

### 卷頭言

## 分離分析の振興

Promotion of Analytical Separation



兵庫県立大学大学院物質理学研究科教授

寺部 茂

本誌47巻1号(2004)の巻頭言に二瓶好正先生がお書きになっているように、文部科学省が平成16年度から科学技術振興機構(JST)に委嘱して「先端計測分析技術・機器開発プロジェクト」を発足させ、同じく平成16年度からJSTが戦略的創造研究推進事業として、戦略目標「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出」のもとに各種研究開発に支援を始めたことは、分析化学に関与するものとして大変ありがたく受けとめている。

一般に、科学的研究に必要な分析機器は購入して利用すればよいと考えられている場合が多い。分析機器は外国製に優れたものが多く、高価でも外国製品の購入が推奨された時期もあった。このような考えは、大学における分析化学研究者のみならず、国内分析機器メーカーにも多大な負の影響を及ぼした。しかし、世界レベルで新規な研究を行うためには、最先端の計測分析法開発の重要性が認識されるようになったことは、われわれ分析化学者にとっては喜ばしい限りである。

計測分析の対象、目的は多種多様であり、各種計測分析法および機器が開発されている。分析法

を大別すると、分光分析、電気化学分析、分離分析、その他(質量分析、顕微鏡、熱分析等)である。分光分析、質量分析、顕微鏡は物理原理に基づいており、最新の装置は高性能光源や高感度検出法などの各種要素技術の進展により、より高性能で大型化、高価になっている。一方、電気化学分析や分離分析はどちらかというと化学の領域で大型装置は必要としない場合が多い。従って、分離分析分野では大型プロジェクトはほとんど採択されていない。

本誌に巻頭言を寄稿する機会を与えられたので、筆者の専門である分離分析について少々私見を述べさせていただきたい。分離分析の主な手法はクロマトグラフィーと電気泳動である。化学を専門とされている方でも分離分析は研究対象とは考えていない方が多いと想像する。その理由としては、クロマトグラフィー装置およびカラムは多種市販されており、非常に多数の分離例が機器メーカーまたはカラムメーカーから提供されているので、それを見て操作すれば容易に目的とする結果が得られる場合が多いからであろう。大部分の問題解決にはそれでよいであろうし、メーカーに

### C O N T E N T S

#### ■卷頭言

- ・分離分析の振興  
寺部 茂 ..... 1
- 報文  
・非放射線電子捕獲検出器の新展開  
竹内正博 ..... 3
- ・電子捕獲解離によるプロテオーム解析に向け  
馬場 崇/佐竹宏之 ..... 8
- ラウンジ  
・微量元素の化学種分析(化学形態別  
分析)の重要性  
中原武利 ..... 13

#### ■解説

- ・日立卓上顕微鏡  
「TM-1000」Miniscope<sup>TM</sup>  
平根賢一 ..... 15
- ・タンパク質解析用液体クロマトグラフ  
質量分析計NanoFrontier L  
篠子鹿司/伊藤伸也  
吉岡信二/永井伸治  
西田哲也/竹田明弘 ..... 18
- 学会発表ミニファイル  
■新製品紹介  
・新型検出器L-2455形DADの  
ご紹介 ..... 22

- ・新型検出器L-2485形蛍光検出器の  
ご紹介 ..... 26
- ・EZChrom Elite<sup>TM</sup>操作フローガイド  
機能のご紹介 ..... 26
- ・日立卓上顕微鏡  
「TM-1000」Miniscope<sup>TM</sup> ..... 27
- ・新型高速アミノ酸分析計「L-8900形」  
を発売—簡単操作、効率的な分析を  
サポート— ..... 27
- ・タンパク質解析用液体クロマトグラフ  
質量分析計NanoFrontier Lのご紹介 ..... 28

問い合わせればより詳細な情報も得られる場合も多い。

しかし、たとえば、ヒトゲノム計画におけるDNA塩基配列決定法に要求されたハイスクロット分離は従来のゲル電気泳動を利用していのでは遙かに長い期間を要したであろう。この場合にはマルチキャピラリー電気泳動装置が大きな役割を果たした。装置開発において検出法がキーテクノロジーであったことは間違いないが、装置開発の出発点となったキャピラリー電気泳動(CE)によるDNAの高速分離法開発の寄与も強調しておきたい。最近のプロテオーム解析、メタボローム解析のように、非常に多数、多種な化合物の分離を網羅的に行う必要がある場合には、検出法としては質量分析法(MS)が主役であるが、MSをいくら高性能化しても、何らかの分離法と組み合わせた利用が必要である。このような場合、市販の分離装置を利用するのみでは不十分である。そのためにミクロ液体クロマトグラフィー(LC)またはCEが利用されているが、まだ必要な性能は得られていない。この分野での分離分析の専門家の活躍が期待される。

ミクロLCといえば1970年代に当時の名古屋大学工学部の石井大道先生を中心とした研究により開発された技術であり、日本が世界を先導できる立場にあった。しかし、当時は技術が未成熟であり、利用できるデバイス等も少なく、広くは受け入れられなかった。ミクロLCに関する研究はその後も進展していたが、広く注目を集めることは至らなかった。プロテオーム解析が騒がれるようになると、ミクロLCの技術が注目され、日本よりはむしろ外国で積極的に利用されるようになっている。その理由としては、種々の優れたデバイスが開発され、高度な職人芸を必要としなくなったこともあろうが、その有用性に注目して積極的に取り組む研究態度にあったように思われる。HPLC技術で最近注目を集めている超高压送液の利用は、学術研究の成果を積極的に利用しようとしたメーカーの熱心な開発の成果と言える。ここでもミクロLCが利用されている。

HPLCにおいてはカラムの重要性は明かであり、当初から30年以上にわたり優れたカラム(充填剤)開発のたゆみない努力が続いている。カラム性能に関する要求は多様であり、単価はそれほど高価ではないが、消耗品であり需要も多いので商品開発が盛んである。しかし、新規充填剤の開発はほとんど学術的研究成果から出発しており、充填剤に対する学問的研究の重要性は明かである。たとえば、最近注目を集めているモノリス型充填剤もその例である。とくにシリカモノリスカラムは日本で研究開発された成果であるが、商

品化は外国でなされたことは残念である。

著者の専門であるCEについて一言述べさせていただく。CEはその優れた特性のために当初は多大の注目を集め、多数の研究が行われた。現在も学術研究は盛んであるが、応用分野で普及するには至っていない。その理由はいろいろ考えられるが、新しい装置開発に対するメーカーの関心が低く、応用分野での利用者もHPLCがますます高性能化された現状では積極的に新技術を導入しようとする態度も少ないためと思われる。

分離分析においても、試料消費量の微量化、有機溶媒や試薬消費量および廃棄物の低減が今後の方向であろう。分離分析法のミクロ化、高性能化には学術研究の先導が必須である。最近注目されているマイクロチップを利用した分離分析法に関する研究開発は盛んであるが、その実用分析法としての普及はさらに先であると思われる。その意味で、日本のみならず外国でも大学等研究機関における分離分析研究者の減少傾向は憂慮される。しかし、お隣の中国は分離分析分野でも若手研究者がきわめて活発であり、近い将来この分野で顕著な成果が多く出てくると思われる。

クロマトグラフィーおよび電気泳動の歴史を見てみると、他の分析法と同様、停滞期もあったが常に新しい技術が開発され性能が向上している。将来の目標設定を考える場合、10000成分を1時間以内に分離するとか、ppt以下の成分を直接分離定量するとか、試料要求量を1細胞程度に小さくするなどを考えると、まだ学術的にもかなり困難な目標であり、実用化には数年は要するであろう。ブレーカスルーとなる技術が日本の若い研究者によって多く開発されることを希望する。

#### 著者略歴

寺部 茂(昭和15年10月21日生)

#### 「所属・専門」

兵庫県立大学大学院物質理学研究科 教授  
分析化学、分離分析、キャピラリー電気泳動

#### 「学歴・職歴」

昭和38年 京都大学工学部工業化学科卒  
昭和40年 京都大学大学院工学研究科工業化学専攻修士課程修了  
昭和40年 塩野義製薬株式会社入社  
昭和48年 工学博士(京都大学)  
昭和53年 京都大学工学部工業化学科 助手  
昭和59年 京都大学工学部 助教授  
平成2年 姫路工業大学理学部 教授  
平成10年 姫路工業大学 理学部長(平成12年3月まで)  
平成16年 兵庫県立大学大学院物質理学研究科 教授(県立大学統合による大学改組及び名称変更)

#### 「受賞歴」

1995年1月 Martin Gold Medal (Chromatographic Society, UK).  
1995年10月 Frederick Conference on Capillary Electrophoresis Award (U.S.A.)  
1996年9月 日本分析化学会 学会賞  
1999年11月 Golay Award  
2001年11月 兵庫県科学賞  
2004年3月 ACS Award in Chromatography  
2004年11月 日本電気泳動学会児玉賞

# 非放射線電子捕獲検出器の新展開

Novel Development of Non-radioactive Electron Capture Detector

竹内 正博\*

## 1. はじめに

電子捕獲検出器(Electron Capture Detector: ECD)は、電子親和性の高い化合物に対して選択的に高感度を示すガスクロマトグラフ(GC)用検出器として、1950年代末から60年代初めにJ.E.Lovelock<sup>1~4)</sup>によって開発された。当時は有機塩素系農薬による環境汚染がRachel Carsonらによって警告され始めた頃であり、ECDは生態学者の注目の的となった。そのような状況下、I.Prestt<sup>5)</sup>、S.T.Jensen<sup>6)</sup>、D.C.Holms<sup>7)</sup>、G.Widmark<sup>8)</sup>らが早くECD-GCを用いて、有機塩素系農薬やPCBによる地球規模の生態系汚染を明らかにした。その結果、環境汚染が先進諸国で大問題となり、わが国でも1970年代に入ると、環境汚染のモニタリングが活発に行われるようになり、日本周辺の海域汚染が深刻な状況にあることが次々と明らかにされた。このようにECDは開発当初から環境汚染問題を中心に画期的な役割を果たしてきた。

しかし、ECDはイオン化源としてNi<sup>63</sup>等が放射するβ線を使用するため、放射線障害予防法などにより厳しく規制されている。したがって、放射線源を使用しない非放射線ECD(Non-radioactive ECD: Nr-ECD)が期待されており、これまでに放射線源の代わりに紫外線ランプや放電現象などを利用するNr-ECD<sup>9~12)</sup>が開発されている。しかし、Nr-ECDは放射線ECDに比べて性能が劣り、かつクロマトグラム上に原因不明の反転ピークが出現するという致命的欠陥があるため普及するまでには至っていない。

