mm(最大直径)

黒鉛炉原子吸光光度計による尿中鉛の直接定量法

Direct Determination of Lead in Urine with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer

道辻 広美* 大原 昭男* 山口 恭平* 藤木 幸雄*

(昭和63年2月15日受理)

1. 緒 言

黒鉛炉原子吸光光度法（以下GFAAと略す）は、多くの元素に対し高感度であることから広く利用され、その有用性は高く評価されている。近年、組成の複雑な試料中の、微量元素の定量も行われるようになってきたが、煩雑な前処理操作（湿式灰化等¹⁾）を必要とするものが多く、必ずしも満足できるものではない。特に尿試料の場合、ヒト血液のようなほぼ同一のマトリックスを有しておらず強い負の干渉を示すことが多い。そこで、尿に含まれる鉛を直接定量する場合の、マトリックス抑制剤として硝酸²⁾や、種々のアンモニウム塩^{3),4)}を添加する方法が報告されている。

著者らは、マトリックス抑制剤として各種金属塩を尿に添加して検討を行い、第57回日本産業衛生学会⁵⁾で一部報告した。その結果、尿試料に過剰の塩化ナトリウム存在下で塩化パラジウムを添加すると、尿マトリックスによる影響を除くことが判明したので報告する。

2. 実 験

分析機器：日立180-80形偏光ゼーマン原子吸光光度計（光温度制御装置、オートサンプラー付）

試薬調整方法：2%塩化パラジウム液：塩化パラジウム1gを2M-塩酸50mlに溶解した。ただし、塩化パラジウムはロットにより鉛を多く含むものがあるため注意する必要がある。

尿希釈液：10M-硝酸10mlに蒸留水を20ml加え、20%塩化ナトリウムを15ml、2%塩化パラジウムを5ml加えた。

分析条件：Table 1に示す。

分析方法

(1) 黒鉛炉原子吸光光度法

(a)硝酸添加法：尿0.5mlに10M-硝酸を0.1ml加え、純水

を0.4ml加える。ファーンズの温度プログラムは硝酸添加法に最も適した温度に設定した（ASH 2 = 400℃, ATOM = 1600℃）。

(b) 塩化パラジウム・塩化ナトリウム添加法：尿0.5mlに前記の希釈液を0.5ml加え、Table 1の分析条件により測定した。

(2) 原子吸光光度法（空気・アセチレン炎）尿を湿式灰化後、APDC・MIBK抽出し、測定した。

3. 結果・考察

GFAAを用いて各試料中に存在する共存物質による影響を検討したり、マトリックス抑制剤の効果を調べる場合には、一般的に炉の温度プログラムを一定にして、添加試薬の濃度またはマトリックスの量を変化させることにより結果を導いている。

しかし、このような検討手法を用いると間違った結論をだす危険性がある。

著者らは、マトリックスによる影響やマトリックス抑制剤の添加効果を決める判断基準として以下の項目を提唱している。

(1) 尿マトリックスによる影響やマトリックス抑制剤の添加効果を調べるために、添加試料薬の種類、およびその濃度についてそれぞれ原子化温度、灰化温度曲線をとる。

(2) 原子化・灰化温度曲線が添加試薬の濃度増加に伴い、右方移動つまり高温側に移行したならば、その試薬を添加することにより目的元素は、より高温側まで炉内に保持されるものと考ええる。

(3) 原子化・灰化温度曲線が低温側に移行したならば、その試薬を添加することにより、目的元素は比較的低温で散逸するものと考ええる。

Table1 Operation condition

Wavelength	283.3nm	Heating Program		
		Stage	temp.(℃)	Time(sec.)
Slit	1.3nm	Dry	40→120	30
Cuvette	Tube	Ash 1	200→400	20
Carrier Gas	200ml/min.	Ash 2	500	10
Sample Volume	20ul	Atom	2000*	5
Analytical Mode	absorbance	Clean	2400	3
Measurement Mode	Peak Height			

* temp. Control ON

* 松下産業衛生科学センター

(4) 原子化・灰化温度曲線が添加試薬の濃度増加に伴い、上方移動つまり原子吸収ピークが高くなれば、その試薬を添加すると、目的元素に対し増感効果を有するものと考えられる。

(5) 原子化・灰化温度曲線が、下方移動つまり原子吸収ピークが低くなれば、その試薬を添加すると、目的元素に対し抑制効果を有するものと考えられる。

(6) 尿マトリックスについても濃度が異なる試料を用い上述した(1)~(5)までの検討を行う。

以上の検討および判断基準に従えば、その試料に最も適した条件を決定することができるので、尿中鉛の測定法の検討も原子化・灰化温度を主として各種の検討を行った。

(1) 尿試料に9種類の金属塩を添加した場合の灰化温度曲線をFig. 1に示す。対照として1 M-硝酸を尿に添加した試料(●—●)では、負の干渉を強く受け灰化温度曲線の安定化は見られず、400℃以下に設定しなければならない。

またそれ以下の温度に設定すると、光学的なバックグラウンドが増加し、測定が不可能となる場合もある。塩化パラジウムを添加した試料(⊠—⊠)では、灰化温度が1,000℃まで安定した吸光度を示した。これは、黒鉛炉内で鉛とパラジウムの化合物が生成し、高温になるまで解離しないのではないかと推察される。しかしながら、パラジウムが鉛と解離エネルギーの高い物質を生成するだけでは、灰化温度が400~1,000℃まで一定の吸光度を示す結果は説明できない。つまり、負の干渉を示す物質が共存する場合、その物質を除去できる灰化温度以上に設定しなければ感度は低下するからである。これは、パラジウムがなんらかの負の干渉を示す物質とも結合し、鉛に対する干渉を除くものなのか、あるいは原子化時にまず共存物質が蒸発し、黒鉛炉とキャリアガス温度が熱平衡に達した後、パラジウムと鉛の化合物が解離して原子蒸気を生成するために、鉛と共存

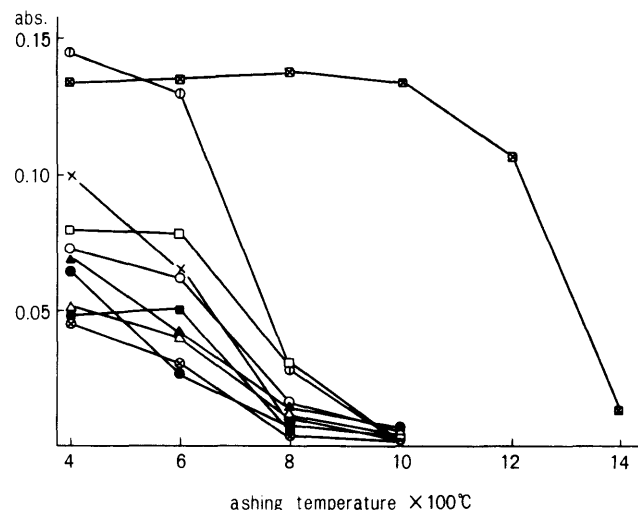
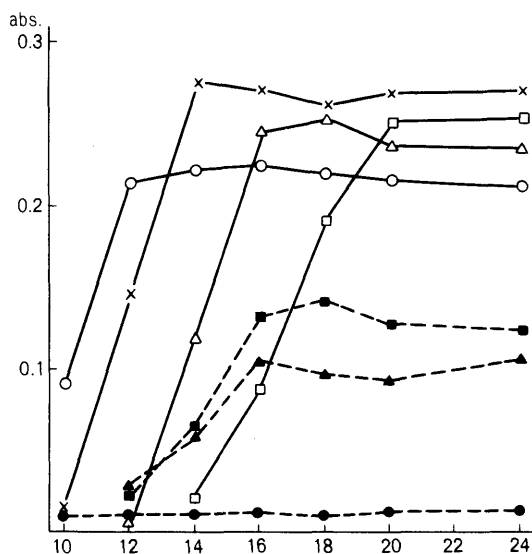
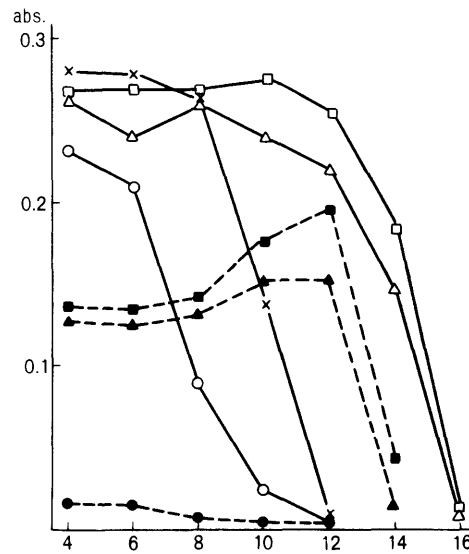


Fig. 1 Effect of ashing temperature with nine solts of metallic salts in pool urine contains 20ppb-Pb. added with 1 M-HNO₃(●—●), 1 M-HNO₃ and 1 %-Mg(NO₃)₂(▲—▲), 1 M-HNO₃ and 1 %-Ni(NO₃)₂(○—○), 1 M-HNO₃ and 1 %-Co(NO₃)₂(△—△), 1 M-HNO₃ and 1 %-Cu(NO₃)₂(■—■), 1 M-HNO₃ and 1 %-Cr(NO₃)₃(□—□), 1 M-HNO₃ and 1 %-La(NO₃)₃(○—○), 2 M-HCl and 1 %-SbCl₅(○—○), 1 M-HNO₃ and 0.05 %-PdCl₂(⊠—⊠), 1 %-Na₂WO₄(X—X) respectively.

物質の再結合が起こりにくいであろうと思われる。後者の方は、最近、黒鉛炉内において化学干渉を軽減させる目的でプラットホーム^{6,7)}を使用する試みと相似する。プラットホームを装着した黒鉛炉は、原子化時にプラットホームの温度と炉内のガス温度が熱平衡に達しているため、目的元素と共存物質が同時に蒸発しても再結合が起こりにくくする効果を有している。一般に、GFAAで鉛やカドミウムなど蒸気圧が高い物質を分析する場合、灰化温度を高温に設定することは目的とする元素も蒸発し、感度は低下する。



(i) atomization temperature X 100°C



(ii) ashing temperature X 100°C

Fig. 2 Effect of atomization temperature and ashing temperature to 1 M-HNO₃(X—X) and urine with different specific gravity(1.008 and 1.035). added with 1 M-HNO₃(○, ●), 1 M-HNO₃ and 0.05 %-PdCl₂(△, ▲), and 1 M-HNO₃ and 0.1 %-PdCl₂(□, ■) respectively, each of which contains 40 ppb-Pb.

逆に灰化温度を低温に設定すると、化学干渉や分光干渉が増加し、分析が不可能となる。

(2) Fig. 2 は、40 ng の鉛を含む尿に塩化パラジウムを濃度を 0 ~ 0.1 % に変化させて加えた場合の原子化温度曲線、およびその時の灰化温度曲線である。

まず原子化温度を検討したところ、1 M-硝酸水溶液で 1,400 °C 以上、低比重尿に 1 M-硝酸添加試料では 1,200 °C 以上で一定の吸収が得られた。次に、低比重尿に塩化パラジウムを添加した試料では、その添加量に伴い原子化温度曲線は高温側にシフトし、若干感度の上昇がみられた。反面、高比重尿では塩化パラジウムの濃度が増加するのに伴い、原子化温度曲線は上方にシフトつまり感度が著しく上昇し、1,600 °C 以上で一定値を示した。

原子化温度曲線および灰化温度曲線から、1 M-硝酸を添加した高比重尿 (1.035) (●—●) では、鉛の原子吸収ピークが著しく阻害された。また、低比重尿 (1.008) (○—○) でも 1 M-硝酸水溶液 (×—×) と比較すると、若干負の干渉が現れた。

尿中の金属測定において、種々の検討を行う場合、従来は合成尿やプール尿が用いられてきた。しかし、尿は各個人によっても、また採尿時間によっても組成の変動が非常に大きく、最適な分析条件が尿マトリックスにより異なることは、Fig. 2 の結果からでも明らかであろう。

(3) 尿に塩化パラジウムを添加することにより、高比重の尿でも感度が上昇し、標準添加法を適用すれば、分析することは可能であるが、尿マトリックスを完全に除去することは不可能であった。そこで、尿中に多量に存在する塩化ナトリウムをさらに添加し、マトリックスを一定にするよう試みた。

Fig. 3 は低比重尿および高比重尿に 0.1 % となるように塩化パラジウムを添加し、塩化ナトリウムを 0 ~ 3 % 添加し

た試料の原子化温度および灰化温度を示す。

この結果 0.1 % 塩化パラジウムおよび 3 % 塩化ナトリウムを添加した試料は、原子化温度が 2000 °C 以上、灰化温度が 800 °C 以下で尿比重に関係なくほぼ一定の原子吸収を示すようになった。

(4) Fig. 4 に各種試料の原子吸収プロフィールを示す。尿に硝酸を添加した試料のプロフィールは、鉛標準液のそれと比較して、原子化開始後すみやかに鉛の吸収ピークがみ

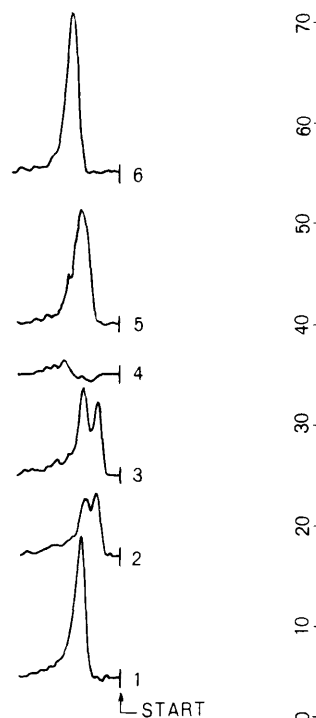


Fig. 4 Absorbance profiles of 1 M-HNO₃(1) and urines by adding 1 M-HNO₃(2), 1 % NH₄NO₃(3), 1 %-(NH₄)₂SO₄(4), 1 %-(NH₄)₂HPO₄(5), 0.1 %PdCl₂ + 3 %NaCl(6) solution containing 0.4 ng of Pd respectively. ashing temperature 500 °C; atomization temperature 2200 °C (Temp. Control OFF)