そこで、反転ピークの問題を解決すると同時に、その性能を放射線ECDと同等以上に高めることを目的に、既存の放電型Nr-ECDの応答特性を検討した。その結果、反転ピークの出現メカニズムが解明されると同時に、反転ピークを消滅させる方法を確立することができた。更に、今回確立し

た反転ピーク消滅法はNr-ECDの基本性能に極めて良好に作用するため、既存の放電型Nr-ECDを放射線ECDと同等以上の性能に高めることができた<sup>13)</sup>。



## 2. 放電型Nr-ECDの検出原理

竹内 正博

既に開発されている放電型Nr-ECD(図1)の検出原理は、放電現象によってHeを励起状態に遷移させ(Eq.1)、その励起He(He<sup>+</sup>)が基底状態に戻るときに発生する光子(Eq.2)によってドーパントガスとしてのXeをイオン化し(Eq.3)、生成した自由電子を電極で捕集して検出器の基底電流とすることに基づく。基底電流とは検出器内に被検成分が存在しない状態の電流値であり、その値はカラムを通して検出器に被検成分(M)が流入すると減少する。何故なら、Mは電子捕獲反応を起こしてM<sup>-</sup>を生成し(Eq.4)，その後直ちにXe<sup>+</sup>と反応してMに戻るため(Eq.5)，Mが捕獲した分の自由

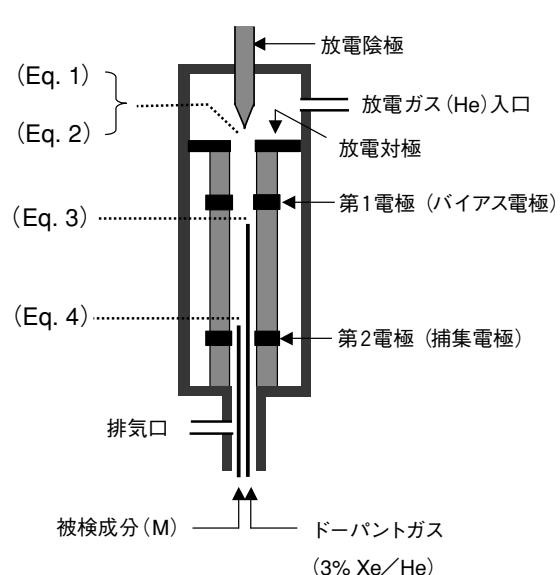
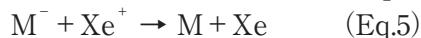
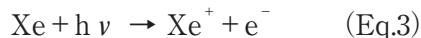
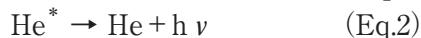


図1 放電型電子捕獲検出器の構造

\* (有)GC技術研究所 代表取締役 工学博士

電子量が減少することになる。そこで、Mによる基底電流値の変動を経時的に捉え、クロマトグラムとして記録する。

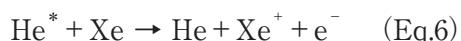


以上が放電型Nr-ECDの検出原理であり、この原理に基づいて反転ピーク問題が検討されてきた。しかし、出現メカニズムの想定は容易であるものの、その消滅対策の確立は極めて困難であり、未解決のままになっている<sup>注1)</sup>。そこで、これまでの理論そのものに問題があると結論し、ペニンゲ電離に基づいた理論展開を図った。

注1) 放電現象によって発生する光子によるイオン化は、図1のドーパントガスの出口付近だけでなく、カラムの出口付近でも起こる。そのため、非電子親和性化合物がカラムから溶離するとEq.3と同様のイオン化が起こり、それによって基底電流が増加するため反転ピークが出現する。このような見解に基づいて、光子がカラム出口付近に到達しないように遮光等の処置を施しても、反転ピークの根本的な解決には至らなかった。

### 3. 反転ピークの出現メカニズムとその消滅法： ペニンゲ電離に基づく理論化

これまでの理論は放電現象によって生成した $\text{He}^*$ が基底状態に戻るときに発生する光子によって、ドーパントガスとしての $\text{Xe}$ をイオン化して自由電子を生成することが基盤となっている(Eq.3)。この考えに準ずれば、Eq.1における $\text{He}$ の励起状態への遷移は、図2に示す基底状態から $2^3P$ や $2^1P$ などへの許容遷移となる。しかし、 $\text{He}$ の遷移には許容遷移と禁制遷移があり、両遷移による $\text{He}^*$ の寿命は大幅に異なる。例えば、基底状態から $2^1S$ や $2^3S$ などの準安定状態へ禁制遷移した場合、 $\text{He}^*$ の寿命は数秒から数分程度であり、許容遷移の場合( $10^{-9} \sim 10^{-6}$ 秒)と比べて非常に長い。したがって、この場合は光子による $\text{Xe}$ のイオン化ではなく、ペニンゲ電離またはペニンゲイオン化<sup>注2)</sup>といわれる $\text{He}^*$ との衝突によるイオン化として捉えることができる(Eq.6)。



注2) 励起状態にある中性の原子または分子が他の原

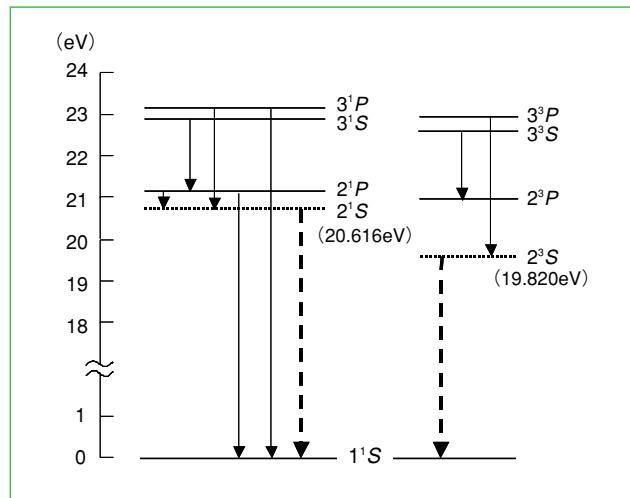
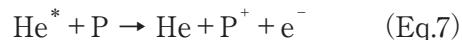


図2 励起ヘリウムのエネルギー準位と寿命  
許容遷移： $2^3P, 2^1P, 3^3S, 3^1S, 3^3P, 3^1P$ ； $10^{-9} \sim 10^{-6}$ 秒  
禁制遷移： $2^3S, 2^1S$ ；数秒～数分

子や分子と衝突することによって起こるイオン化であり、1927年F.M.Penningにより最初に見出された現象である。ペニンゲイオン化が起こるためには、励起原子または分子の内部エネルギーが他の原子や分子のイオン化エネルギーより大きいことが条件となる。

このように $\text{Xe}$ のイオン化をペニンゲ電離由来とすると、この電離現象は検出器セル内全体で起こっていると考えられる。何故なら、 $\text{He}^*$ は寿命が非常に長いので、放電対極付近から第2電極に至るまでの全空間に分布するため、カラム末端から溶離する物質(P)もペニンゲ電離してしまうことになる。ただし、Pのイオン化電位が $\text{Xe}$ (12.13eV)より高い場合やPが電子親和性化合物である場合は、 $\text{He}^*$ によるペニンゲ電離は起こらない。そのため、基底電流に変化はなく、クロマトグラムのベースラインに異常は現れない。それに対し、Pのイオン化電位が $\text{Xe}$ (12.13eV)より低い場合は、カラムから溶離すると直ちにEq.7で表されるペニンゲ電離が起こる。



その結果、自由電子の生成量が増加し、基底電流値が上昇するので、クロマトグラムのベースラインは、基底電流値の減少に由来する正常ピークとは反対の下方へドリフトすることになる。この現象は非電子親和性化合物が検出器内に流入した時に始まり、検出器から流出したときには終了するので、クロマトグラム上に正常ピークと逆向きの反転ピークを描くことになる。

以上のように想定した反転ピークの出現メカニズムを検証するために、Nr-ECDのドーパントガ

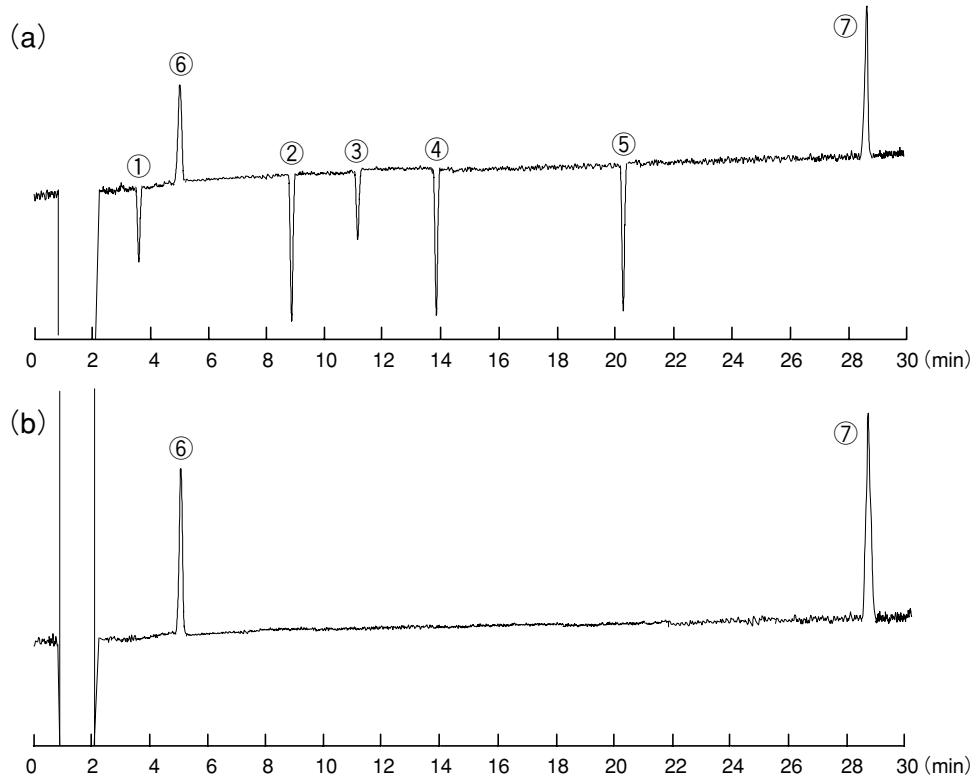


図3 反転ピークの出現と消滅

(a) ドーパントガス: 3% Xe/He

(b) ドーパントガス: 3% Xe/Heとアセトン(300ppmv)の混合ガス

GC条件—

装置: Hitachi G-6000/Nr-ECD(定電流方式)

カラム: HS-1; 30m, 0.25mm, 0.25  $\mu$ m, 昇温条件: 35°C (2min), 2°C/min, 60°C (10min), 10°C/min, 220°C,

He流量: 1.5ml/min, 注入口温度: 230°C, 検出器温度: 280°C,

試料: ①; n-ブタノール, ②; トルエン, ③; n-オクタン, ④; p-キシレン, ⑤; n-ウンデカン, ⑥; トリクロロエチレン, ⑦;  $\gamma$ -BHC

注入量: ①~⑤; 各2ng, ⑥, ⑦; 各20pg, 注入法: スプリットレス

として3% Xe/Heを用いて、電子親和性化合物およびXeよりイオン化電位の低い非電子親和性化合物から成る標準混合試料のクロマトグラムを測定した。その結果、図3(a)に示すように電子親和性化合物のトリクロロエチレンおよび $\gamma$ -BHCは正常ピークとして出現するのに対し、Xeよりイオン化電位の低い非電子親和性化合物のn-ブタノール、トルエン、n-オクタン、p-キシレンおよびn-ウンデカンは反転ピークとして出現することが確認された。このことから、「Xeよりイオン化電位の低い非電子親和性化合物がカラムから溶離すると、そのペニング電離がXeのペニング電離より優先的かつ高効率で進行するために自由電子の生成量が増加し、それが原因で反転ピークが出現する」とした仮説について、必要条件が満たされたものとした。

次に、仮説の十分条件を満たすために、反転ピークの消滅法について確認実験を行った。すなわ

ち、3% Xe/Heのドーパントガスに、Xeよりイオン化電位が低いアセトン(300ppmv)を混合したガスを用いて、先と同一の混合試料についてクロマトグラムを測定した。その結果、図3(b)に示すように、図3(a)で出現したn-ブタノール、トルエン、n-オクタン、p-キシレンおよびn-ウンデカン由来の反転ピークが消滅した。その理由は、ドーパントガスとしてXeよりイオン化電位の低い有機化合物を少量添加した混合ガスを使用すると、Xe単独の場合より低いイオン化電位でEq.6とEq.7が同時進行し、ペニング電離の効率が高い状態に保たれる。その結果、カラムから非電子親和性化合物が溶離しても、ペニング電離効率がそれ以上に上昇することはないため、反転ピークは出現しなくなる。

以上の結果と考察から、仮説の必要・十分条件が満たされたものとしたが、更に理論的背景を深めるために、ペニング電離のイオン化電位を活性

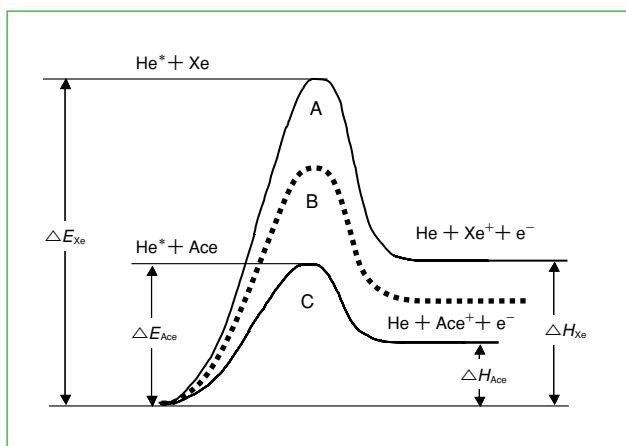


図4 混合ガスによるペニング電離の活性化エネルギー( $\triangle E$ )と生成物のエネルギー含量( $\triangle H$ )の低下

化エネルギーで置き換えることによって、化学反応論で捉えることを試みた。すなわち、図4に示すように、 $\triangle E$ （活性化エネルギー）の高いXeのペニング電離（Eq.6）は曲線A、 $\triangle E$ の低いアセトンのペニング電離（Eq.7）は曲線Cで表される。これらはそれが単独でペニング電離する場合であるが、Xeとアセトンを混合した場合のペニング電離は、化学反応論における両成分の競争反応に相当するので、曲線Aと曲線Cの中間に位置する曲線Bとなる。このことは、Xeとアセトンを混合するとペニング電離の障害となる $\triangle E$ がXe単独の場合より低下するため、反応効率が上昇し、その結果として生成する自由電子数が増加することを意味する。また、 $\triangle H$ で表される反応後の生成物のエネルギー含量も混合した場合はXe単独の場合より減少するので、生成した自由電子の運動エネルギーがXe単独の場合より低下し、その結果として生成した自由電子の熱電子化が加速することを意味する。このように、イオン化電位の高い成分に低い成分を混合するとイオン化電位が下がり、その結果イオン化効率が上昇することによって自由電子の生成量が増加する同時に、自由電子の運動エネルギーが減少し、熱電子化が進行する効果（ペニング効果）が現れる。

#### 4. 基本性能の向上

ドーパントガスとして混合ガスを使用することによって生じるペニング効果は、反転ピークの解消だけでなく、更に重要な効果をNr-ECDにもたらす。すなわち、ペニング電離の低電位化によって、生成する自由電子量が増加すると同時に、自由電子の運動エネルギーが減少して熱電子化が進行するので、Nr-ECDの基本性能である検出感度、

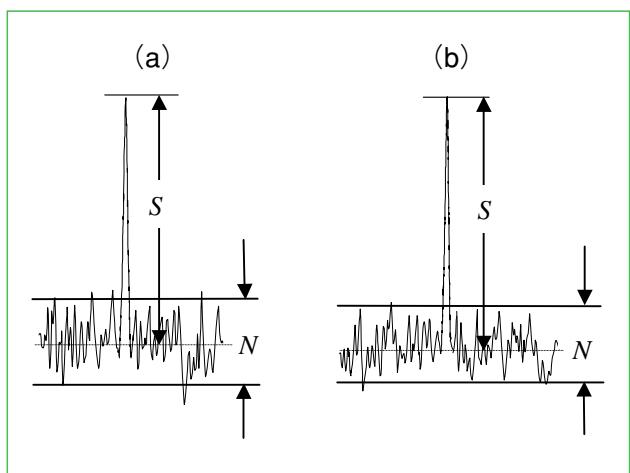


図5  $\gamma$ -BHCの検出感度

- (a) ドーパントガス: 3% Xe/He  
 $\gamma$ -BHC(2pg); S/N=2.92  
(b) ドーパントガス: 3% Xe/Heとアセトン(300ppmv)の混合ガス  
 $\gamma$ -BHC(0.1pg); S/N=3.21  
GC条件—  
装置: Hitachi G-6000/Nr-ECD(定電流方式)  
カラム: HS-1; 30m, 0.25mm, 0.25  $\mu$ m,  
昇温条件: 60°C(2min), 10°C/min, 200°C(2min),  
He流量: 1.5ml/min, 注入口温度: 230°C, 検出器温度: 280°C,  
試料:  $\gamma$ -BHC, 注入量: 1  $\mu$ l, 注入法: スプリットレス

ダイナミックレンジ、安定性などが向上する。

#### (1) 検出感度

放電型Nr-ECDは放射線源を使用しない利点があるが、感度の面では放射線ECDより劣る。しかし、ペニング効果により生成する自由電子の熱電子化が促進するため電子親和性化合物による電子捕獲反応の効率が高まり、これによって検出感度が向上した。更に、自由電子の熱電子化はベースラインのノイズ幅を低下させるので、両方の効果で検出感度が大幅に向上した。図5に示すように、ドーパントガスとして3% Xe/Heを使用した場合、 $\gamma$ -BHCの検出感度は(2pg, S/N=2.92)であるのに対し、3% Xe/Heとアセトンの混合ガスを使用した場合、 $\gamma$ -BHCの検出感度は(0.1pg, S/N=3.21)であった。

#### (2) ダイナミックレンジ

ECDは被検成分による基底電流の減少を応答信号とするため、ダイナミックレンジが狭いという欠点があった。そのため種々の改善がなされて、最近では定電流方式または周波数変換方式などが採用されており、ダイナミックレンジは定電流方式が $10^3$ 以上、周波数変換方式が $10^4$ 以上にまで拡大した。しかし、これらのダイナミックレンジは放射線ECDに対する値であり、既存のNr-ECD(定電流方式)のダイナミックレンジは $10^3$ を達成していない。これに対し、ペニング効果によって

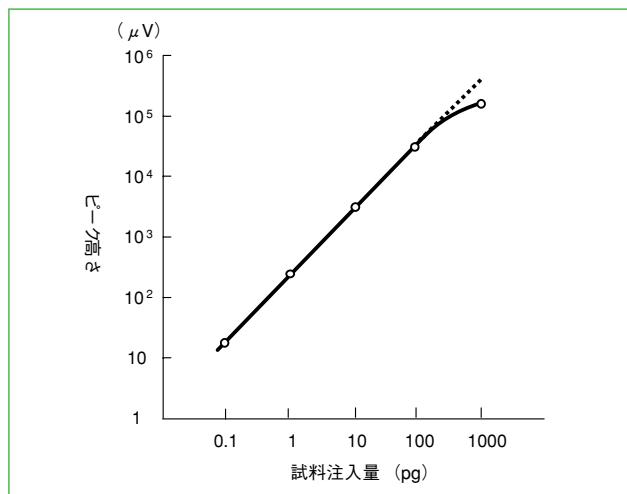


図6 ダイナミックレンジ

ドーパントガス：3% Xe/Heとアセトン(300ppmv)の混合ガス  
GC条件—  
装置：Hitachi G-6000/Nr-ECD(定電流方式)  
カラム：HS-1；30m, 0.25mm, 0.25 μm,  
昇温条件：60°C(2min), 10°C/min, 200°C(2min),  
He流量：1.5ml/min, 注入口温度：230°C, 検出器温度：280°C,  
試料： $\gamma$ -BHC, 注入量：1μl, 注入法：スプリットレス

検出感度が向上したため、ダイナミックレンジが低濃度側に拡大された結果、図6に示すように10<sup>4</sup>までに改善された。

### (3) 迅速安定化

放射線ECDは有機塩素系農薬やPCBなどの超微量分析に必須の検出器であるが、立ち上げまでに長時間を有する。例えば、装置を一旦停止させてしまうと、稼動開始から使用可能まで最低でも10時間以上かかるため、放射線ECDは電源を切らずに常に稼動させておくことが一般的な使用法になっている。これに対しNr-ECDはペニング効果によって安定化が非常に迅速化したため、稼動開始から1～2時間程度で安定化するので、使用当日に電源を入れればよい。したがって、測定が終了した段階で電源を切り、使用しないときに稼動状態にしておく必要はないので、安全および節電の面からも評価される。図7に入力してから2時間後のベースラインを示したが、ドリフトの状態から1時間以内にベースラインが安定していることが分かる。