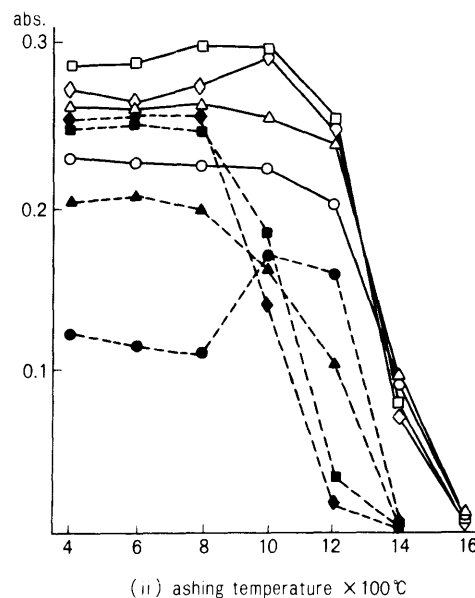
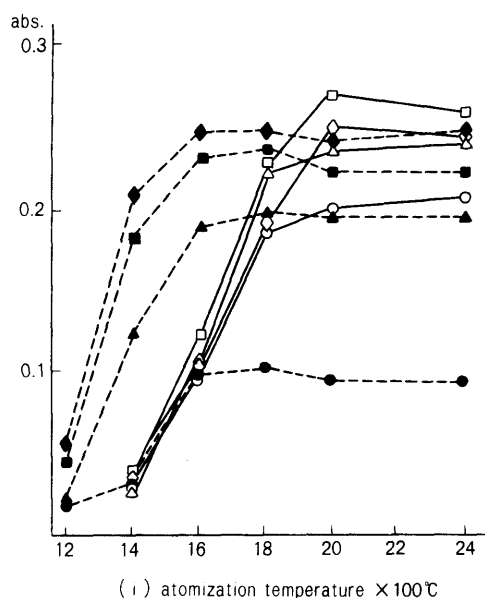


Fig. 3 Effect of atomization temperature and ashing temperature in urine with different specific gravity (1.008 and 1.035) contains 40 ppb-Pb. added with 1 M-HNO₃ and 0.1 %PdCl₂(○, ●), 1 M-HNO₃, 0.1 %PdCl₂ and 1 %NaCl(△, ▲), 1 M-HNO₃, 0.1 %PdCl₂ and 2 %NaCl(□, ■) 1 M-HNO₃, 0.1 %PdCl₂ and 3 %NaCl(◇, ◆) respectively.

られ、かつダブルピークとして出現したのに対し、尿に塩化パラジウムと塩化ナトリウムを添加した試料は、鉛標準液の吸収ピークより遅く現れ、かつ単一のピークが得られた。硝酸添加尿の様に、原子化時に吸収ピークが2個以上出現するのは、黒鉛炉内における熱分布が場所によって異なる場合や、灰化段階を経て原子化する時点で、解離エネルギーが異なる目的元素の化合物が2種類以上存在する場合に見られるが、本実験系では、鉛標準液が単一のピークを示していることから、黒鉛炉内試料部の温度分布差とは考えにくく、後者の可能性が大きいと考えられる。

各種試料中に含まれる微量の鉛を測定する場合、そのマトリックスに応じて干渉の程度が異なることはPrevan²⁾らをはじめ多くの報告がある。特に、塩化物が共存すると、その非特異的吸収のため、バックグラウンドが大きくなったり、鉛が塩化鉛となってより低温で蒸発するとされている³⁾。また、Hodges⁸⁾らは尿試料を分析する場合にみられる負の干渉は、アニオン、カチオンからの干渉、非特異的吸収、ハロゲンまたは有機化合物に鉛が結合するためにおこるのではないかと報告している。そこで、試料中に多量に存在する塩化ナトリウムを除く目的で、硝酸²⁾や硝酸ナトリウム³⁾を添加する方法を尿試料に適用した場合それらの原子吸収プロフィールは、両者とも非常に抑制され、かつ単一ピークは示さず、鉛に対する干渉抑制効果はほとんどもないことが判明した。次に、血液中鉛量の測定にマトリックス抑制剤としてよく用いられるリン酸水素2アンモニウム^{4),7)}を尿試料に適用してみた。原子吸収プロフィールは単一のピークを示し、尿マトリックス抑制効果は顕著であるが、完全に抑制するまでには至らなかった。

以上の結果を総合すると、塩化パラジウム・塩化ナトリウムやリン酸水素2アンモニウム以外は、尿中鉛量の測定において現れる強い負の干渉を除くことはできなかった。よって尿中にも多量に含まれる塩化物が、干渉の主な原因とは認められない。

(5) Fig. 5は、尿マトリックスの指標を比重とし、40ppbに相当する鉛の吸収感度について検討した結果である。塩化パラジウム・塩化ナトリウム添加法では、 $\bar{X}=0.2233$ abs, $SD=0.0130$ abs, $RSD=5.8\%$ で、硝酸添加法を用いた場

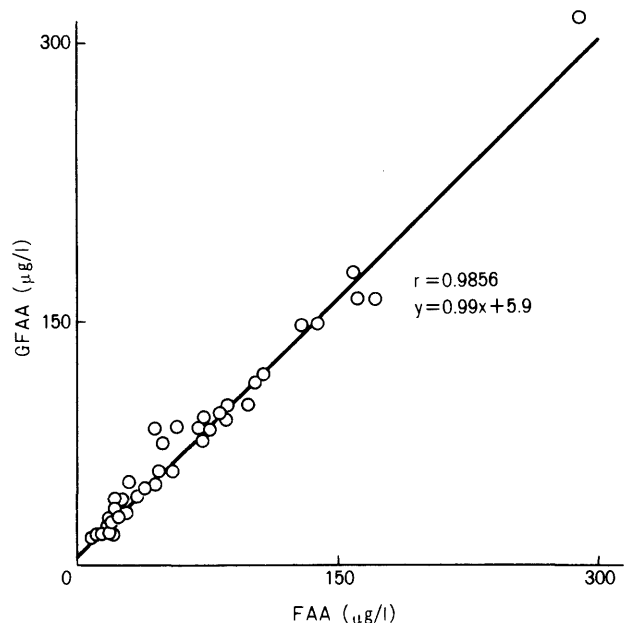


Fig. 6 Correlation of lead in urine determined by between FAA and GFAA

合のそれは、 $\bar{X}0.1520$ abs, $SD=0.460$ abs, $RSD=30.8\%$ となった。また、硝酸添加法の場合、鉛の吸収感度と尿比重の関係は強い負の相関が認められた。

(6) Fig. 6は、湿式灰化後溶媒抽出原子吸光度法(従来法)との相関を示したものである。その結果、 $r=0.9856$, $y=0.99x+5.9$ と、両方法間に極めて高い相関があった。

4. 結 言

GFAAを用いて尿中鉛の直接定量を試みた。塩化パラジウムと塩化ナトリウムを添加した試料は、灰化温度が800℃まで安定した原子吸収を示し、試料マトリックスに起因する著しい負の干渉を除くことも可能となった。

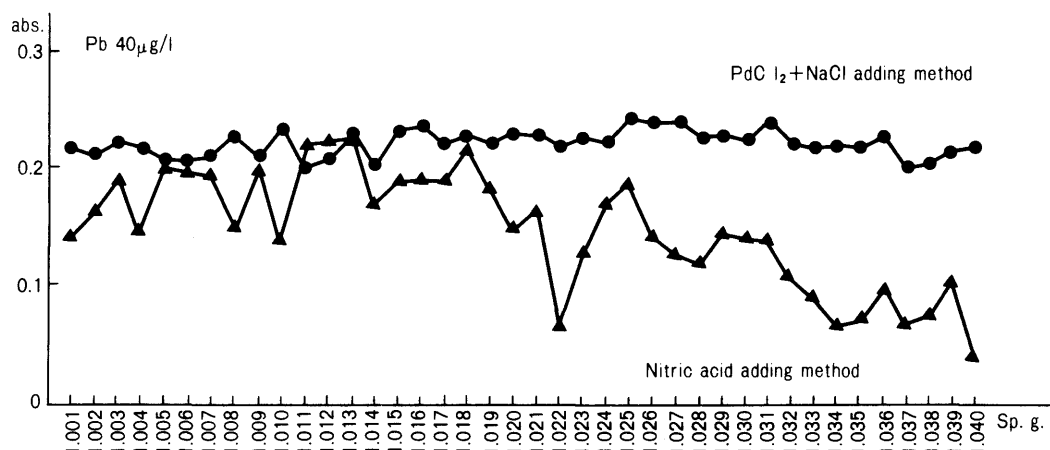


Fig. 5 Variation of lead in urine by urinary matrix.

参考文献

- 1) Legotte PA, Rosa WC and Sutton DC. Determination of cadmium and lead in urine and other biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 1980 ; 27 : 39~44
- 2) Pleban PA and Pearson KH. Determination of lead in whole blood and urine using Zeeman effect flameless atomic absorption spectroscopy. *Anal Lett* 1979 ; 12 (B 8) : 935~950
- 3) Manning DC and Slavin W : Determination of lead in a chloride matrix with the graphite furnace. *Anal Chem* 1978 ; 50 (9) : 1234~1238
- 4) Syamberger RJ. Effects of blood and urine on lead analyzed by flameless atomic absorption. *Clin Chem Clin Biochem* 1983 ; 21 : 107~111
- 5) 道辻広美, 大原昭男, 兼高明生, 藤本幸雄：金属間化合物およびNaClの効果を応用した尿中鉛の直接定量法, 第57回日本産業衛生学会講演要旨集1984 : 564~565
- 6) L'vov BV. Electrothermal atomization-the way toward absolute methods of atomic absorption analysis. *Spectrochim Acta* 1977 ; 33 : 153~193
- 7) Hinderberger EJ, Kaiser ML and Koertyohann SR. Furnace atomic absorption analysis of biological samples using the L'vov platform and matrix modification. *Atom Spectrosc* 1981 ; 2 : 1~7
- 8) Hodges DJ and Skelding D. Determination of Lead in Urine by Atomic-absorption Spectroscopy with Electrothermal Atomisation. *Analyst* 1981 ; 106 : 229~304

Topics

日本電子顕微鏡学会 関東支部昭和63年度 学術講演会開催さる

さる3月17, 18の2日間, 工学院大学で「ひろがりゆく電子顕微鏡の世界」をテーマに企画された支部講演会が開かれた。第1日目の生物分野では, SEM観察のための新しい技法およびSEMの医学・生物学への応用と題し, SEMの基礎的な構造, 試料作製法および撮影法から各種生物試料の観察例と得られた知見に至るまで, 各分野の代表的な先生の講演があった。いずれもノウハウ的な内容が多く, SEMを用いて研究を始めている多くの研究者への実的な知識となっただけでなく, SEMをすでに駆使している研究者にとっても重要なヒントが得られた。第2日目は新素材分野で今もっとも注目を浴びている高温超電導材料の評価技術と題し, その構造解析, 界面と組織観察, および組成分析の第一線の研究者から最先端の研究状況についての講演があった。特に今回は, 基調講演として東京大学の北沢宏一教授から新しい超電導材料の探索とキャラクタリゼーション, さらにエレクトロニクス応用へ向けての課題について, 金属材料技術研究所の

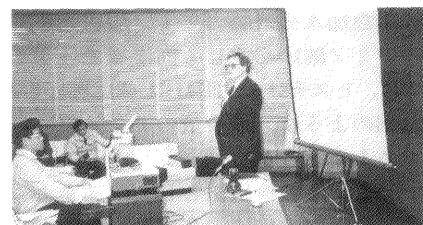
前田 弘総合研究官からは超電導材料の製法と特徴, および最新のアメリカの情報について講演をしていただいた。両日とも非会員を含む約400人の参加者があり, 先端研究での電子顕微鏡の生かし方, 役割, ありかたなどについて有意義な討論も行われた。

今回, 新しい試みとして第1日目の夕方に公開講座が開催された。電子顕微鏡像が雑誌や新聞でしばしば取り上げられる今日, 電子顕微鏡技術が広く一般社会で理解され活用されるため, わかりやすい初心者向けの講座が企画された。まず東北大学科学計測研究所の矢田 慶治教授から「電子顕微鏡のしくみ」, 次に東北大学金属材料研究所の平林 真所長から「電子顕微鏡でみた金属」について講義があった。初めての試みなので, 聴講者の数が心配されたが, 学校帰りの高校生や勤め帰りのサラリーマンなど約350人が両先生の講義を興味深く聞いた。来年度は生物分野を対象として行われる予定である。

(永田文男 記)

David C. Joy教授の 講演会を開催

電子顕微鏡の分野では, 米国はもとより世界的な権威者であるテネシー大



学のDavid C. Joy教授を迎え, さる3月28日那珂工場で講演会が開催されました。演題は「西暦2000年における電子顕微鏡と微小部元素分析」と興味あるもので, 満員の聴員の聴衆を魅了しました。主な内容は,