## 5. おわりに

今回、既存のNr-ECDにドーパントガスとして混合ガスを適用してペニング効果を導入することによって、反転ピークの問題を解決すると同時に検出感度やダイナミックレンジを大幅に改善することができた。また、立ち上げ時間が大幅に短縮されたので非常に使いやすい検出器になった。こ

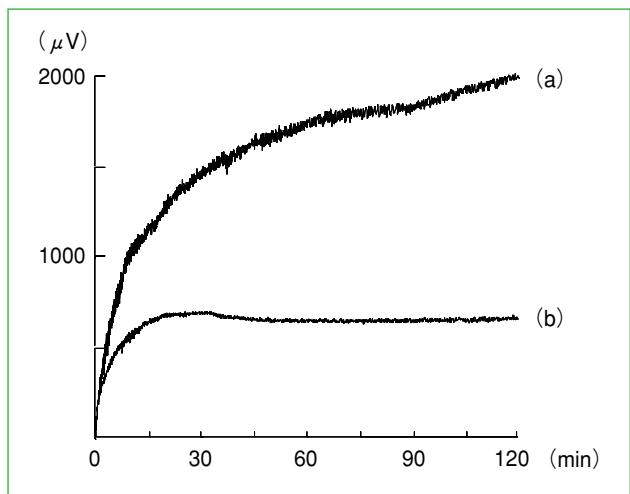


図7 基底電流(ベースライン)の変動

(a) ドーパントガス：3% Xe/He  
ノイズ幅；100～150 μV  
(b) ドーパントガス：3% Xe/Heとアセトン(300ppmv)の混合ガス  
ノイズ幅；20～30 μV  
GC条件—  
装置：Hitachi G-6000/Nr-ECD(定電流方式)  
カラム：HS-1；30m, 0.25mm, 0.25 μm, カラム温度：180°C  
He流量：1.5ml/min, 注入口温度：230°C, 検出器温度：280°C

これらの改善結果と放射線障害防止法による届出・管理や使用上の制約がないことを併せて考えると、各種分野での普及が期待される。

本研究は、(株)日立サイエンスシステムズおよび(株)日立ハイテクノロジーズと共同で行っているものであり、末尾ながら関係者の皆様に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) J.E. Lovelock : J. Chromatogr., 1, 35, 1958.
- 2) J.E. Lovelock : Nature, 181, 1460, 1958.
- 3) J.E. Lovelock : Nature, 182, 1663, 1958.
- 4) J.E. Lovelock, S.R. Lipsky : J. Am. Chem. Soc., 82, 431, 1960.
- 5) I.Prestt : Bird Study, 12, 196, 1965.
- 6) S.T.Jensen : New Scientist, 32, 612, 1966.
- 7) D.C.Holms : Nature, 216, 1274, 1967.
- 8) G.Widmark : J. Assoc. Off. Anal Chem., 50, 1069, 1967.
- 9) W.E.Wentworth, A.Tishbee, C.F.Batten, A.Zlatkis : J. Chromatogr., 112, 229, 1975
- 10) 大郷 勲：特許第28110804号
- 11) 川副重義ら：特公平9-2747015
- 12) 栗田信二ら：特許公開2003-333187
- 13) 竹内正博ら：特許出願中

U.D.C.539.196.084.2 : 577.112.6 : 543.51 : 577.112.38

# 電子捕獲解離によるプロテオーム解析に向けて

High Throughput Electron Capture Dissociation for Proteomics

馬場 崇\* 佐竹 宏之\*\*

## 1. はじめに

ヒトゲノム解析終了後、プロテオーム解析が大きく発展している。プロテオーム解析とは生体内で発現しているタンパク質の網羅的解析のことであり、個体差、病変差の情報を取得することにより疾病診断マーカとして、創薬のターゲット分子探索に有効と期待されている。またリン酸化修飾や糖鎖修飾などを受けた翻訳後修飾タンパク質もプロテオーム解析として網羅的に解析されることが望まれている。プロテオーム解析の検出部には感度・選択性・高速性に優れた質量分析装置が使用されている。日立ハイテクノロジーズでは昨年10月のタンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計NanoFrontierの発表に続き<sup>1)</sup>、今年4月、感度を高めたNanoFrontierLを発表した。線形高周波イオントラップによる高感度MS(n)分析による高いアミノ酸配列同定性能と飛行時間型質量分析(TOF MS)による高質量分解能特性を備えておりプロテオーム解析への貢献が期待される。

本稿は1998年の実現以来、大きな注目を集めている電子捕獲解離(electron capture dissociation : ECD)<sup>2-8)</sup>に対する日立グループの取り組みを報告する。ECDはペプチド配列の高い同定能力に加え、翻訳後修飾解析に有効である。我々は2003年よりNanoFrontierLでも採用されている線形高周波イオントラップ内部でのECDの先行開発を進めており、その実現を世界に先駆けて報告してきた<sup>2)</sup>。

## 2. 分子解離によるアミノ酸配列解析の方法

質量分析では、試料分子を荷電粒子化し(すなわちイオン化)、真空中における電磁気的な力を用いて質量を測定する。測定される物理量が分子全体の質量であるため、単純な1回の質量分析操作によりアミノ酸配列の入れ替えなど多義性をもつ分子内構造を決定することは困難である。そこ



馬場 崇



佐竹 宏之

で質量分析装置内部において分子イオンの解離が行われる。分子イオンの全質量を測定したのち、それを切断(解離)して生成させた断片イオン(フラグメントイオンと呼ばれる)をさらに質量分析し、フラグメントの生成パターンから配列情報を決定していく。この様な分子配列決定方法がMS<sup>(n)</sup>分析(質量分析(=MS)をn回繰り返す意)である。解離に用いられる反応は多種あり、それぞれに特徴的な部位で解離が発生する。

現在、もっとも広く利用されている解離反応は衝突励起解離:(Collision Induced Dissociation : CID)である。ガス雰囲気中(He, Ar, N<sub>2</sub>など)でイオンを運動させたとき、ガスとの多数回の衝突により分子内振動準位にエネルギーが蓄積されて脆弱な結合部位が切断される。高周波イオントラップ内部においては、その実施の簡便性からイオンを電気的に共鳴振動させて分子との衝突を発生させている。解離はアミノ結合部位(C-N)で発生し、b/yと命名されるフラグメントイオンが主として発生する(図1)。CIDは脆弱な結合部分が優先的に切断されることから、アミノ酸残基種によっては切断されない部分があり、その部位の配列は実験的に決定しにくくなる。さらに翻訳後修飾分子についてその結合は一般的に弱いため、CIDではまずその修飾分子が解離する。質量数の損失から修飾されていた分子種を同定することは可能であるが、分子鎖上での修飾部位を決定できない場合が多い。

\* (株)日立製作所 中央研究所 主任研究員 工学博士  
\*\* (株)日立製作所 中央研究所 研究員

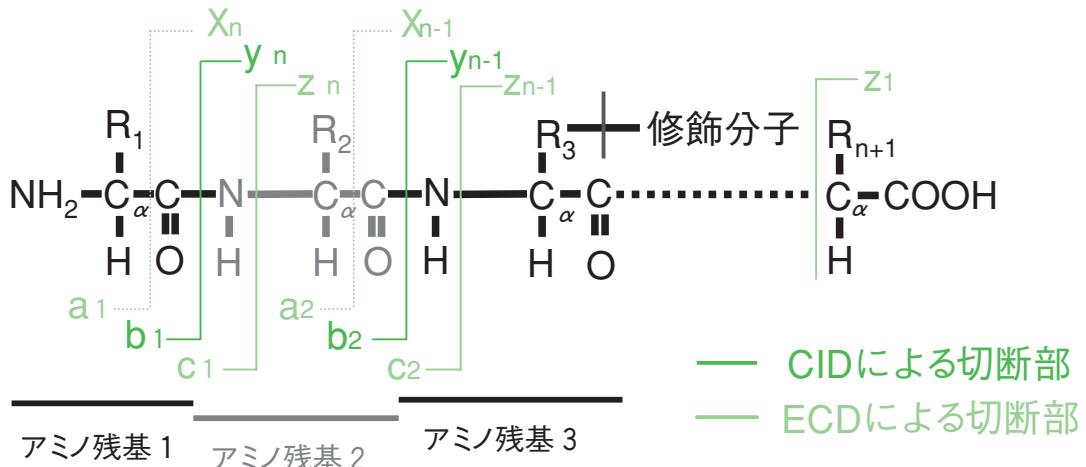


図1 タンパク質、ペプチドの解離フラグメントの命名法。

NH<sub>2</sub>末端(N末端)を左に、COOH末端(C末端)を右側に配置しアミノ残基を一列に並べる。アミノ酸を特徴づけるR基に結合する炭素はC<sub>α</sub>と呼ばれる。C<sub>α</sub>–C間で解離が発生したとき、そのN末端側をaフラグメントおよび、C末端側をxフラグメントと呼ぶ。同様にC–N間が解離されたとき、b/yフラグメント、N–C<sub>α</sub>間が解離されたときc/zフラグメントと呼ぶ。N末端側のフラグメントは左から、C末端側のフラグメントは右から番号付けする。電子捕獲解離：ECDでは主にN–C<sub>α</sub>間が解離される。また、衝突励起解離：CIDでは主にC–N間が解離される。

### 3. 電子捕獲解離

電子捕獲解離：ECDは正多価の試料イオンが電子を捕獲することによって発生する解離機構であり、高い配列決定能力と翻訳後修飾分子の解析を可能とする手法としてプロテオーム解析において有望視されている。質量分析装置内でトラップされている正のタンパク質・ペプチドイオンは一般にプロトン(水素原子核)を備えることにより擬分子イオン(プロトン付加分子イオン)化している。ECDの反応モデル<sup>3)</sup>では、試料となる擬分子イオンに低速運動する電子を捕獲させ、プロトンを中性水素原子化する。このとき高い電子捕獲確率を得るために0.5電子ボルト以下の低エネルギー電子が必要になる。または、捕獲確率は小さくなるが2から13電子ボルトの運動エネルギーをもつ電子を用い、試料イオンの電子準位励起を伴った電子捕獲が用いられることがある。HECD(hot electron capture dissociation)と呼ばれる<sup>4)</sup>。中性化した水素原子はアミノ主鎖上に複数位置するアミノ結合の酸素にほぼ等確率で結合し、この結果、C<sub>α</sub>–N結合部が解離してc/zフラグメントが生成される(図1)。(例外は環状構造をもつプロリン残基であり、そのN末端側は本方式では切断されない。) このようにECDは切断さ

れる部位がアミノ残基種にあまり依存しないことから配列決定のための十分な情報を取得可能であることが知られている。またアミノ結合からなる主鎖を解離するため、翻訳後修飾された分子はアミノ残基に結合したままである。そのため、翻訳後修飾された分子とその部位を高確度で特定することが可能である。

1998年にペプチドのECDが報告されて以来<sup>5)</sup>、ECDはフーリエ変換型イオンサイクロトロン質量分析装置(FT-ICR MS)の中で実施してきた。それは、イオン保持に静電磁場を用いるので電子の低エネルギー制御が容易なためである。ECDがプロテオーム向け解離手段として有効であるとの研究が多数なされてきたが、FT-ICRは超伝導磁石を用いた大型装置であり、また質量分析に要する時間は数秒程度かかるなど、汎用高速プロテオーム向け装置としては課題が残る。一方、小型・安価な高周波イオントラップにおいてECDの実現を目指した研究が各地の研究機関により1995年頃より行われてきた。低エネルギー電子を加熱効果が著しい高周波電場中に導入するという課題のため、長らく実現されなかつたが、我々は2004年に磁場を印加した線形高周波イオントラップ内部でのECDの実現に成功した<sup>2)</sup>。この原

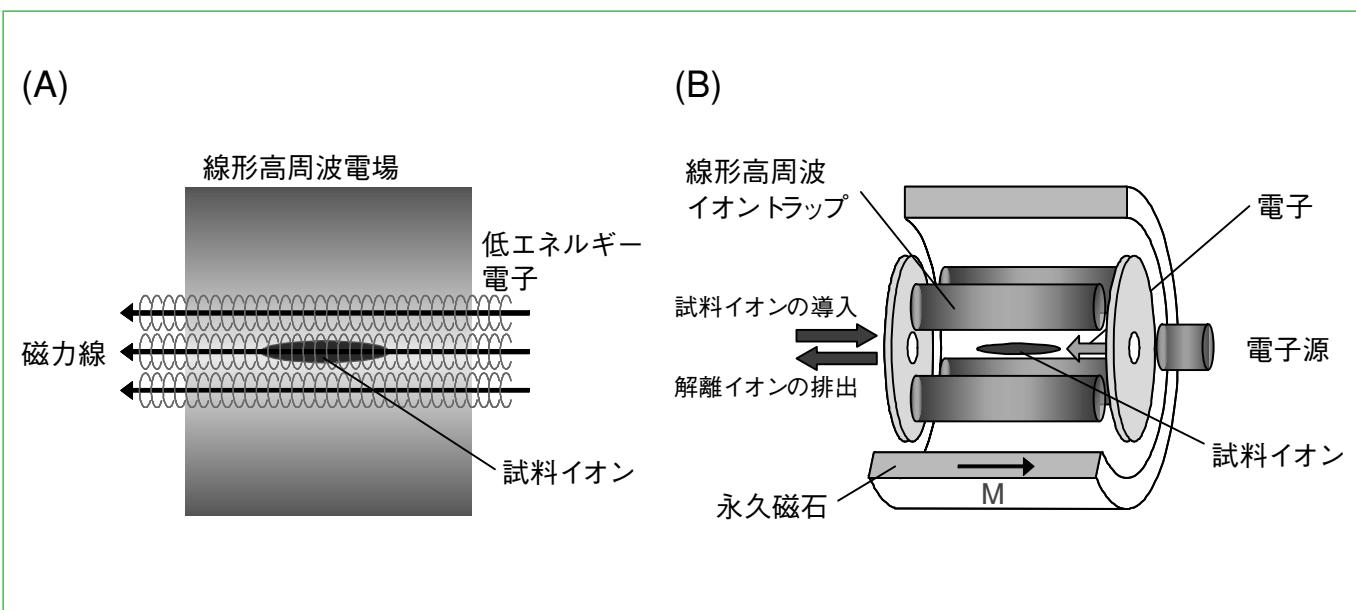


図2 (A) 線形イオントラップを用いたECDの原理。(B) 線形高周波イオントラップを用いたECD反応部。

理実験では、ECDスペクトルを得るために600秒を要したが現時点では後述するように5秒でのスペクトル取得可能となっている。同時期にはUppsala大学から磁場を印加した3次元型高周波イオントラップを用いたECDが報告された<sup>6)</sup>。また、最近、島津製作所から、デジタル高周波を印加した3次元イオントラップを用いた磁場を利用しない動作原理のECDが報告された<sup>8)</sup>。

さらに、電子捕獲解離とは別の機構により電子を正イオンに供給する方法が近年相次いで報告されている。2004年にはVirginia大学から電子移動解離の実現が報告された<sup>9, 10)</sup>。電子を担う負イオンとの間の電子移動反応により、試料イオンに電子が供給され解離する反応である。線形高周波イオントラップ質量分析装置を用い、約0.5秒の時間分解能でリン酸化タンパク質の網羅的解析への応用が発表されている<sup>10)</sup>。さらに、最近、試料イオンと励起中性原子との衝突により、励起分子から試料イオンに電子が供給されて発生する解離、すなわち励起原子衝突解離が報告された<sup>11)</sup>。現在、これらの異なる「電子による電荷減少を伴う解離」の方式について装置・アプリケーション共、競争的な開発が行われている状況にある。近い将来、プロテオーム用質量分析装置では、従来のCIDに加え、これらの電子による電荷減少を伴う新しい解離手段が備わる形態となることは容易に想像される。

#### 4. 実験

##### 4.1 電子捕獲解離の原理と装置

低エネルギー電子を線形高周波イオントラップ内部に導入し、ECDを実現する我々の方式の原理を図2 (A)に示した<sup>2)</sup>。電子捕獲反応部は線形高周波イオントラップ、円筒形の永久磁石、そして電子源からなる(図2 (B))。線形高周波四重極イオントラップは4本の棒状ロッド電極からなる。その対角に位置する電極の組を同相とし、2組の間に逆相の高周波電圧を印加することにより4本のロッド電極が成す中心軸上にイオンを捕捉する。我々は線形四重極電場の中心軸上では高周波電場の振幅がゼロという特徴に注目した。すなわち中心軸上に電子を入射すれば高周波の影響を大きく軽減することができる。また、中心軸に沿って磁場を印加した。電子は磁場に巻きつく螺旋運動をするため、中心軸上に集束されて高周波の影響を受けることなくトラップされているイオンに到達できる。この磁場を印加した線形イオントラップの構成により電子密度の増大を可能とし、ECD反応の高速化を有利にしている。反応後、生成イオンは中心軸上のイオン出入口から取り出され、TOF-MSに導入されてその質量スペクトルが取得される。

線形イオントラップの電極半径(トラップの中心軸からロッド電極までの距離)は6 mm、ロッドの長さは50 mm、高周波電圧として100 V (450 kHz)を印加した。磁束密度は反応部中心で40 mTである。反応にかかる電子のエネルギー

は電子源と線形高周波イオントラップ電極との電位差によって制御した<sup>7)</sup>。

## 4.2 ECDスペクトル

図3に低エネルギー電子によるECDのスペク

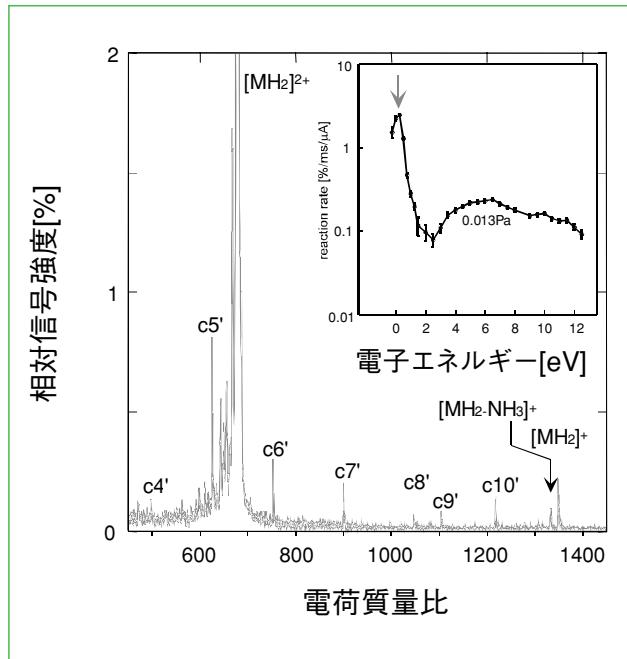


図3 低エネルギー電子(0.5電子ボルト)によるECDスペクトル。  
挿図は単位時間・単位電流あたりの反応効率の電子エネルギー依存性を示した。2電子ボルト以下の反応効率のピークがECD, 2-12電子ボルトの反応効率のピークがHECDに  
対応する。

トルを示す。試料はエレクトロスプレーイオン化法(ESI)で生成した正2価のサブスタンスP(ペプチドの1種)である。試料はメタノールに10μMの濃度で溶解したもので、イオン源への試料流量は5μL/分である。0.1電子ボルトの電子を50nAの強度で10ミリ秒照射した。スペクトルの取得には3分間のスペクトルの積算を行っている。図3ではcフラグメント系列をはっきりと観察できている。また、1電子ボルト以下の低エネルギー領域で反応効率が最大化されることを確認した(図3挿図)。さらに、cフラグメント系列に加え、正2価の試料イオン $[\text{MH}_2]^{2+}$ が電子を捕獲し、正1価の試料イオン $[\text{MH}_2]^+$ に変化する様子も観察できた。以上により低エネルギー電子が捕獲されたのち解離が発生したこと、すなわちECDが発生していることを裏付けた。

図4(A)は電子エネルギー5.6電子ボルトによるECDすなわちHECDによる解離スペクトルである。1.7μA, 20ミリ秒の電子照射によりスペクトル取得を行った。測定には図3と同じ試料を用いた。この電子エネルギー領域では低エネルギーに比べ強い電子を得やすいため、約10倍の反応速度が得られている。ECDで通常観察されるcフラグメントに加え、aフラグメントも観察された。aフラグメントへの解離チャンネルは電子捕獲した分子イオンの内部エネルギーが高いときに開くと考えられている<sup>3)</sup>。HECDでは電子捕獲の直前