- (1) 高温超電導材使用による性能・機能の向上
- (2) 新しい電子線源による性能・機能向上と応用分野拡大
- (3) 写真撮影にかわる記録媒体の開発とシステム化による利点
- (4) EDX, EELS内蔵形電子顕微鏡開発の必要性

など, ハード, ソフトの開発, それにシステム化に対する提言があり, これからの製品開発と応用ソフト開発に非常に参考になる内容でした。

なお当日はテクノリサーチセンターをはじめ, 工場内をご案内し, 各種新製品や高信頼性を生み出す設備等をご視察いただきました。また翌日は日立中央研究所の研究室を見学され, 多くの研究者を対象に講演と討論をされ大きな関心を集めました。

L-8500形日立高速アミノ酸分析計による直線性範囲の検討

Studies on Linearity Range of Amino Acids with HITACHI Model L-8500 High Speed Amino Acid Analyzer

馬場 ますみ* 青木 勝洋** 若林 清史*** 鷹野 重威****

(昭和63年 5 月 20 日受理)

1. はじめに

アミノ酸の分析は、蛋白質のアミノ酸組成や一次構造を決定する手段として重要であるばかりでなく、アミノ酸代謝の研究や、先天性代謝異常症のスクリーニングなど医学分野への応用をはじめ、食品や飼料、医薬品などの品質管理にも広く利用されている。最近では、遺伝子工学などバイオテクノロジーの分野や臨床化学にも利用されるようになり、分析感度の向上と分析時間の短縮など、用途に応じて夫々の分析法に適用する必要がある。

蛋白加水分解物のアミノ酸組成を分析する場合、それらのアミノ酸は必ずしも同濃度ではなく、例えばリゾチームでは、ヒスチジン (His) 1 個に対してアスパラギン酸 (Asp) 21個のように、最少量のアミノ酸に対して最高が20倍以上であることも多い。

アミノ酸の検出法として、通常よく用いられるニンヒドリン発色法の他に、高感度を目的としてオルトフタルアルデヒド (OPA) 試薬による蛍光検出法が用いられるが、特にこの場合など検出下限については多くのデータがあるが、検出上限や検量線の直線性についてのデータがほとんどない。従って、確かに検量線の直線性のある範囲内で測定できているかどうかを知る上でも、また、そのためのサンプル注入量を定める上でも、検出上限のデータは必要不可欠であると考えられる。

われわれは、アミノ酸分析をする場合の直線性範囲について実験・検討を行ない、L-8500形日立高速アミノ酸分析計^{1)~3)}を用いて蛋白加水分解物アミノ酸について、通常のニンヒドリン反応と蛍光法による高感度分析法で、夫々約100倍及び約40倍以上の範囲に亘って直線性を得る方法を確立したので、その結果について述べる。

2. 実験

2.1 装置

装置は下記の構成で、図1にその流路の概略を示した。

L-8500形日立高速アミノ酸分析計

D-2850形日立アミノ酸分析専用データ処理装置

F-1100形日立分光蛍光光度計

図1は、L-8500形日立高速アミノ酸分析計のモニター用CRTに表示される画面と同様である。B1~B4はアミノ酸



L-8500形日立高速アミノ酸分析計

の分離に用いる溶離液、B5はカラム再生用アルカリ溶液で、R1~R3は反応試薬である。夫々高速で作動する電磁弁 (V1~V5) の開閉によって、溶離液を切り換える。これらの電磁弁の開閉時間を制御することによって、各溶離液を一定割合で混合する、いわゆるグラディエント溶離法が適用できる。溶離液はポンプ1によって、オートサンプラで一定量の試料を注入しカラムに送液される。

2.2 試薬及び分析条件

2.2.1 ニンヒドリン発色法による標準分析法³⁾

溶離液は、三菱化成工業製のL-8500形用PHキットを、ニンヒドリン試薬は和光純薬工業製ニンヒドリンキットをそのまま用いた。これらの組成は取扱説明書に記載されているものと同一である。分離カラム及び分析条件などは、すべて取扱説明書記載の標準分析法³⁾で行った。

アミノ酸標準液は、味の素製を0.02 N HClで希釈またはそのまま所定の量になるようオートサンプラを用いてカラムに注入した。

2.2.2 蛍光法による分析法

アミノ酸分析の高感度化及び高分離化を目的として、ニンヒドリン発色法による標準分析と異なり、次に述べる分析条件で実験を行った。

蛍光検出法でアミノ酸を分析する場合、反応試薬R1~R3を使用する。反応試薬の組成は表1に示したが、R1とR2の混合溶液をポンプ2で、R3をポンプ3で送液し、溶出液と混合し、生じた蛍光物質を蛍光光度計で検出するようにした。

* 住友製薬株式会社 茨木工場 品質管理部 試験課
** 住友製薬株式会社 茨木工場 品質管理部 試験課 課長
*** 日立計測器サービス株式会社 大阪営業所 光装課
**** 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
主管研究員 理博

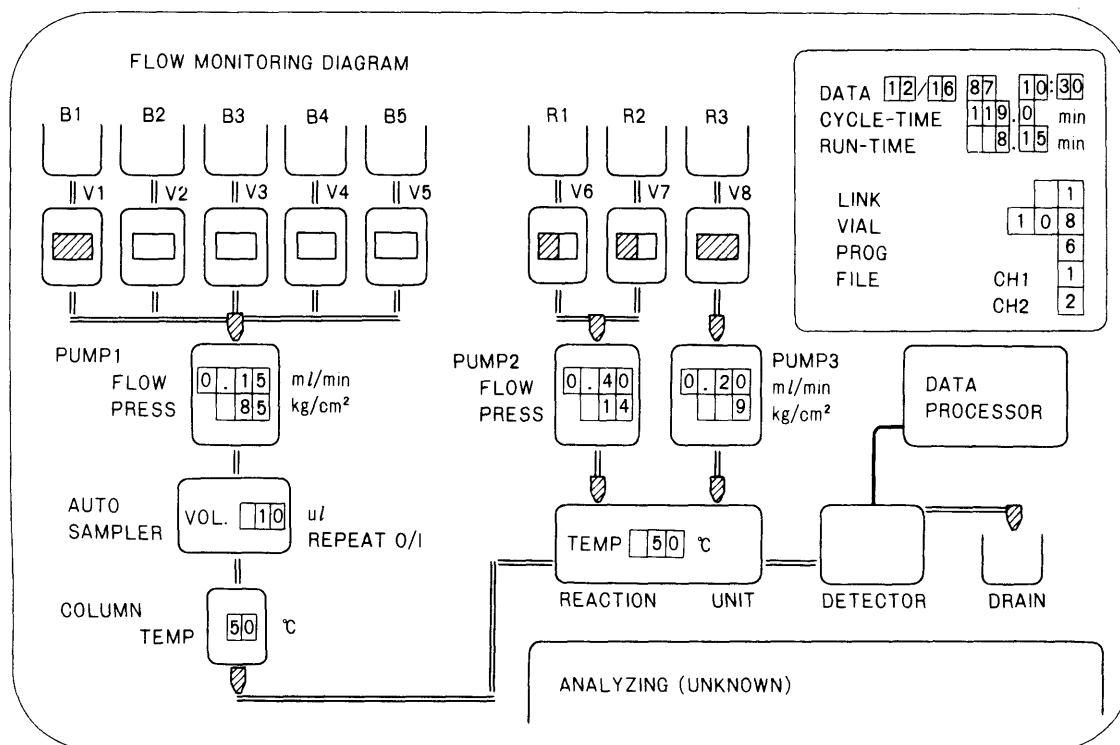


図1 L-8500形の流路図 (モニタ画面)

表1 蛍光法の反応液組成

反応液組成	R1	R2	R3
ホウ酸	—	21.60g	21.60g
水酸化ナトリウム	24.00g	—	—
Brij-35(25g/100ml水)	—	—	4.0ml
オルトフタルアルデヒド/エタノール	—	—	800mg/10ml
2-メルカプトエタノール	—	—	2.0ml
次亜塩素酸ナトリウム	—	100.0µl	—
全量	1.0ℓ	1.0ℓ	1.0ℓ

表2 蛍光法の緩衝液組成

緩衝液組成	B1	B3	B4	B5
クエン酸ナトリウム	6.97g	12.56g	26.67g	—
塩化ナトリウム	6.36g	2.34g	54.35g	—
クエン酸	15.93g	8.40g	6.10g	—
エタノール	54.0ml	—	—	—
ベンジアルコール	—	8.0ml	5.0ml	—
水酸化ナトリウム	—	—	2.00g	8.00g
カプリル酸	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
全量	1.0ℓ	1.0ℓ	1.0ℓ	1.0ℓ

表3 蛍光法の分析条件

PROGRAM TABLE										PROG NO. = 6	
PRESSURE: P1 (MAX-MIN) 150- 30 kg/cm²										REAGENT VALUE: V6/V7 = 50/ 50 %	
P2 50- 2										REACTION TEMP: 50 Degrees C	
P3 50- 2											
STEP	TIME (min)	BUFFER (TOTAL 100%)					COLUMN TEMP	FLOW RATE (ml/min)			
		U1	U2	U3	U4	U5		P1	P2	P3	
1	0.0	100	—	—	—	—	50	0.15	0.40	0.20	
2	11.0	100	—	—	—	—	40				
3	12.0	—	—	100	—	—					
4	34.0	—	—	100	—	—	65				
5	39.1	—	—	—	100	—					
6	71.0	—	—	—	100	—					
7	71.1	—	—	—	—	100					
8	86.0	—	—	—	—	100					
9	86.1	100	—	—	—	—					
10	90.0	—	—	—	—	—	45				
11	112.0	100	—	—	—	—					

アミノ酸標準試料は、味の素製 amino acid calibration mixture (アンプル入り) に、半井化学薬品製のノルロイシン (Nle) とシステイン (CySH) を加えたものを用いた。何れも等モル、但しプロリン (Pro) のみ2倍量を含むように調製した。

溶離液組成は、表2に示した3種類のものを用いた。これらの試薬は、何れも半井化学薬品製アミノ酸分析用または特級試薬を用いた。また蒸留水は、ミリポア製超純水製造装置を用い、新鮮なものを使用した。

分析条件は、表3にデータ処理装置のプリントアウトした例で示した。カラムは、内径4.6 mm、長さ80 mmに日立カスタムイオン交換樹脂#2620SCを充填したものを用いた。表3からわかるように、溶離液は、11分から12分にかけてB1からB3に切り換え、34分でB3からB4へ5分間のリニアグラディエント法で溶出し、71.1分でB5すなわち再生液で約10分間再生後、B1で33分間平衡化を行なった。カラム温度は、11分で50℃から40℃に降温し、34分で40℃から65℃に昇温、溶離液の流量は0.15 ml/minで送液した。反応液は、ポンプ2でR1とR2の混合液を0.4 ml/min、R3をポンプ3で0.2 ml/minで送液し、50℃で反応後、F-1100形日立分光蛍光光度計 (励起波長: 340 nm、蛍光波長: 450 nm) で検出し、その蛍光強度をD-2850形データ処理装置で、溶出時間、ピークの高さと面積などを計算した値としてプリントアウトした結果を用いた。

3. 実験結果

3.1 ニンヒドリン反応による標準分析法

各アミノ酸2.0 n molの標準試料のクロマトグラムの一例を図2に示した。

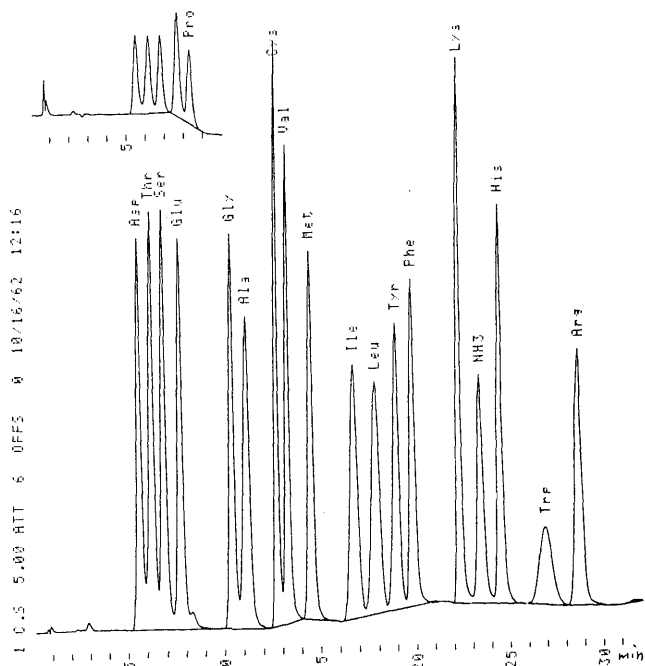


図2 標準試料のクロマトグラム

(ニンヒドリン法による標準分析法³⁾、各2.0 n mol、570 nm、Proは440 nmで左上に示した。)

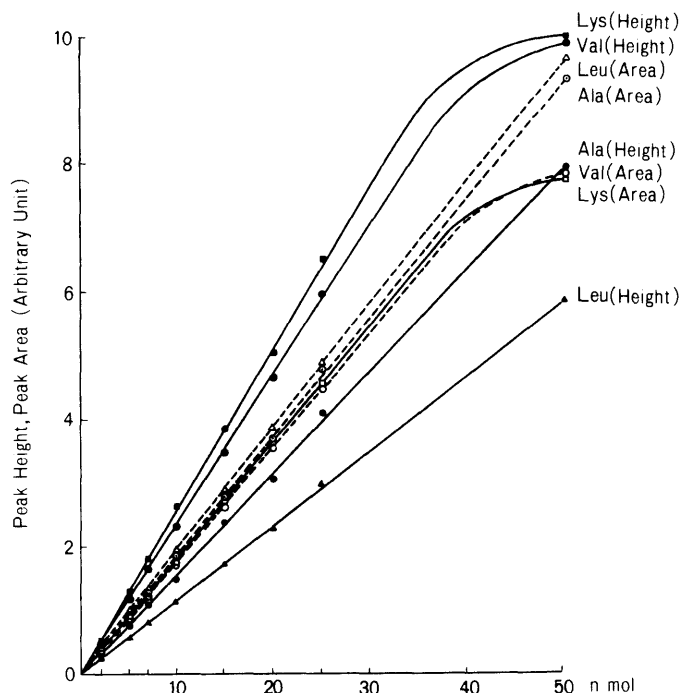


図3 ニンヒドリン法による直線性 (標準分析法³⁾による。)