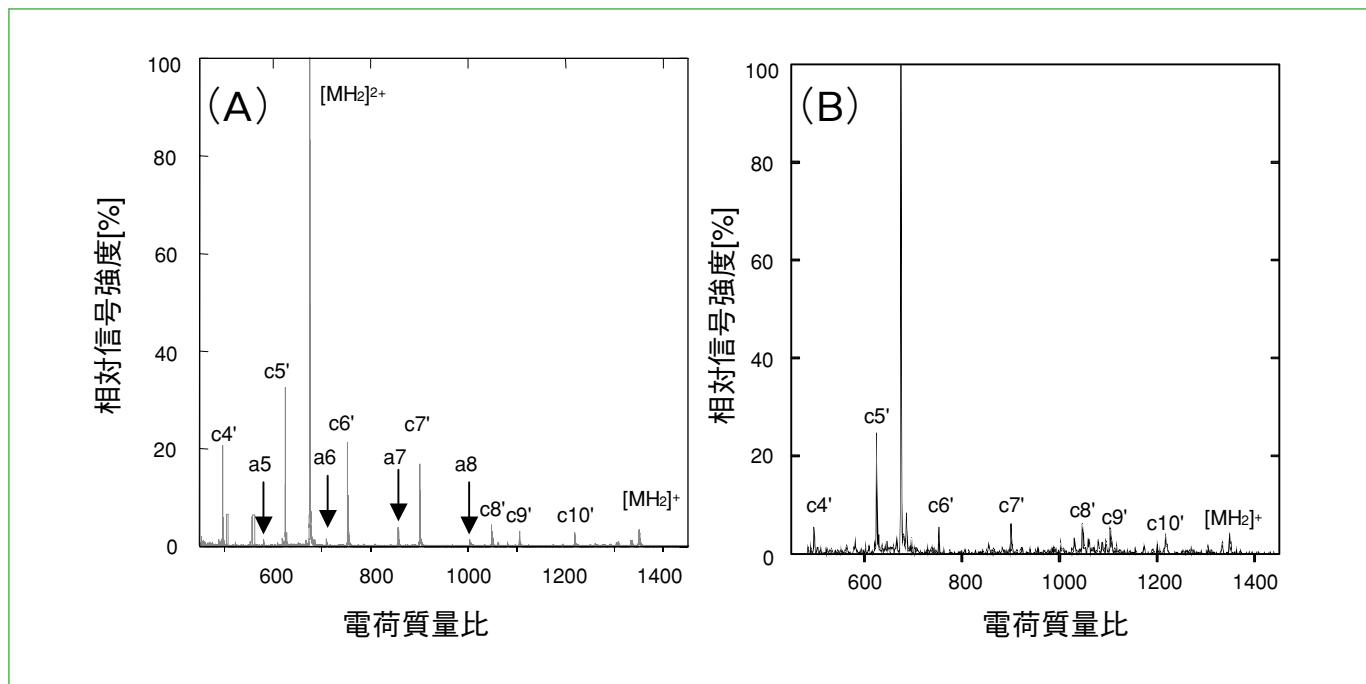


図4 (A)電子エネルギー5.6電子ボルトによるデータ積算時間10分で取得したHECDスペクトル。  
(B)電子エネルギー5.6電子ボルトによるHECDにおいて、データ積算時間5秒で取得したスペクトル。

に分子の電子励起が伴うために、その過剰エネルギーが分子に与えられaフラグメントが生成されたものと考えられる。図4(B)は、電子エネルギー5.6電子ボルトの条件において、5秒のデータ蓄積により取得されたHECDスペクトルである。観測された全フラグメントイオンの強度は反応前試料イオン強度に対し、30%程度である。

図4(B)で確認できた5秒のデータ蓄積によるスペクトル取得は、液体クロマトグラフによる分離成分の分離バンド幅とほぼ等しい。イオントラップを用いたECDが高速プロテオーム解析の解離手段として利用可能な段階に到達しつつあることを示している。

## 5. おわりに

電子捕獲解離など、解離手段はタンパク質分子・ペプチド分子を切断する「はさみ」に例えられる。ECDとCIDが、それぞれ特徴ある切断部位を持つため、これらを適切に組み合わせることにより、高速かつ高い確度の同定を可能とするプロテオーム質量分析が実現できると予想している。ECDは他の「電子による電荷減少を伴う解離」に比べ、電子を簡単に発生できるという簡便性、また質量が小さい電子を反応に用いることによる反応の高速性という利点がある。従来法とは異なる「切れ味」をもった「鋭いはさみ」を提供できるよう、さらに研究・開発を進めていく所存である。

本研究は、株式会社日立ハイテクノロジーズの協力と、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の実用化助成事業を受けて実施したものである。

## 参考文献

- 1) 照井 康他 (2005), S.I. News 48, 25-27.
- 2) T. Baba et al. (2004) Analytical Chemistry 76, 4263-4266.
- 3) R. A. Zubarev et al. Mass Spectrometry Reviews (2003) 22, 57-.
- 4) F. Kjeldsen et al. Chem. Phys. Lett. (2002) 356, 201-.
- 5) R. A. Zubarev et al. J. Am. Chem. Soc. (1998) 120, 3265-.
- 6) O. A. Silivra et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2005) 16, 22-.
- 7) H. Satake et al. (2005) 53<sup>rd</sup> American Society of Mass Spectrometry Conference TP238.
- 8) L. Ding et al. (2005) 53<sup>rd</sup> American Society of Mass Spectrometry Conference ThP204.
- 9) J. E. Syka et al. (2004) PNAS 101, 9528-9533.
- 10) A. Chi et al. (2005) 53<sup>rd</sup> American Society of Mass Spectrometry Conference ThOF-pm04 : 40.
- 11) A. S. Misharin et al. (2005) 53<sup>rd</sup> American Society of Mass Spectrometry Conference ThOEam 10 : 55.



## 微量元素の化学種分析(化学形態別分析) の重要性

Importance of Chemical Speciation for Trace Elements

中原 武利\*

現在、動植物や海水などの環境中に存在する微量元素については、これまでの数多くの研究報告があり、多くの微量元素の生理作用や毒性などが漸次知られてきた。また、微量元素の中には、ある微量元素範囲内では生体にとって必須であるが、固有の濃度以上では有害な元素も多数あり、様々な影響を及ぼすことが知られている。さらに、人体にとって、必要な濃度以下では、特有な欠乏症を示す元素も報告されている。このように、実際には、我々を取り巻く地球環境中には多くの必須な元素があり、逆に有害な元素も存在し、いろいろな媒体を通して人体に侵入してくる。特に、日常的に摂取している食品などには有用な微量元素が含まれているが、他方存在濃度によっては有害な微量元素も多く見出されている。実例としてよく知られているように、昆布、わかめ、ひじき等の海藻類を食する日本人では、特別に高濃度な暴露がない場合、食事を介して約200 $\mu$ g/日のヒ素を摂取していると言われている。ところで、ヒ素などの有害な微量元素の人体に対する毒性や生理的な作用の相異は、存在する化学形態に大きく依存していると考えられる。例えば、魚貝類中に含まれる無機水銀とメチル水銀では、その化学的な性質はまったく異なり、毒性ならびに体内分布にも大きな違いが出てくる。同じように、スズも無機態と有機態とでは、その毒性に大きな違いがあり、例えば、巻き貝中で検出された内分泌搅乱化学物質の一つであるトリプチルスズオキシドはその好例である。また、クロムは3価と6価では価数の違いにより毒性に大きな相違があることは古くから知られている。

一方、環境基準や排水基準などにおいては、元

素の全量(総量)濃度値が規制され、表示されている。したがって、現在でも多くの日常分析では、通常、対象元素の全量(元素およびその化合物の総量)の測定のみ行われている。しかしながら、有機金属成分については、化学形態別分析(化学種分析、スペシエーション、chemical speciation, elemental speciation, metal speciationなどとも呼ばれるが、ここでは、「化学種分析」の用語を使うこととする)の必要性が現在増しつつある。鉛、水銀、ヒ素、セレン、スズなどの元素では、毒性の問題は無機塩(イオン)だけではなく、特にアルキル化合物に関係しているので、全金属の測定だけではまったく不充分であると言わざるを得ない。すなわち、これらの元素が関与する有機金属態の定量方法を開発・確立しなければならない。有機鉛、有機水銀、有機ヒ素、有機セレン、有機スズなどの化合物の定量には、一種類の分析方法ではなく、多くの場合、二種類以上の分析法を組み合わせた、いわゆる複合分析技術(幾つかの分析法を組み合わせた分析法の名称で、英語では、“hyphenated analytical techniques”と呼ばれる)によって実現されることが多く、昨今の学術雑誌には多くの研究成果が報告され、いつかの成書も見られる。この複合分析技術では、一般的に、クロマトグラフ法(普通、ガスクロマトグラフィー(gas chromatography, GC)や高速液体クロマトグラフィー(high-pressure liquid chromatography, HPLC)である)あるいはキャピラリー電気泳動(capillary electrophoresis, CE)と高感度で、元素選択性に優れている検出器(原子スペクトル分析、すなわち原子吸光分析(atomic absorption spectrometry, AAS), プラズマ発光分光分析(plasma atomic emission spectrometry, AES), 原子蛍光分析(atomic fluorescence spectrometry,

\*大阪府立大学名誉教授・(社)日本分析化学会元副会長 工学博士

## ラウンジ

AFS) およびプラズマ質量分析(plasma mass spectrometry, MS) が主流である。ここで言うプラズマは、誘導結合プラズマ(inductively coupled plasma, ICP)である)を結合して用いられる。よく利用される複合分析技術は、GC-AAS, HPLC-ICP-AES, HPLC-ICP-MSなどである。

具体例として、ここでは、ヒ素の化学種分析の方法について少し詳しく述べてみよう。無機ヒ素(ヒ酸塩と亜ヒ酸塩), メチルアルソン酸, ジメチルアルシン酸, トリメチルアルシンオキシドを還元・気化して、それぞれ対応するヒ素の水素化物であるアルシン類に変換して低温・捕集した後、沸点差を利用して順次に再度気化させて分離された気体(アルシンガス)をAASで分別定量することができる。また、この分析法を利用して、無機ヒ素を体内に摂取すると、ヒトの尿中にジメチルヒ素化合物が排泄されることから、無機ヒ素が体内でメチル化されることも明らかになった。ところで、アルシン類を除いた無機ヒ素化合物は沸点が高く、難揮発性で、熱不安定で、極性も極めて大きいことから、これらを上述のような水素化物(アルシン類)への還元・気化による分離ではなく、溶液状態で優れた分離方法であるHPLCやイオンクロマトグラフィー(ion chromatography, IC)が用いられ、元素選択性検出器としてICP-AES, MSやICP-MSなどが活用される。特に、検出器としてICP-AESの感度はAASとほぼ同程度であるが、尿や毛髪などの生体試料中の極低濃度のヒ素分析には感度が不足する。そこで、超高感度で、元素選択性に優れ、多元素同時定量の可能なICP-MS装置が1980年代に開発・上梓され、HPLCやICなどと組み合わせた複合分析技術によってヒ素を中心とした微量元素の化学種分析の方法が急速に発展し、現在では、最良の分析法と見なされている。ただ、HPLCまたはICと組み合わせたICP-MSによるヒ素の化学種分析は、ダイナミックレンジ(検量線の直線範囲)が広く、ppb (ng/mlまたはng/g) やppt(pg/mlまたはpg/g) レベルの超高感度分析が容易であるが、プラズマガスと