図2のクロマトグラムで、ピークがシャープでピーク高さの高いものとしてValとLysを、比較的ピーク高さの低いものとしてAlaとLeuを選んで、2~50 n molに亘るピークの高さと面積をプロットした結果を図3に示した。図3の結果から、Ala、Leuは50 n molまで直線性があるのに対して、LysやValは25~50 n molの間で直線性がなくなることが分かった。即ち図2のクロマトグラムで、ピークの高いアミノ酸は約30 n mol以上で直線性がなくなること示している。この場合、例えばLysやValのピーク高さが50 n molでは、データ処理装置のカウント数が上限の 9.99×10^5 となってピーク高さが飽和するため、ピーク面積も直線性を失う結果となるためである。この装置ではニンヒドリン反応生成物を光路長6 mmのフローセルで検出する可視光度計で440 nm及び570 nmの吸光度を測定しているが、検出器の出力は0.4 V/1.0 Abs、データ処理装置の入力電圧は-0.01~1.0 Vで、2.5 Absで検出器からの出力電圧が飽和することになる。

以上の結果から、L-8500形の標準分析法では、すべてのアミノ酸については約30 n molまで直線性があり、再現性の良好なデータの得られる最少試料量を3~500 p molとすれば、約100倍の範囲に亘って直線性が得られることを確認することができた。また、200 p mol~50 n mol範囲における各アミノ酸の定量性と再現性については、池田ら⁴⁾によって報告されている。

3.2 蛍光法による直線性の範囲

アミノ酸の高感度分析を目的として、OPA試薬による蛍光検出法を上記述べた分析条件で、各アミノ酸200 p mol (Proのみ400 p mol) のクロマトグラムの一例を図4に示し

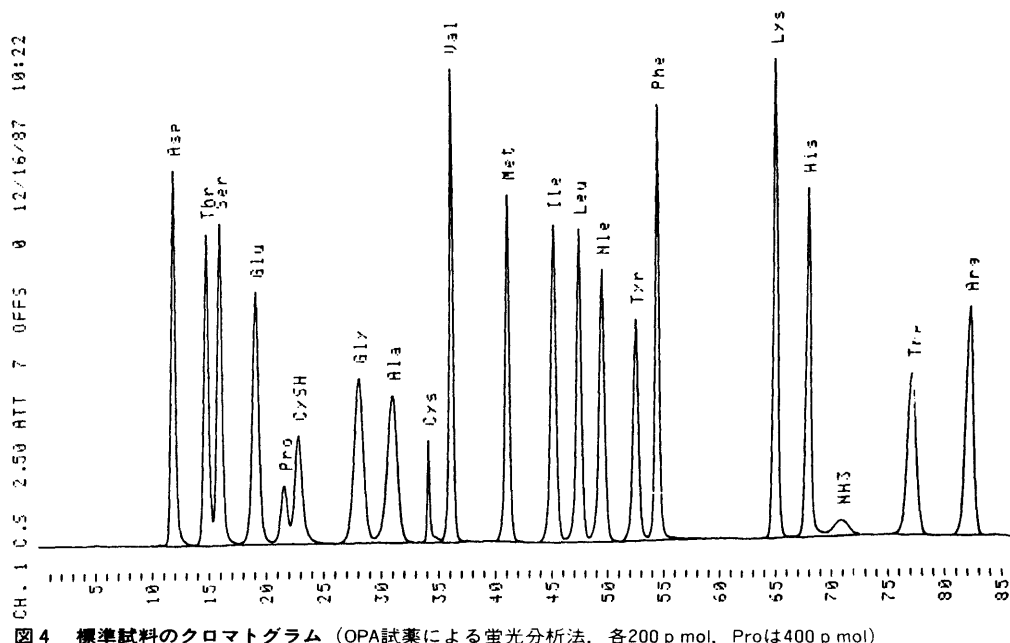


図4 標準試料のクロマトグラム (OPA試薬による蛍光分析法, 各200 p mol, Proは400 p mol)

た。F-1100形分光蛍光光度計のSENSITIVITYのレンジを $\times 0.5$ で、200 p mol $\sim$ 1.8 n molのアミノ酸分析を試みたところ、ほとんどのアミノ酸が1.0 n molで直線性を失うことが分かった。特に、図4のクロマトグラムでピークがシャープで感度の高いアミノ酸、例えばVal, Lys, Pheなどが著しく、ピークがブロードで感度の低いPro, CySH, Gly, Alaなどは1 $\sim$ 1.4 n mol以上で、検量線が曲がること

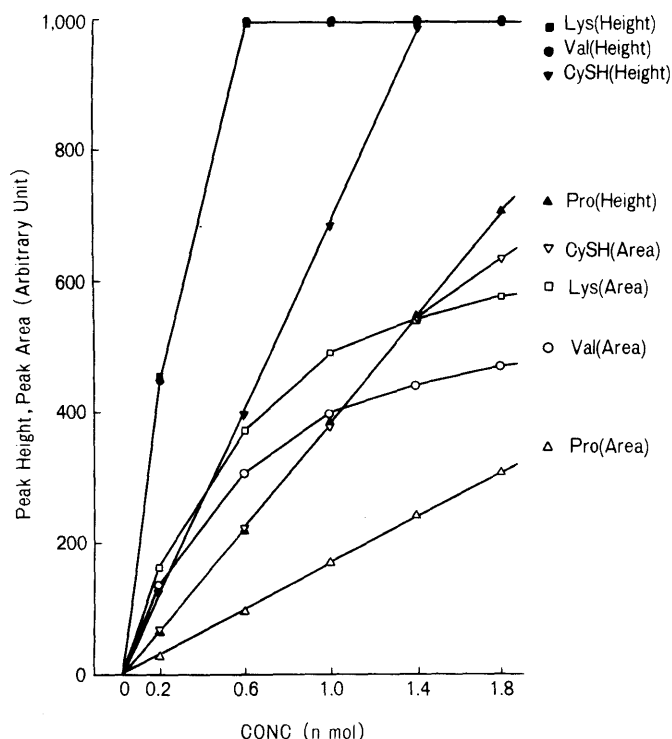


図5 蛍光法による直線性 (SENS 0.5)

が分かった。これらの結果は図5に示した通りで、ピーク面積の検量線よりもピーク高さの方がカーブが急であること、つまりクロマトグラムの計算結果のピーク高さが1 n molをすぎると、ほとんどのアミノ酸で 9.99×10^5 カウントから増加しないことが分かった。即ち、検出器からデータ処理装置への入力信号が1 Vを超えてしまうためで、検知器 (ホトマルチプライア) の印加電圧が同じ他のレンジ ($\times 0.05 \sim \times 20$) でも、データ処理装置の出力は変わらないので同じ結果である。

そこで、ホトマルチプライアの印加電圧の低いレンジである、SENSITIVITYを $\times 0.01$ (F-1100形の最低レンジ) で同様の分析を試みたところ、図6にその結果を示したように、ピーク感度の高いアミノ酸であるVal, Lysでも2 n molまで、ピーク高さの低いPro, CySH, Gly, Alaなどは更に直線性範囲がのびていることを確認することができた。換言すれば、蛍光強度の強い場合でもセル内での損失はないと考えられる。

これらの結果から、検出器のSENSITIVITYを $\times 0.01$ レンジで測定すれば2 n molまでは検量線の直線性があるので、全てのアミノ酸が50 p mol $\sim$ 2 n molの範囲に入るように、試料注入量を考慮すればよいことになる。なお50 p molでの再現性は、すべてのアミノ酸についてCV値で3 %以下であった。

4. おわりに

以上述べたように、L-8500形日立高速アミノ酸分析計による直線性範囲は、ニンヒドリン法による標準分析法で ~ 30 n mol, OPA法による蛍光検出法で ~ 2 n molであることを確認した。特に、蛍光検出法の場合は、検知器 (ホトマルチプライア) の印加電圧を低くすることによって直線性範囲を広げることができた。OPA反応によるアミノ酸の蛍光物質の蛍光強度は、クロマトグラム上でシャープなピークでも25 n molまでは直線性が得られることが知られてお

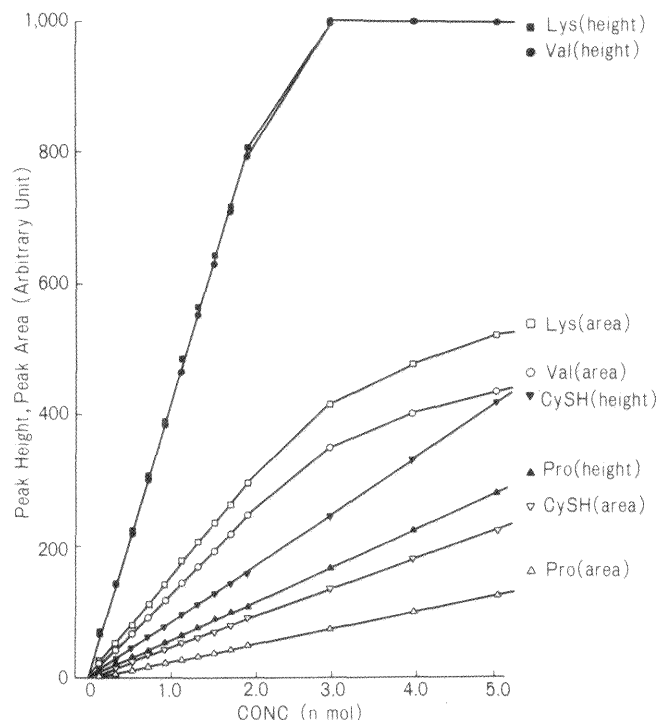


図6 蛍光法による直線性 (SENS 0.01)

り⁵⁾、これ以下で直線性がなくなるのは、データ処理装置の入力電圧の範囲 (−0.01~1 V) で制限されているためである。F-1100形分光蛍光光度計の直線性範囲にも限界があるが、入力電圧の広いデータ処理装置を用いれば、更に広い範囲に亘って検量線の直線性が得られるはずである。

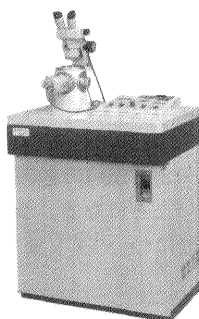
何れにしても、ニンヒドリン法で約100倍、蛍光法で約40倍の範囲に亘って直線性があることが分かった。しかしながら、極端に量比の異なるアミノ酸のピークが近接している場合には、少量のアミノ酸が大量のピークのショルダ部分にかくれてしまって、正確に定量できないことがあるので、このような場合には、分析時間を犠牲にしても各アミノ酸の分離を良くする工夫が必要である。

参考文献

- 1) 高田芳矩, ほか: 日立評論, **69**, 4, 333 (1987)
- 2) 高田芳矩, ほか: Hitachi S. I. News **29**, No. 4 18 (1986)
- 3) L-8500形日立高速アミノ酸分析計 取扱説明書 (Part No. 855-9026-6 YY-H (HTT-NK))
- 4) 池田水江, ほか: Hitachi S. I. News **30**, No. 1 17 (1987)
- 5) G. J. Hughes, et al.: J. Chromatogr., **235**, 417~426 (1982)

Topics

E-3100形 日立フラットミリング装置



半導体素子は、高集積化に伴いパターン寸法は年々微細化しています。これに加え、深い溝構造、多層の積層構造など断面方向においても複雑になってきています。これらLSIプロセスの研究開発や製造管理で、半導体素子の表面や断面の「形状観察」は重要な評価手段です。

E-3100形日立フラットミリング装置は、半導体素子をSEM観察するときの前処理装置です。アルゴンのイオンビームを試料表面に照射することによって、広い面積を均一にスパッタエッチングするもので表面観察時での表面の絶縁保護膜の除去や、断面試料の機械研磨の最終仕上げ工程などに威力を発揮します。

■ 主な特長

1. 広い面積をフラットミリング

直径約5 mmの広い面積を均一にミリングし、さらに、試料のセット位置

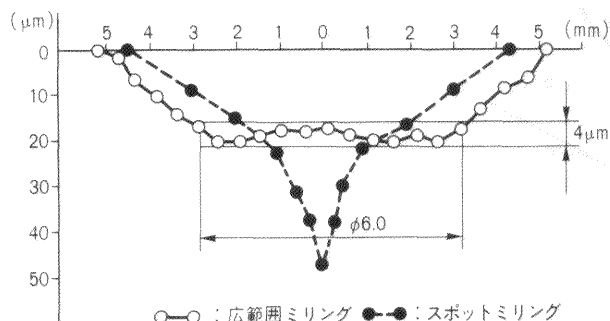
を移動するだけで一部分だけ深くミリングする、スポットミリングも可能です。

2. 高いミリングレート

直径5 mmの面積をフラットにミリングしたとき、3 $\mu\text{m}/\text{h}$ (Cu) の高いミリングレートを持っています。

3. 容易な保守

イオンガンはカソードカラー方式を採用して、汚れによる絶縁不良を防止しています。また、カソードはチタン製を採用したため、長時間の使用に耐え、保守が容易です。



○—○ : 広範囲ミリング ●—● : スポットミリング
ミリングプロファイル

ミリング条件 試料: Si, 印加電圧: 6 kV, 放電電流: 1.0 mA, 照射角: 60度, ミリング時間: 10 h (広範囲ミリング)/4 h (スポットミリング)

解 説

 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMRスペクトルデータベースによる検索/同定システム

A Computer-Assisted Structure Elucidation Scheme Based upon the Pattern of Assembly of Peaks in Carbon-13/Proton NMR Spectra

田中 保子* 笹淵 仁** 橋本 正雄***

(平成元年 3 月 30 日受理)

1. はじめに

有機化合物の同定を目的としたスペクトルのコンピュータによる検索システムの開発研究は新しいテーマとはいえないが、近年のパーソナルコンピュータの発展とラボラトリーオートメーション化の機運とあいまって研究が進行されている¹⁾。このようなシステムは、入力された未知化合物のスペクトルとデータベース中の参照化合物のスペクトルとを比較し、両者の類似の度合い(合致度と定義)を数値化することを基本としていて、赤外吸収²⁾、ICP発光³⁾及び核磁気共鳴(NMR)スペクトル^{4)~18)}、MSスペクトル²⁰⁾などで自動化されるようになってきた。

^{13}C -NMRスペクトルの検索同定システムについて言えば、多数の化合物から求めたある特定の領域に化学シフトが出現する確率に基づく方法^{4),16)}と、化学シフトの分布パターン(着目するピークの周囲に何本のピークが存在するか)に基づく方法^{5),9)}が提唱されていて、データベースの質(未知化合物と一致あるいは類似する化合物のデータをたまたま含んでいるか否かという意味で)に依存するという弱点は持っているが極めて有効であることがわかっている。

^1H -NMRスペクトルの検索同定システムについては報告例^{17),18)}は少なく、 ^{13}C -NMRスペクトルの場合とは異なって ^1H -NMRは主として部分構造解析のほうに主眼を置いて使用されていることがうかがえる。しかし、過去測定されている ^1H -NMRスペクトルの数は ^{13}C -NMRスペクトルに比べて数倍多いし、共鳴核の天然存在比から考えて感度的に有利であることから、 ^{13}C -NMRスペクトルの場合と同様なデータベースの検索による同定システムの開発^{7),8),12)}の意義は大きい。

本報告では、 ^{13}C -NMRおよび ^1H -NMR検索同定システムを一体化^{11)~13),15)}した著者らの $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMR検索同定システムの紹介を行う。

2. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -NMRスペクトル検索同定システムの概要

(1) 本システムでは未知物質の ^{13}C -NMR又は ^1H -NMRスペクトルの化学シフト、および共鳴吸収強度の値をデータベース中の参照化合物のそれと比較し、それらの分布パターンがあるしきい値以内で合致もしくは類似するものを選択し、合致の度合いを数値的および視覚的に表示し、必要な場合は分析者の判断にゆだねることができる。

- (2) 本システムではスペクトル測定部から通信又はキーボード入力により取り込まれた最大100本の信号(化学シフトおよび強度値)を次節に述べるパターン化アルゴリズムにより、最大40本のデータに圧縮してパターン化することができる。
- (3) データの修正、追加は対話形式で極めて容易に行うことができる。
- (4) 未知物質の同定という目的のほかに、参照化合物の分子名を入力することにより、その化学シフト値、文献名(又は分子名、最大60文字)を検索でき、未知化合物とのパターン比較ができる。
- (5) 検索同定中および結果に分子の構造式を表示することができる。
- (6) 本システムはスペクトル測定部の近辺で、分析者が手元において使用できることを図っているので、コンピュータとしてはパーソナルコンピュータレベルのものを使用する。データベース用の外部記憶装置としては、ハードディスク又はフロッピーディスクを使用する。
- (7) 原理的にはデータ検索であるので、なんらかの形でデータ群のサーチのためのスキャンを行わなければならないが、その際、外部記憶装置の駆動時間が問題となり、検索時間の大半を占める。データ100件当たりの合致度判定の論理計算を含んだスキャン時間は、現在のところ ^1H -NMRの場合約9分であるが、BASICのインタプリタをコンパイラに変更することによって時間を数分の一に短縮させることができる。
- (8) 未知物質がどんな分類に属するかが分かっている場合には、この情報を用いて上記時間を大幅に短縮できる。すなわち、通常の文献検索¹⁹⁾のように大分類、小分類の分野別に参照化合物を分類して、どの分野に属するかをデータベース構築の段階で指定する。
- (9) データベースに分析者にとっての未知物質が登録されていることは必ずしも期待できないので、未知物質に部分的に類似したものも推挙する。この数が多いときは全体的に類似したものだけを推挙する。

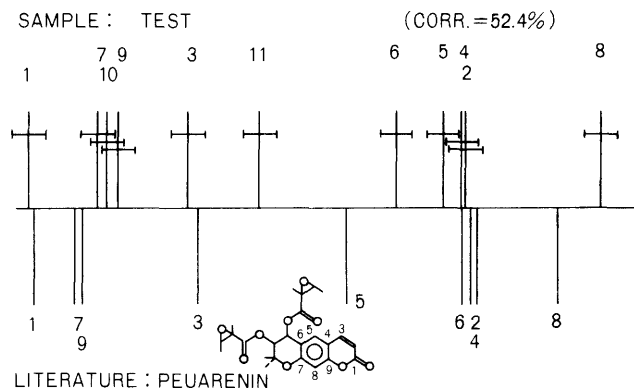
3. 合致度判定のアルゴリズム

図1^{9),14)}で未知化合物の ^{13}C -NMRスペクトルは、横軸に化学シフトをとり、縦軸にピーク強度を取った場合、横軸上の分布密度に化合物ごとの特徴がある。同様に外部記憶媒体中の参照化合物のスペクトルも、横軸上のピークの分布密度に特徴を持つ。分布密度の特徴の数値化は着目する

* 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

** 株式会社 日立製作所 那珂工場

*** 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 理博

図1 ^{13}C -NMRパターンの比較例

ピークの前後 $\pm\sigma$ 以内に何本のピークが存在するかによってなされる。図1の例では、未知化合物のスペクトルに相当する上部の特徴は“1311131”で、参照化合物のスペクトルに相当する下部の特徴は“121131”で表現される。以下、このような数値列を ^{13}C -NMRスペクトルでのパターンと呼ぶことにする。

未知化合物と参照化合物のスペクトルの特徴の類似性は、即パターン間の類似性に反映されているはずである。上記の例では、“1131”の数値列が両パターンに共通で、この部分で両者は類似しているとみなされる。これらパターンの

共通部分が多ければ多いほど両者は類似していると考えられる。共通部分 α に属するピークの位置に関して両者の相関係数 γ_α を求める。共通部分は1個とは限らないので、複数個の場合はそれらの平均値をとる。共通部分が互いに近い距離にあるとき、相関係数は合致度のよい指標となるが、距離が大きくなった場合、本来互いに対応づけられない原子団をパターンが同じという理由だけで対応させ、比較的高い合致度を与えてしまうという欠点がある。換言すると距離の大小に応じた補正が必要である。この補正係数として共通部分 α に属するピーク間の距離の平均 γ_α の関数 $k(\gamma_\alpha)$ を導入する：

$$k(\gamma_\alpha) = 1 / (f_\gamma \times \gamma_\alpha + 1) \quad \cdots \cdots (1)$$

ここでは f_γ は実験により定められるパラメータである。

未知化合物と参照化合物のピーク数の差も両者の合致度の一つの指標であることは自明である。このようにして、両者の最終的な合致度 R は相関係数 γ_α 、距離に関する補正係数および両者のピーク数の比 β により次式のように表現される：

$$R = \gamma_\alpha \times k(\gamma_\alpha) \times \beta \quad \cdots \cdots (2)$$

未知化合物と参照化合物が一致する場合には、定義により γ_α 、 $k(\gamma_\alpha)$ 、 β はいずれも1となり、 $R = 1$ となる。便宜上これを100%の合致度と呼ぶ。両者が完全に一致するものがない場合は、一定のしきい値 R_0 以上のものを部分的に類似したものとみなす。 δ および f_γ の導入により、単純に相関係

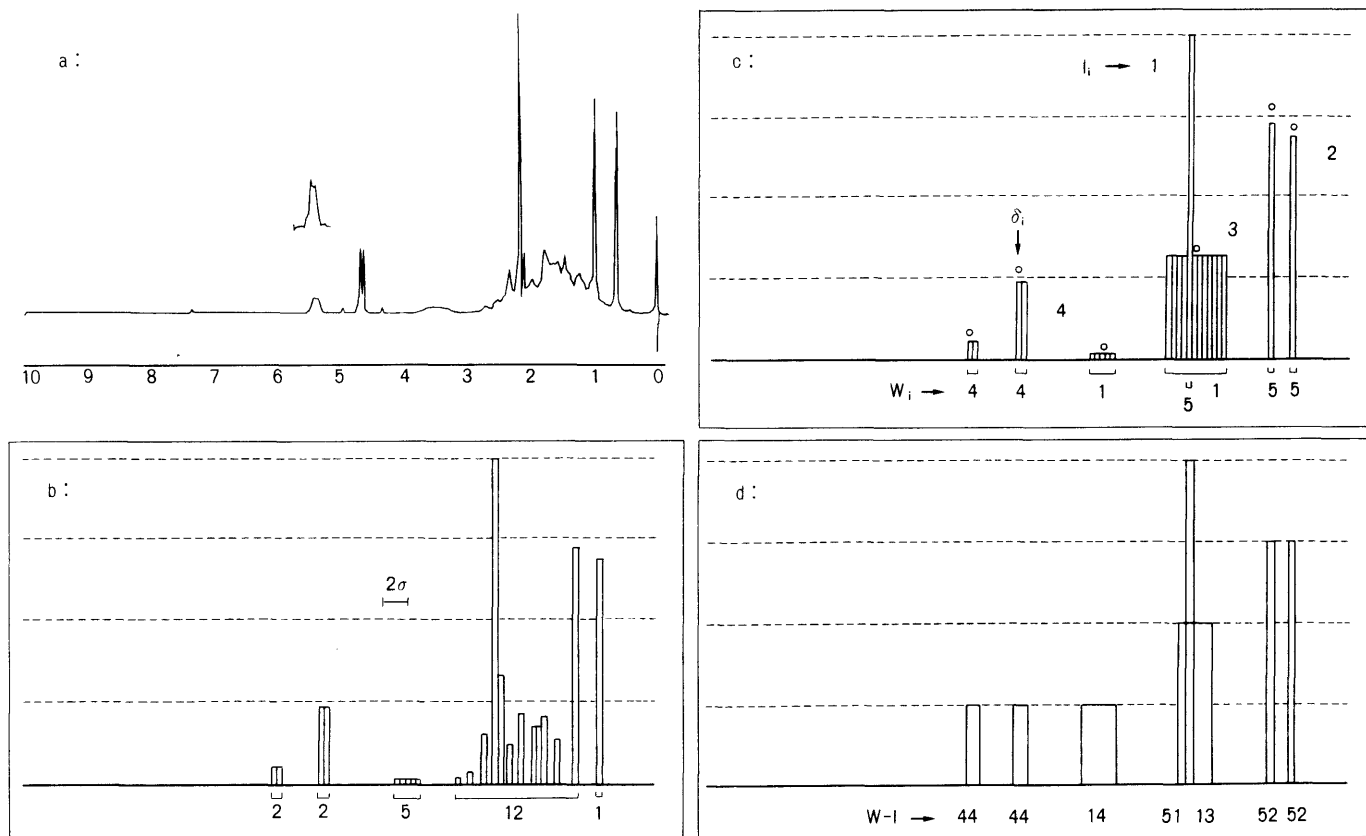
図2 ^1H -NMRパターン化手順

Fig. 1. Procedure through which the experimental spectra (a) are patternized in terms of the peak multiplicity and intensity into the rectangles (d).