して用いられるアルゴンがプラズマ中で塩素と反応して化合物イオン、例えば、 $\text{ArCl}^+$  ( $m/z=75$ ) [この質量数でICP-MSによってヒ素が測定される] を生成し、ヒ素の分析(定量)を著しく妨害する。このように、多量の塩素イオンを含む生体試料中のヒ素の化学種分析においては、ヒ素イオンと $\text{ArCl}^+$ ピークとの分離が非常に大きな問題となり、その対策が課題である。

以上に述べた化学種分析の手法は、現時点ではすべて研究・開発の段階にあり、近い将来には必ずや一般的な分析法(日常分析法)として確立されることを堅く信ずる。そのような時代が到来すれば、例えば、我が国における環境基準などで規制されている基準値は、現行の「○○およびその化合物が、△△mg/l以下」のような表現から、それぞれの化合物(またはイオン)の毒性などの相違を反映して、それぞれの化学形態別に決められた基準値の規制(表示)へと変更されるものと思われる。一方、最近世間の話題となり、その対応が急務な、欧州連合におけるWEEE指令およびRoHS指令により、2006年7月1日から電化製品を欧州に輸出する際には、製品中に含まれる有害金属・有害物質(現在では、カドミウム、鉛、水銀、クロム、ポリ臭化ビフェニル[PBB]、ポリ臭化ジフェニルエーテル[PBDE]の6物質)を非含有にする必要がある。その中で、特にクロムが「6価クロム」として「含有しないことを確実にすること」が求められている。このことは、化学種分析の重要性を示す先駆的な実例であると言っても過言ではないであろう。

# 日立卓上顕微鏡「TM-1000」Miniscope™

Tabletop Microscope TM-1000

平根 賢一\*

## 1. はじめに

走査型電子顕微鏡(SEM)は、生物・材料・化学・電気など多岐にわたる分野で表面観察および分析に利用されている。しかし、光学顕微鏡に比べ汎用的に使用される装置となっていない。

主な要因は、装置の設置条件に制約があること、操作習得に時間を要すこと、試料作成に習熟を要することなどが上げられる。

そこで、弊社ではより汎用的に使用される装置として、新しく小型の走査型電子顕微鏡TM-1000を開発したので紹介する。

## 2. 装置の特徴

TM-1000は、卓上設置型で、コンセント電源で使用することができ、電源投入後3分で装置が

使用可能となる。また、低真空法により、絶縁物でも金属膜のコートなしで試料を迅速に観察することができる。

装置を立上げ、試料に電子ビームを照射すると、自動で画像の明るさ調整やフォーカス調整が行われ、はじめの画像表示から試料の形状を捉えることができる。

さらに、操作を簡素化するため、従来SEMにあった多くの調整箇所を固定値とし、観察条件設定作業を排除した。

即ち、上述した特徴を持つ本装置は、ミクロの形態情報を迅速かつ効率的に得ることに特化した装置となっている。

図1は、卓上設置型の低真空SEM TM-1000の外観である。制御部と本体部に分かれており、制御部は主にDC電源と装置全体をコントロールする回路基板から成る。本体部には、試料室、電子光学系および真空排気系などが内蔵されている。

制御部と本体部を合わせた大きさは、



図1 日立卓上顕微鏡「TM-1000」Miniscope™

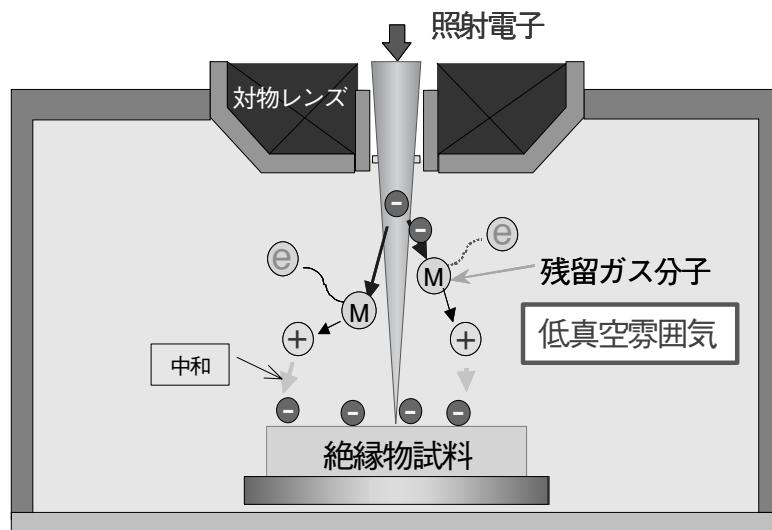


図2 低真空法による帯電除去の原理

478(W) × 564(D) × 513(H) mm, 総重量86kgである。耐荷重100kg以上の机に設置できる。装置の操作は、制御部とUSBで接続したノートパソコンで行う。

### 3. 帯電除去の原理

絶縁物でも金属膜のコートなしで迅速に試料を観察するため、本装置では図2に示す低真空法を採用している。

低真空法は、残留ガス分子の存在する試料室に絶縁物試料を置き、その試料に電子銃から放出した電子を照射すると、一部の電子は試料に到達できず残留ガス分子に衝突する。残留ガス分子に衝突した電子は残留ガス分子を正にイオン化する。

一方、試料に到達した電子は試料が絶縁物のため試料上に留まり、試料を負に帯電する。その結果、正にイオン化された残留ガス分子が、負に帯電した試料を中和して帯電を除去する。

### 4. 帯電除去効果

本装置では、試料室真空度により導電性試料を観察する標準モードと絶縁物試料を観察する帯電軽減モードがある。図3と図4は、それぞれのモードで絶縁物試料(繊維)を観察した画像である。図3では、帯電のために画像にズレたような乱れがあるが、試料室を低真空度とした帯電軽減モード図4では、良好な画像が得られており、絶縁物の帯電除去が行われていることが確認できる。

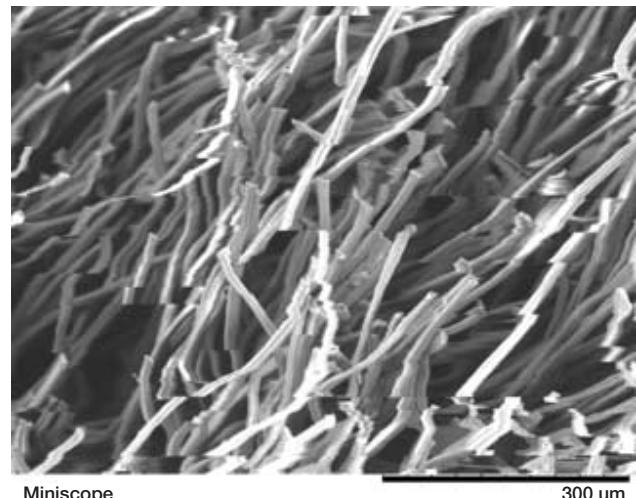


図3 標準モード(×250倍)

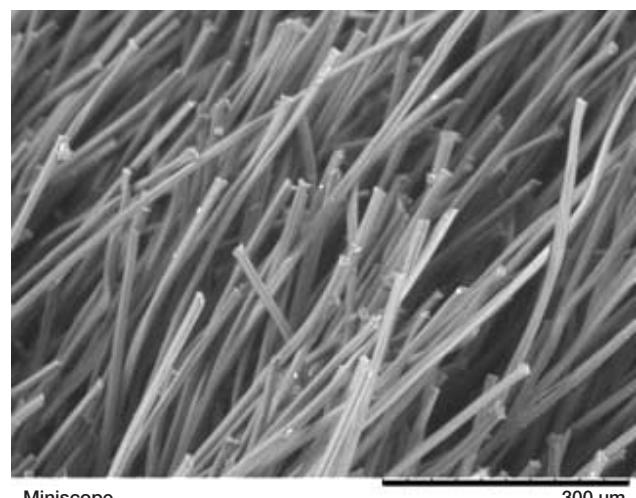


図4 帯電軽減モード(×250倍)

表1 TM-1000の主な仕様

No.	項目	仕様
1	加速電圧	15kV
2	倍率	～10,000倍
3	試料室真空度	標準モード／帯電軽減モード
4	試料ステージ 可動範囲	X:15mm,Y:18mm
5	試料サイズ	最大Φ70mm (20mm厚以下)
6	電子銃	Wヘアピングフィラメント型熱電子銃
7	レンズ	永久磁石収束レンズ(2段) 電磁コイル式対物レンズ
8	検出器	半導体型反射電子検出器
9	真空ポンプ	小型ターボポンプ、ダイアフラムポンプ
10	制御CPU方式	PC+専用マikon制御

## 5. TM-1000の主な仕様

TM-1000の主な仕様を表1に示す。電子銃はWフィラメントを使用した熱電子銃で、加速電圧は15kV固定である。2段のコンデンサレンズに永久磁石を使用して、小型省電力化を図っている。

また、半導体型反射電子検出器を搭載し、最高倍率10,000倍、デジタルズームで40,000倍までの拡大画像を得ることができる。最大試料サイズは、Φ70で厚さ20mmの試料を挿入し、観察することができる。ただし、試料の観察範囲は15mm×18mmである。

## 6. その他の観察画像

本装置は、反射電子を検出して画像を構築しているため、容易に組成像を得ることができる。図5に示した画像はハンダを観察した結果であ

る。錫と鉛の反射電子量の違いにより、容易に混在の分布情報を得ることができる。

## 7. まとめ

設置条件制約や操作の容易性において、光学顕微鏡と同等の装置が開発できたと考える。

特に、数千倍で焦点深度の深い立体的な形態情報を必要とする分野に、本装置が広く活用されることを期待する。

〔問合せ先〕(株)日立ハイテクノロジーズ

先端製品営業本部 アプリケーション技術部

URL:<http://www.hitachi-hitec.com/em/miniscope/>

e-mail:[miniscope@nst.hitachi-hitec.com](mailto:miniscope@nst.hitachi-hitec.com)

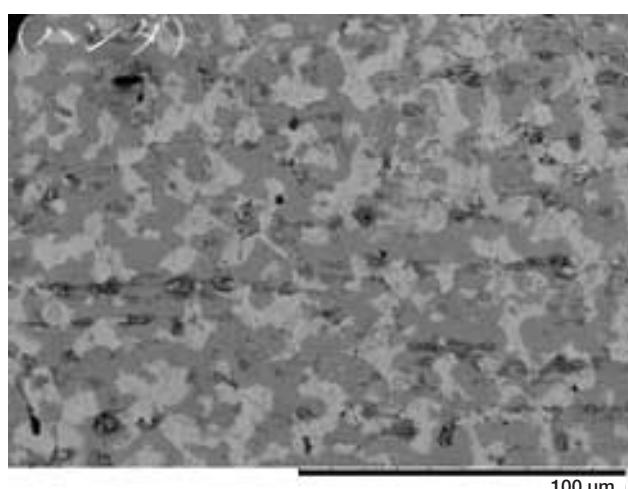


図5 ハンダの組成像(×1000倍)