数しか考慮しない場合に比較して、パターン類似の度合いと構造上の類似の度合いがよくつくようになった。

図2^{11),15)}で未知化合物および参照化合物の ^1H -NMRスペクトルは化学シフトを横軸に、ピーク強度を縦軸にとった場合、 ^{13}C -NMRスペクトルの場合と同様に横軸上のピークの分布密度に特徴が現れるが、更にピークの相対強度にも化合物固有の特徴が現れる。したがって、 ^1H -NMRスペクトルではこれら2種類の特徴が類似度判定に使用できる。これらの特徴の数値化は以下のようになされる。まず、横軸上のピークの分布密度は ^{13}C -NMRスペクトルの場合と同様に着目するピークの前後 $\pm\sigma$ 以内に何本のピークが存在するかによって、多重度を持った一つのグループ(パターン化されたピーク)に属すると考える。この際、多重度が5以上のグループについてはグループ内の最大強度のピークの $\frac{3}{4}$ 以上の強度を持つピークは一つのピークとして扱う(図2のc参照)。このようなピーク群の強度は、スペクトル全領域の中の最大強度を1として規格化した場合のグループ内の最大強度を4段階に分けたもの(I_i)で表す。多重度は5以上のものを1とし、以下減少する順に2, 3, ……と増加する幅パラメータ(W_i)で表す。このようにして、ピーク群 i は W_i, I_i を要素とした長方形にパターン化される(図2d参照)。距離 Δ ppm以内にあるパターン化されたピーク群 i および j をそれぞれ未知および参照化合物のものとするれば、両者の合致の度合いは次式で表される:

$$R = (\beta, \gamma) = \sum_{m=1}^M R_{ij}^m \times (M/B) \times 100 (\text{in } \%) \cdots (3)$$

$$R_{ij}^m = R_{ij}^{W_i} \times R_{ij}^I \cdots \cdots (4)$$

$$R_{ij}^{W_i} = [1 / (|W_i - W_j| \times f_w + 1)] \times [1 / (|I_i - I_j| \times f_i + 1)] \cdots \cdots (5)$$

$$R_{ij}^I = 1 / (|\delta_i - \delta_j| \times f_\delta + 1) \cdots \cdots (6)$$

ここで f_s は実験結果定まるパラメータであり、 δ はグループ内の最大強度を与える化学シフト値である。 M は(i, j)の組の数であり、 B は参照化合物のパターン化されたピークの数である。ただし、 B は未知化合物のパターン化されたピークの数 A よりも小さいとし、逆の場合は(3)式で B の代わり A を用いる。これらの比 $\beta = M/B$ (A)が合致度に寄与することは ^{13}C -NMRスペクトルの場合と同様である。

3. 実験

参照化合物の化学シフト、パターン化した多重度、強度は日立B16-MXIIパーソナルコンピュータの20 Mバイトハードディスクに格納しておき、前節のアルゴリズムによるBASICプログラム上で未知化合物との比較が行われる。プログラムの流れ図を図3に示した。データベースに関しては任意の化合物について ^1H -NMRと ^{13}C -NMRスペクトルが対で得られるとは限らないので、それぞれ補助記憶装置の異なる場所に化合物群ごとに格納して ^1H と ^{13}C の検索を別個に行う。 ^1H 又は ^{13}C により化合物群の推定がつく場合には、互いに検索範囲を限定することができる。

ピーク強度は一組につき7バイトに収め、分子構造式を表示するための座標格納に必要な部分と合わせて、1化合物当たり約600バイトの記憶領域を充たさせている。

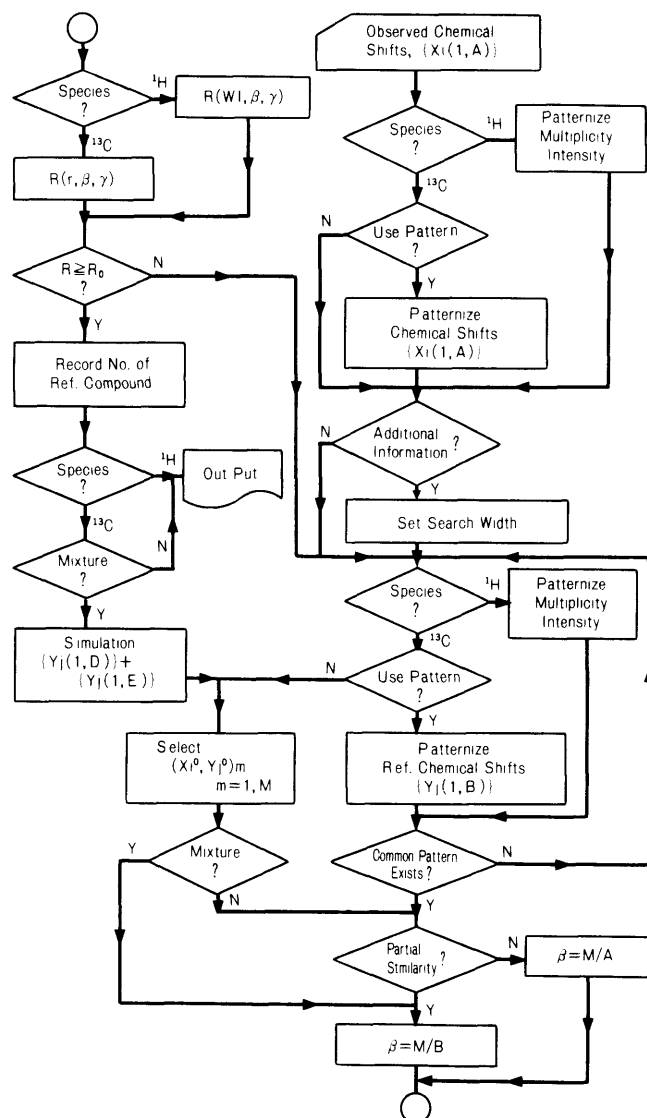


図3 プログラム流れ図

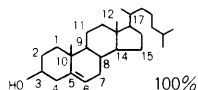
4. 結果と考察

約100種のステロイド化合物について、コレステロールおよびテストステロンを未知化合物とみなした場合の ^{13}C -NMRおよび ^1H -NMRスペクトルによる部分的合致度(%)を表1~4に示す。表1, 2で σ の選択のいかんによって合致度の順位が変化してくるが、コレステロールの5~6位炭素間の二重結合および17位炭素の鎖状炭化水素基、テストステロンの3位炭素のカルボニル基および4, 5位炭素間の二重結合に着目すると、 $\sigma = 0.13$ ppmを設定した場合が妥当である。データベースの差はあるが、表3, 4の ^{13}C -NMRスペクトルによる場合と対応した結果が得られ、両者による結果を総合すると検索同定の精度を高めることができる。

図4, 5でコレステロールに対するその酢酸エステル、およびコレスタン-3-オンの合致の度合いを ^1H -NMRおよび ^{13}C -NMRについてパターンの比較をした。これより、全体的に類似したものを検索するには ^{13}C -NMRが、また部分的に類似したものを検索するには ^1H -NMRが適していることが示唆され、1.で述べたように ^1H -NMRは主として部分

表 1 ^1H -NMRによるコレステロールに対する合致度(%)

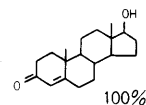
Table 1 Effect of σ upon the similarity of the reference compounds against the unknown (cholesterol) at $\Delta = 1.5\text{ppm}$, $f_y = 0.6$, $f_w = 1$ and $f_i = 0.5$.



$\sigma : 0.11$	$\sigma : 0.13$	$\sigma : 0.15$
87.7	90.4	86.2
87.7	86.4	85.9
86.4	84.7	85.9
79.4	80.5	84.8
77.5	78.9	84.3
75.6	78.5	83.0
74.2	78.4	78.5

表 2 ^1H -NMRによるテストステロンに対する合致度(%)

Table 2 Effect of σ upon the similarity of the reference compounds against the unknown (testosterone) at $\Delta = 1.5\text{ppm}$, $f_y = 0.6$, $f_w = 1$ and $f_i = 0.5$.



$\sigma : 0.11$	$\sigma : 0.13$	$\sigma : 0.15$
88.7	88.4	95.5
85.9	88.3	89.4
83.4	83.5	86.6
82.6	79.0	86.2
79.0	78.8	84.8
78.2	77.9	82.6
77.7	74.4	77.5

表 3 ^{13}C -NMRによるコレステロールに対する合致度(%)

Table 3 The similarity of carbon-13 spectral patterns between cholesterol and the reference compounds at $\sigma = 2\text{ppm}$, and $f_y = 0.3$.

86.5	73.6
82.7	73.5
78.7	73.4
76.6	70.8
74.4	69.9
73.8	69.9

表 4 ^{13}C -NMRによるテストステロンに対する合致度(%)

Table 4 The similarity of carbon-13 spectral patterns between testosterone and the reference compounds at $\sigma = 2\text{ppm}$, and $f_y = 0.3$.

73.8	66.4
70.4	66.2
69.7	65.4
69.6	62.5
68.2	62.1
68.1	68.1

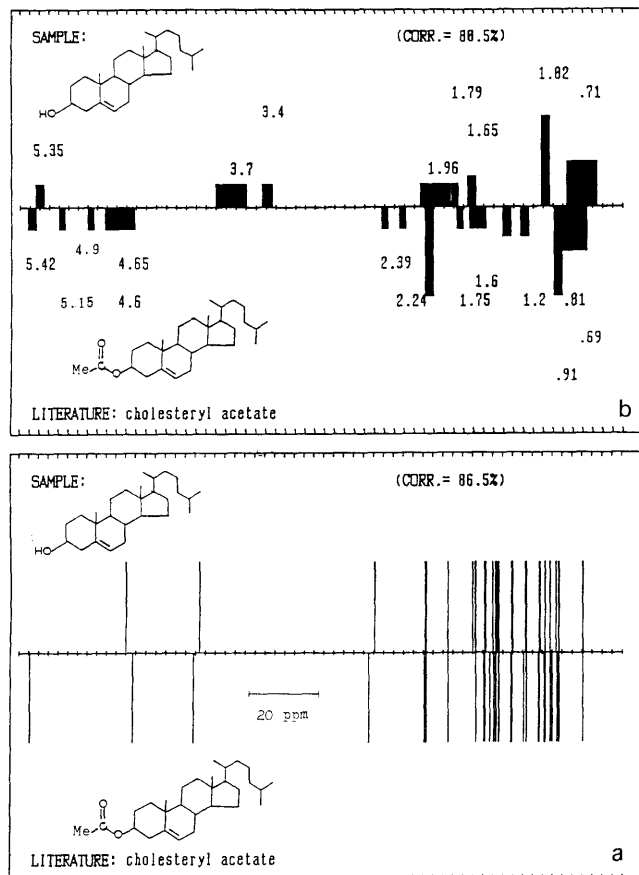


図4 コレステロールに対するその酢酸エステルの合致度

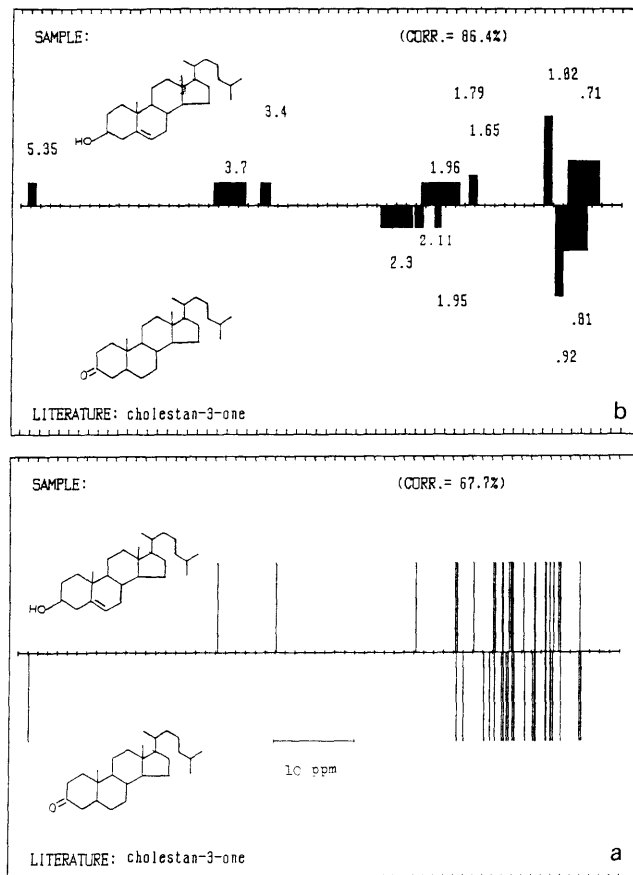
(a) ^{13}C -NMR (b) ^1H -NMR

図5 コレステロールに対するコレスタン-3-オンの合致度

(a) ^{13}C -NMR (b) ^1H -NMR

構造の解析に主眼を置いて使用されてきたことと矛盾せず、両者は互いに相補的に使用されるべきものと考えられる。

5. おわりに

最後に ^{13}C -NMRスペクトルの場合は、混合物の成分の検索同定が本システムでは可能であるが、これについては文献(6), 7), 14)を参照していただきたい。

参考文献

- 1) S.D.Brown, T.Q.Barker, R.T.Larivee, S.L.Monfre and H.R.Wilk: Anal. Chem., **60**, 252R (1988).
- 2) 田隅三生, 鈴木 功, 藤原 譲, 第3回情報化学討論会講演要旨集, p.94 (1980).
- 3) 橋本正雄, 蔦島妙子, 上武成吾, 保田和雄: 分析化学, **34**, 600 (1985).
- 4) 石田嘉明, 齊藤啓治, 大島時生: 分析化学第30年会講演要旨集, p.64 (1981).
- 5) 田中保子, 橋本正雄, 服部忠鐵, 第9回情報化学討論会講演要旨集, 3連J07 (1986).
- 6) 田中保子, 橋本正雄, 服部忠鐵: 日本化学会第54春季年会講演要旨集, 31VA43 (1987).
- 7) 田中保子, 橋本正雄, 服部忠鐵: 分析化学第36年会講演要旨集, 1105, 1106 (1987).
- 8) 田中保子, 橋本正雄, 服部忠鐵: 第10回情報化学討論会講演要旨集, 8I34 (1987).
- 9) M.S.Hashimoto, Y.Tanaka, and C.F.Hattori: Anal. Sci., **3**, 17 (1987).
- 10) 田中保子, 橋本正雄, 服部忠鐵: 日本化学会第56春季年会講演要旨集, 3XIF09 (1988).
- 11) 田中保子, 橋本正雄, 笹淵 仁, 服部忠鐵: 第27回NMR討論会講演要旨集, p.271 (1988).
- 12) 田中保子, 橋本正雄, 笹淵 仁, 服部忠鐵: 日本化学会第57秋季年会講演要旨集, 1B402, 1B403 (1988).
- 13) 田中保子, 橋本正雄, 笹淵 仁, 服部忠鐵: 分析化学会第37年会講演要旨集, 3E26, 3E27 (1988).
- 14) M.S.Hashimoto, Y.Tanaka, and C.F.Hattori: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **4**, 251 (1988).
- 15) M.S.Hashimoto, Y.Tanaka, H.Sasabuchi, and C.F.Hattori: ibid., **5**, in press.
- 16) R.W.Bally, D. van Krimpen, P. Cleig and H.A. van't Klooster, Anal. Chim. Acta, **157**, 227 (1984).
- 17) 石田嘉明, 齊藤啓治, 大島時生: 分析化学会第30年会講演要旨集, p.364 (1981).
- 18) Y.Katagiri, K.Kanohata, K.Nagasawa, T.Okusa, T.Sakai, O.Tsumura and Y.Yotsui: Anal. Chim. Acta, **133**, 535 (1981).
- 19) 橋本正雄, 内野興一, 大貫計時: The Hitachi Scientific Instrument News, **27**, 25 (1984).
- 20) G.R.Waller: Biochemical Applications of Mass Spectrometry.

日立高速液体クロマトグラフ用前処理機能付きオートサンプラと、これを用いたプリカラム誘導体化

HITACHI HPLC Autosampler with Sample Preparation Capability : Application to Pre-Column Derivatization

平田 源蔵* 萩谷 薫** 加地 弘典* 野上 太郎**三浦 順吉**

(平成元年 5 月 30 日受理)

1. はじめに

HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) は、日本語では高速液体クロマトグラフという表現をされているように、短時間で高分離データの得られる点が重要視されている。この「高速」の程度も時代とともに進歩し、最近では、Very High Speed LCとか、Ultra High Performance LCなどの新しい言葉も生まれている。

応用分野面でも、従来の化学工業、医薬品、食品、環境に加えて、最近では、バイオテクノロジーや医療の分野まで広がっている。これに伴い、より自動化の進んだ装置の、専用機に対する要求が高まっている。

一方、目的成分を高感度で、選択性高く検出するのに有効な手段として、反応液体クロマトグラフィーがある。これには、試料中にあらかじめ反応試薬を加えて反応させ、目的成分を高感度検出可能な誘導体に変えてからカラムに注入する方法、あるいはカラムからの流出液に適当な反応試薬を加え、誘導体化して検出する方法がある。後者は、ポストカラム誘導体化法と呼ばれ、アミノ酸分析・糖分析の分野をはじめ多くの分野で、高感度・高選択性の検出手段として一般的に用いられている。しかし、目的成分がカラムを流出してから数メートルもの反応コイルを通過させるために、前述のように「より高速に高分離分析を行う場合」には、必ずしも有利とは言えない。このような場合には、あらかじめ試料に反応試薬を加え、目的成分を高感度検出するのに適する誘導体に変えてからカラムに注入する方法、すなわちプリカラム誘導体化法が有効な手段となる。

前処理機能付きオートサンプラにこのプリカラム誘導体化法を適用すると、反応試薬を加え、目的成分をあらかじめ高感度検出するのに適する誘導体に変えて分離カラムに注入する工程を、全自動で行うことができる。検出器はカラム直後に接続されるので、カラム外でのピークの広がりは、最少に抑えることができる。溶離条件を適切に定めることによって、高スループットの自動分析システムを組むことができる。

前処理機能付きオートサンプラAS-4000形は、基本性能及び信頼性に優れているだけでなく、「全自動・短時間分析」の時代の要求を満たすものと言うことができる。以下に、機能・性能及びプリカラム誘導体化による自動分析システムへの応用について述べる。

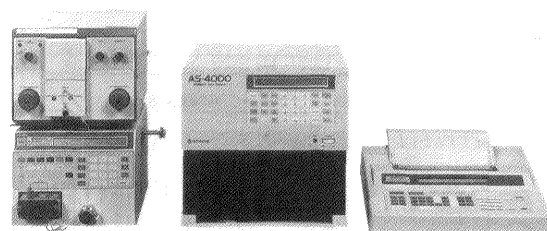


図1 システム構成例

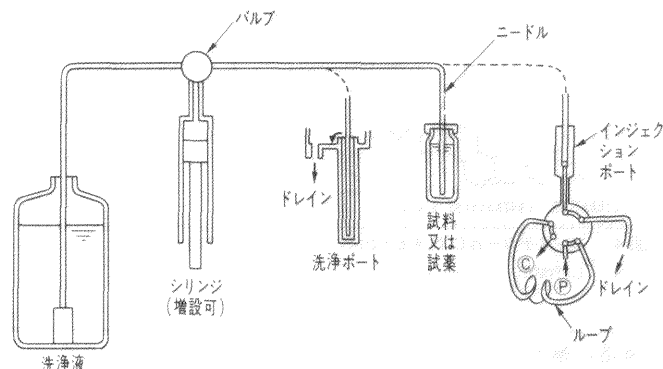


図2 流路系

2. 装置の概要

AS-4000形を含む自動分析システムの構成例を図1に示す。図2は、AS-4000形の流路の概要を示すものである。洗浄液、試料、反応試薬などを吸入・吐出するためのシリンジ、インジェクションポート付きサンプリングバルブ、各バイアル及びその間を動くニードル、洗浄ポートなどの機能を示している。

プリカラム誘導体化法では、試料と試薬を反応びんに移し、反応後これを吸引して分離カラムに注入することになる。

3. 基本性能

図3に、ナフタレン、アントラセン及びクリセンの3成分の混合物の分析を行ったときの再現性を示した。カラム性能を含めた再現性でもCV値が0.4%以下であることがわかる。

図4は、キャリアーオーバの測定結果である。試料として、1%アセトン/溶離液を50 μ l注入してクロマトグラムを描き、次に溶離液だけ50 μ l注入してクロマトグラムを描いたものである。後者のピーク面積と前者のピーク面積の比で定義したキャリアーオーバは、0.008%と良好であった。

* 株式会社 日立製作所 那珂工場 科学機器システム部
** 株式会社 日立製作所 那珂工場 科学機器設計部

No.	ピーク面積($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)		
	ナフタレン	アントラセン	クリセン
1	2213533	1309671	969217
2	2240385	1318623	980963
3	2229961	1313739	975763
4	2238119	1314797	978434
5	2233677	1315927	977343
6	2233032	1315054	979924
7	2236481	1314429	980406
8	2250248	1321319	983885
9	2231320	1312282	977702
10	2239989	1318348	980816
11	2243255	1319627	981205
12	2240529	1314905	979759
13	2227490	1312366	975339
測定回数 (n)	13	13	13
平均値 ($\bar{x}$)	2235232	1315468	978519
標準偏差 (SD)	8935	3271	3658
変動係数 (CV)	0.39%	0.29%	0.37%

図3 3成分分析の再現性

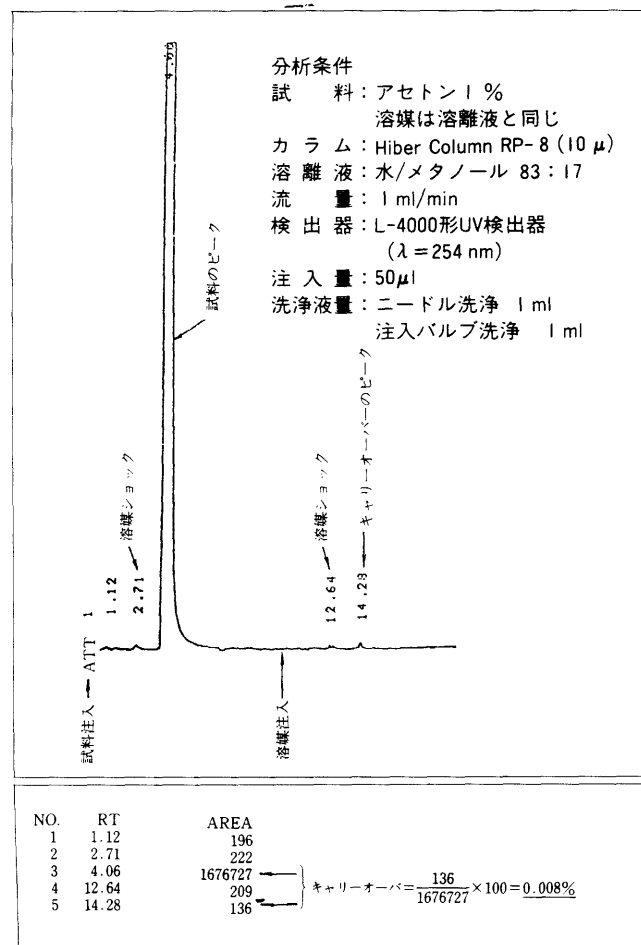
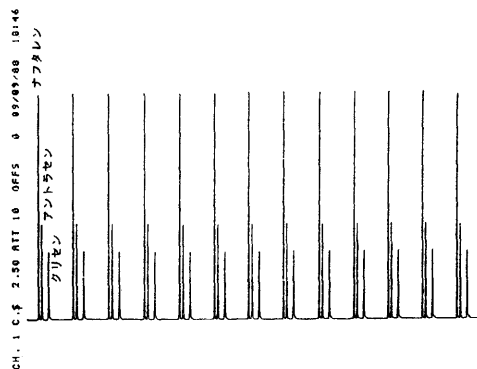


図4 キャリーオーバーの測定例

4. 希釈機能

試料によっては、分析前に希釈する必要がある場合がある。AS-4000形オートサンプラでは、希釈を1本のシリンジで行うこともできるし、2本のシリンジを設けて試料の計量と希釈液の計量とを別々に行うことも可能である。

図5は、500 μl シリンジ1本と1.5 mlの希釈容器を使用し、0.1 % フマル酸水溶液を蒸留水で40倍に希釈した後10 μl



分析条件

試料：ナフタレン、アントラセン、クリセン/メタノール溶液

カラム：日立ゲル#3056 ($\phi 4 \times 150 \text{ mm}$)

溶離液：メタノール

流量：1 ml/min

検出器：L-4000形UV検出器 ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

注入量：10 μl

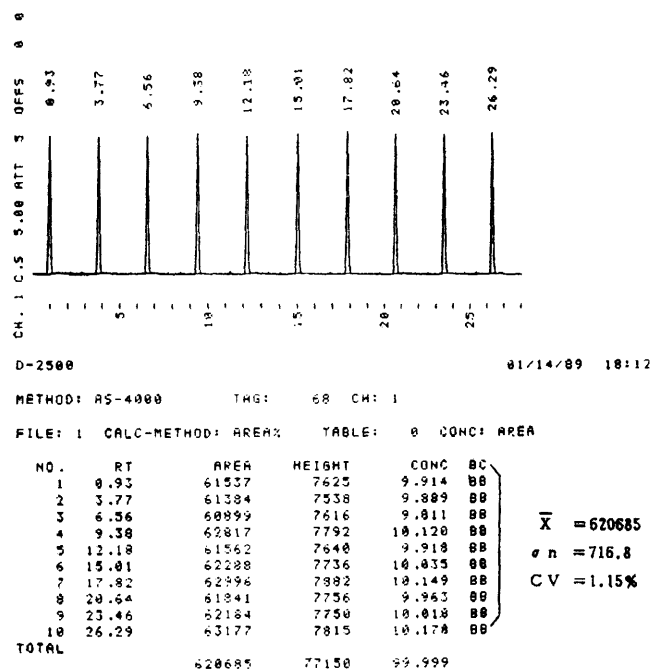


図5 水系サンプルでの分注(希釈)再現性

分析条件

試料：フマル酸0.1g/100ml H₂O

カラム：0.25mmid $\times$ 10m (テフロンチューブ)

溶離液：H₂O, 希釈液：H₂O

流量：1 ml/min

希釈倍率：40倍 (サンプル/希釈液 = 10/390 μl)

混合回数：5回

波長：254nm

注入量：10 μl

洗浄液量：ニードル洗浄 1 ml

注入バルブ 1 ml

注入したときの再現性測定結果である。CV値は1.2 %以下であった。

5. 少量試料のための全量注入法

通常の試料注入法は、注入量よりも多量の試料を吸引し、前後の部分をカットして、中央の部分だけを計量し注入するものである。これにより、正確な量を注入することができる。しかし、得られるサンプル量が少なく、前後の部分をカットする余裕のない場合には、次のような注入法を採用することも可能である。

この方法は、AS-4000形の特長であるプログラミング機能

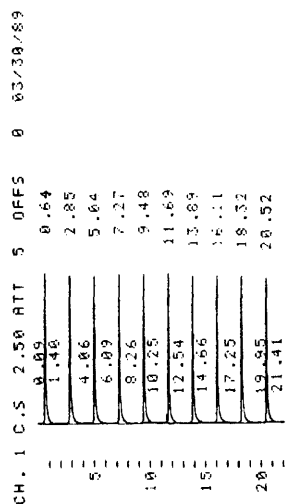


図6 1 μ l全量注入の再現性

$\bar{X}$ =52518.9
SD=1287.8
CV=2.45%

D-2500

03/30/89

METHOD: AS-4000

TAG: 20 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA%

TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC
4	0.64	53365	6526	10.161	UU
14	2.85	55827	6452	10.629	BU
20	5.04	52427	6393	9.982	UU
26	7.27	52081	6479	9.916	UU
32	9.48	52701	6490	10.034	BU
41	11.69	52507	6497	9.997	UU
48	13.89	52365	6394	9.970	UU
57	16.11	51580	6389	9.821	UU
63	18.32	51430	6362	9.792	BB
67	20.52	50906	6276	9.692	BU

TOTAL

52518.9 64258 100.000

PEAK REJ :

10000

を活用し、吸引した試料をすべてカラムに導入する方法である。すなわち、インジェクションポートからインジェクションバルブまでのデッドボリューム分と、試料をサンプルループの中間付近まで押し込むためのフィードボリュームに相当する分をあらかじめ洗浄液から吸引するものである。さらに、この場合には試料の前後に空気層を設けて吸引し、試料の拡散を防止するようにしている。図6に、1.5 mlバイアル (50 μ l微量用インサート付) より1 μ lの試料を吸引し、全量注入して測定した場合の再現性データを示す。

6. プリカラム誘導体化による自動分析システム

図7に、OPA試薬を用いてプリカラム誘導体化を行ったアミノ酸自動分析システムの機能系統図を、図8に、プリカラム誘導体化の詳細を示す。図9は、グルタミン酸標準試料を用いて、前処理の再現性を確認したものである。CV値は0.8%であった。図10に、リゾチーム加水分解物のアミ

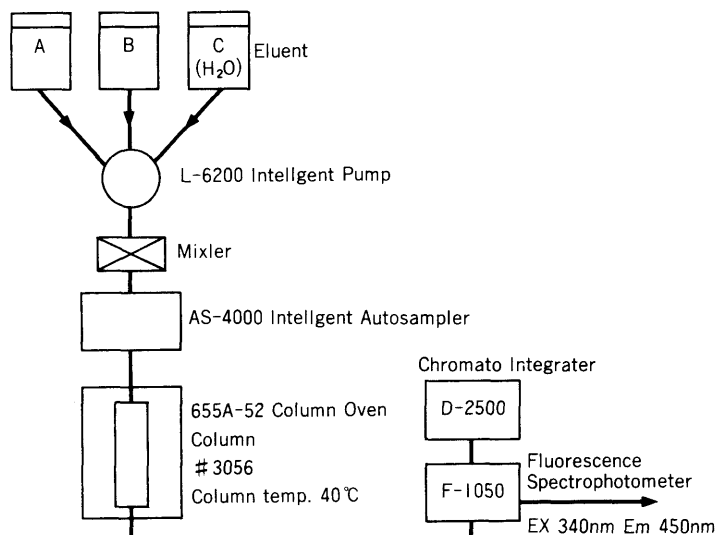


図7 プリカラム誘導体化による自動アミノ酸分析システム

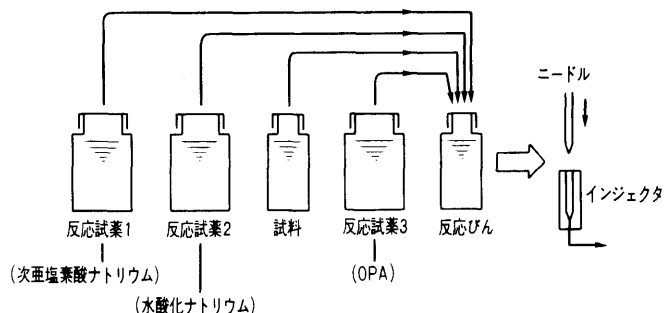
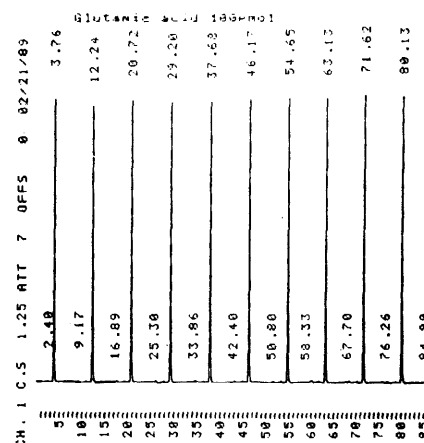


図8 OPA法による前処理の内容

1. ニードルに反応試薬1 (次亜塩素酸ナトリウム) を460 μ l吸入し、反応びんに350 μ lを吐出する。
2. ニードルに反応試薬2 (水酸化ナトリウム) を450 μ l吸入し、反応びんに350 μ lを吐出し、混合液をシリンジの吸入・吐出を繰り返し攪拌 (かくはん) する。
3. ニードルに試料を450 μ l吸入し、反応びんに350 μ l吐出し、シリンジの吸入・吐出を繰り返し攪拌後2分間反応させる。
4. ニードルに反応試料3 (OPA) 450 μ l吸入し、反応びんに350 μ l吐出し、シリンジの吸入・吐出を繰り返し攪拌後2分間反応させる。
5. 反応液を30 μ lインジェクションして分析を開始する。



D-2500

METHOD:

TAG: 59 CH: 1

FILE: 3 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0

NO.	RT	AREA	HEIGHT
2	3.76	697885	59177
5	12.24	679216	57759
9	20.72	692392	59994
13	29.20	687924	58509
17	37.68	688671	58821
21	46.17	690875	59153
25	54.65	690662	59223
29	63.13	691277	59565
33	71.62	697868	60267
37	80.13	691900	59940

TOTAL

6908358 591838

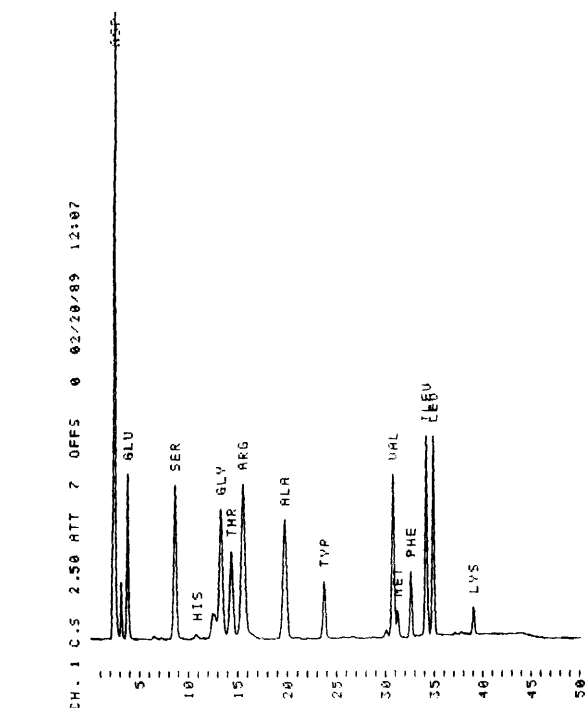
PEAK REJ :

20000

図9 グルタミン酸標準試料分析の再現性

ノ酸の測定結果を示す。今回の測定ではプロリンに重点を置いていないが、反応条件によりプロリンの検出感度を上げることができる。

アミノ酸分析以外でも、従来ポストカラム誘導体化法で行ってきた分析の多くが、AS-4000形オートサンプラを用いたプリカラム誘導体化システムで分析可能である。一例と



FILE: 3 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 5 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	HEIGHT	NAME	FWT	FACTOR
1	2.42	1839602	160953	ASP	376.492	204.660
3	3.80	400723	32152	GLU	83.759	204.929
7	8.65	595103	28914	SER	143.903	241.813
8	10.86	24115	891	HIS	117.833	739.508
10	13.32	650646	25338	GLY	169.386	260.336
11	14.40	431023	17072	THR	89.347	207.292
12	15.54	901058	30128	ARG	112.364	124.703
13	19.74	625812	23146	ALA	192.281	307.251
15	23.74	221156	11086	TYR	50.212	227.064
20	30.77	571505	31761	VAL	96.343	160.579
21	31.25	84638	5256	MET	33.520	396.050
22	32.60	196699	12872	PHE	47.707	242.957
24	34.16	596428	39151	ILEU	96.252	161.382
25	34.83	570280	39148	LEU	120.930	226.083
36	35.81	101000	5500	LYS	179.077	1484.142

図10 リゾチーム加水分解物の分析

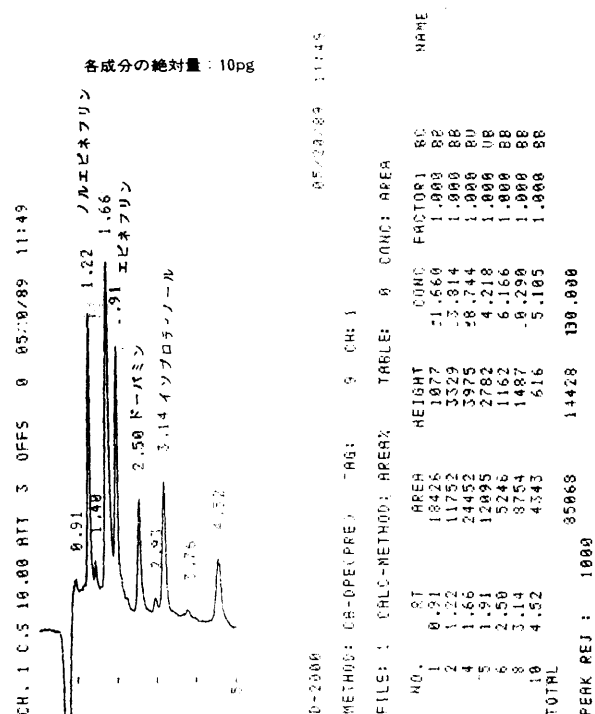


図11 カテコールアミンの分析例

して、図11にDPE試薬を用いたプリカラム誘導体化システムによるカテコールアミン分析のデータを示す。

7. おわりに

AS-4000形オートサンプラの種々の機能の中で、今回は特に、試薬を加えてバイアル中で反応させた後、吸引・注入する機能を中心に報告した。これは最初に述べたように、これからはプリカラム誘導体化による高感度分析システムが、全自動の形で用いられることが多くなると予測しているためである。特に、微量成分のための高感度分析でありながらスループットを高くできることは、時代の流れに沿った特長であると考えられる。最終的には、汎（はん）用液体クロマトグラフユニットからなるシステムではあっても、使われ方としては、目的に応じた専用システムとして用いられ、その中でAS-4000形が、ユーザーごとに固定されたプログラムで使用されることをねらいとしている。

Topics

第38回日本臨床衛生 検査学会開催さる

去る4月28日から30日までの3日間にわたり、福島県郡山市で、上記学会

が開催された。本学会では、一般演題581題、指定演題14題および特別シンポジウム50題の合計645題と数多くの発表がなされた。シンポジウムでは、「臨床検査におけるパーソナルコンピュータの利用とその対応」、「電解質、特にNa, K, Clをめぐる諸問題」など機器メーカーと密接に関係するテーマが取り上げられた。

一方、展示会には当方から検査室の

トータルシステム化を目指した検体搬送システムなどの新製品を展示した。搬送システムの実演は多くの顧客の関心を集め、数多くのお問い合わせをいただくなど盛況であった。なお、来年度の第39回学会は那珂工場の地元である茨城県水戸市で開催の予定である。地元メーカーとして、来年度の大会に向けて今から準備を進めたい。

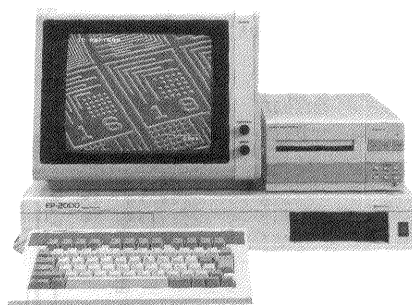
(高畑藤也 記)

Topics

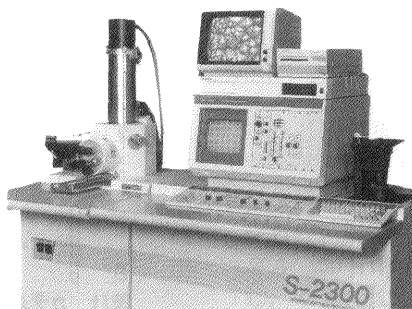
EP-2000形 日立イメージプロセッサ (SEM用画像処理装置)

走査電子顕微鏡で観察する画像を、より明るく美しい静止画としてリアルタイムに表示するイメージプロセッサを開発しました。

従来、暗室で観察していたスロースキャン像やノイズのあるTVスキャン像を、画質改善しながらフレームメモリに記憶し明るく鮮明な画像としてTVモニタに表示、観察することができます。また、カセット磁気テープを標準装備しましたので、画像の記録、保存が容易に行えます。機能面では測長プログラムを内蔵しましたので、カーソル線の操作によりサンプルの線幅、大きさ等をマニュアルや自動で測長する



EP-2000形 日立イメージプロセッサ



S-2300形 日立走査電子顕微鏡に装着したEP-2000形

ことができます。操作はフルキーボードによる簡単操作で、記憶画面へのコ

メント表示も矢印や英・数字を自由に入力することができます。またコメントや測長結果の表示された観察画像を、電子顕微鏡のカメラに戻して撮影することもできます。

■ 特徴

- (1) SEMと一体化したコンパクトなテーブルトップ形デザインで、余分な場所を取らず、操作も簡単です。
- (2) TVスキャン像からスロースキャン、フォトスキャン像まで、通常観察に使用するほとんどの画像信号を記憶することができます。
- (3) カセット磁気テープによる大容量画像ファイリング(約80枚/カセット)が可能です。
- (4) マニュアル測長、自動測長および測長値の統計演算が行えます。
- (5) イメージプリンタ(オプション)を接続することにより、安価で高品質の画像プリントが得られ、経済的です。

■ 対応機種

S-2000, S-2100A/S-2100, S-2300, S-510, S-530

日製産業株式会社

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>

近年、益々重要性を増している健康状態と科学機器の関わり合いに着目して「生化学分析特集——臨床化学へのアプローチ——」を企画しました所、奥山先生には科学と宗教と題して科学を原点から説きおこす巻頭言を頂きました。眞重先生にはアルツハイマー病の診断、北森先生には免疫分析へのPASの応用、道辻先生には尿中鉛分析、馬場先生にはアミノ酸分析装置に関するご報告を頂きました。いずれも最先端の研究テーマであり、科学機器の応用拡大に意を強くした次第です。また、解説2件と最近の新製品とイベントについてトピックス7件を掲載させて頂きました。

■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
JUL./AUG. 1989 VOL.32 NO. 4

発行 平成元年7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