U.D.C.543.544.3 : 621.384.8 : 577.112.6

# タンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier L

Nano LC/Linear-Trap-TOF for Proteomics

師子鹿 司\* 伊藤 伸也\*\* 吉岡 信二\*\*  
永井 伸治\*\* 西田 哲也\* 竹田 明弘\*

## 1. はじめに

近年、生命現象のメカニズムを解明する手法の一つとして、プロテオーム解析が注目されている。プロテオーム解析は、DNAシーケンサーなどを用いたゲノム情報に対して、実際に細胞内で働いているタンパク質についての情報を付加する。タンパク質の情報を付加されたゲノム情報は、医療、創薬および診断分野など様々な産業への応用が予測されている。

日立ハイテクノロジーズは、2005年4月にタンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析装置 NanoFrontier Lを発売した。液体クロマトグラフ部にはNanoLCを搭載し、スプリットレスで nanoL/min流量域のグラジェント送液を実現している。質量分析部はリニアイオントラップ(以下 LIT)と飛行時間型質量分析装置(以下 TOF/MS)

を組み合わせたハイブリッド型の質量分析装置を搭載し、多段階のMS/MS分析と高質量精度計測を両立している。

NanoFrontier Lは当社従来機比、約10倍の感度向上を達成しており、1fmolの試料が測定可能である。さらに MS/MS分析時にターゲットイオンを効率的に選択するInformation Based Acquisition(以下 IBA)機能を搭載、nanoL/minの流量域での2次元nanoLCシステム(オプション)も接続可能である。図1に装置外観を示す。本解説では、NanoFrontier Lの特長と測定例を紹介する。

## 2. 質量分析部の特長

ゲノムからプロテオームへと解析を進めるために、細胞内で転写(発現)された遺伝子(m-RNA)についての検討が行われている。そこから得られ



図1 NanoFrontier L 外観

\*(株)日立ハイテクノロジーズ バイオシステム設計部  
\*\*(株)日立ハイテクノロジーズ 那珂アプリケーションセンタ

た知見として、組織内のmRNAの濃度と発現した遺伝子数にはべき乗の法則が成り立つことが示されている<sup>1)</sup>。これは組織内に存在するmRNAの濃度(存在量)が1桁低くなると、その種類は1桁増大することを意味している。組織内のmRNAとタンパク質の種類の相関はまだ明確になっていないが、弱い相関があるといわれている。測定装置の感度が1桁向上することで、観測可能

な試料対象数が約1桁増大すると予想されるため、質量分析装置には常に高感度化が求められてきた。

NanoFrontier Lでは従来機に用いられてきた3次元型イオントラップ(以下QIT)をLITに変更し搭載している。LITはQITと比較するとイオン導入効率が高く、さらに閉じ込め容量が増大することで、質量分析部の測定感度を改善した。

## 100fmol BSA (NanoFrontier)

### *{MATRIX}* Mascot Search Results

#### Protein View

Match to: P02769-00-00-00 Score: 1039  
(ALBU\_BOVIN) Splice isoform Displayed; Variant Displayed: Conflict Displayed; from P02769 Serum albumin precursor (Allergen)  
Found in search of F:\yokohama\20050616\KVA-BSA-100f-load3-back1011.mgf

Nominal mass ( $M_r$ ): 69248; Calculated pI value: 5.82  
NCBI BLAST search of P02769-00-00-00 against nr  
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Bos taurus

Variable modifications: Carboxymethyl (C), Oxidation (M), Oxidation (H/W)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Sequence Coverage: 47%

Matched peptides shown in Bold Red

```

1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTKHSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEI TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCECEKQEP ERNECEFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFOE CCQAEKGAC
201 LLPKIETHEE KVLAASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWNSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDK ADLAKYICDN QDTISSLKKE
301 CCKPPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPLTA DFAEEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCKAKDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFQFEK LGEEYGFQNAL IVRYTRKWPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKADEKLF TFHADICLTP DTEKQIKKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTLA

```

## 10fmol BSA (NanoFrontier L)

### *{MATRIX}* Mascot Search Results

#### Protein View

Match to: ALBU\_BOVIN Score: 1353  
(P02769) SERUM ALBUMIN PRECURSOR  
Found in search of F:\prototype1\_LIT\20050528\_s\BSA10fmol\_Api\_03\_3sineCID90power\_002.mgf

Nominal mass ( $M_r$ ): 69248; Calculated pI value: 5.82  
NCBI BLAST search of ALBU\_BOVIN against nr  
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Bos taurus

Variable modifications: Carboxymethyl (C), Oxidation (M), Oxidation (H/W), Pyro-cmC (N-term camC), Pyro-glu (N-term E), Pyro-glu  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Sequence Coverage: 62%

Matched peptides shown in Bold Red

```

1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTKHSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEI TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCECEKQEP ERNECEFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFOE CCQAEKGAC
201 LLPKIETHEE KVLAASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWNSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLECADDK ADLAKYICDN QDTISSLKKE
301 CCKPPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPLTA DFAEEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCKAKDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFQFEK LGEEYGFQNAL IVRYTRKWPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKADEKLF TFHADICLTP DTEKQIKKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTLA

```

図2 BSAカバー率による感度比較

図2に、牛血清アルブミン(BSA)の測定結果を示す。nanoLCに用いた溶離液はA液が0.1% HCOOH, 2% AcCN, B液が0.1% HCOOH, 98% AcCNである。グラジエント条件はB液 2 → 40%を50分で変化させた。分離カラムにはPicoFrit<sup>TM</sup>を用いている。イオン化はElectro Spray Ionization法(以下ESI法)にて行った。質量分析部はAuto MSMS機能を用い、多価イオンのターゲットイオンのみをリアルタイムに選択しMS/MS分析を行った。

ペプチド類をESI法にてイオン化する場合、測定試料のターゲットイオンは多価イオンとなる傾向があり、精度の高いMS/MS分析を行うためにはリアルタイムの価数判定が必須となる。NanoFrontier Lでは質量分離にTOF/MSを用いリアルタイムの価数判定を実現している。

得られたMS/MS分析のデータをMASCOT<sup>®</sup>データベースにて検索を行った。従来機ではBSA 100fmolの同定カバー率が47%だったのに対し、NanoFrontier Lでは、10fmolで同定カバー率62%という結果が得られた。測定試料の濃度が1桁低いにもかかわらず、同等以上のペプチドを同定することができた。この結果からNanoFrontier Lは、従来機と比較すると、約1桁の感度向上を達成した。

### 3. Information Based Acquisition機能

複数のタンパク質が混ざり合ったような複雑な試料を測定する場合、液体クロマトグラフでの分離分画が不十分となり、異なる試料の保持時間が重なる場合がある。その場合、複数のペプチドが同時に質量分析部に導入されることになる。従来機ではMS/MS分析を行う際、観測された信号強度順にターゲットイオンを選択し、保持時間の重なる測定試料に対応していた。NanoFrontier Lでは、このMS/MSの機能を拡張しターゲットイオンの選択性能を向上させるためIBA機能を搭載した。図3にIBAの動作原理図を示す。IBAでは測定1回目のMS/MS分析で選択したターゲットイオンの質量数(M1, M3, M5)と保持時間(RT1, RT2)を内部データ

ベースに自動的に保存する。2回目のMS/MS分析では、観測されたターゲットイオンの質量数と保持時間を1回目に保存したデータベースと比較し、1回目に選択したターゲットイオン(M1, M3, M5)は選択せず、質量数の異なるターゲットイオン(M2, M4)を選択する。そのため測定繰り返し回数を増やすことで従来ターゲットとなっていたなかった小さなピークまでも選択することが可能になる。言い換えるならば質量分析装置による測定試料の分離分画性能の向上となる。

図4にIBA機能を用いて酵母試料を測定した結果を示す。nanoLCには1次元のnanoLCを用いている。酵母試料は含まれるタンパク数が非常に多いため1次元のnanoLCでは分離性能が不足し、保持時間の重なる測定試料が多数存在することになる。IBA機能を用いることにより複数回測定での同定タンパク数の増加と同定されたタンパク個々のカバー率について確認した。図4.1に繰り返し測定を行った場合の同定タンパク数の増加を示す。1回目の測定では164個のタンパクを同

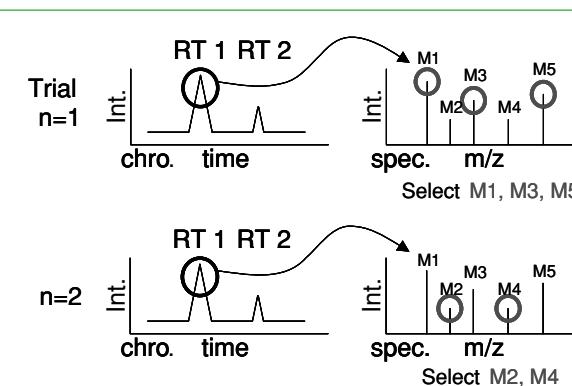


図3 Information Based Acquisitionの動作原理図

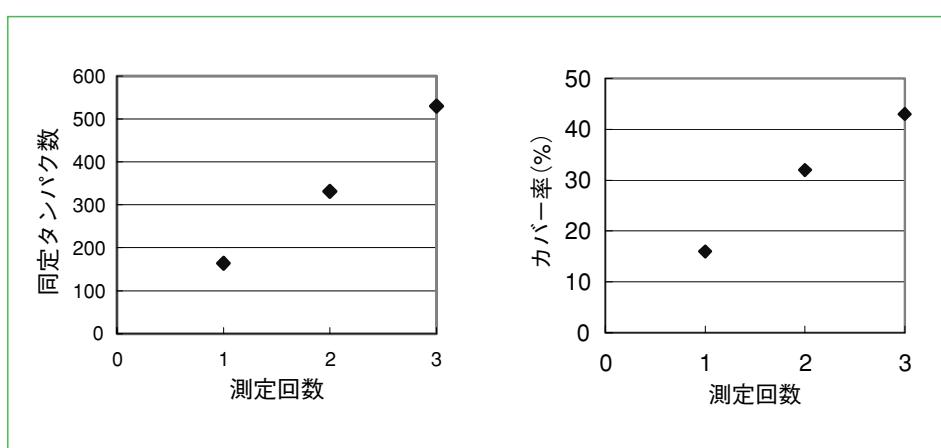


図4.1 IBA測定による測定回数と同定タンパク数の変化

図4.2 IBA測定による測定回数とEnolase2\_Yeastのカバー率の変化

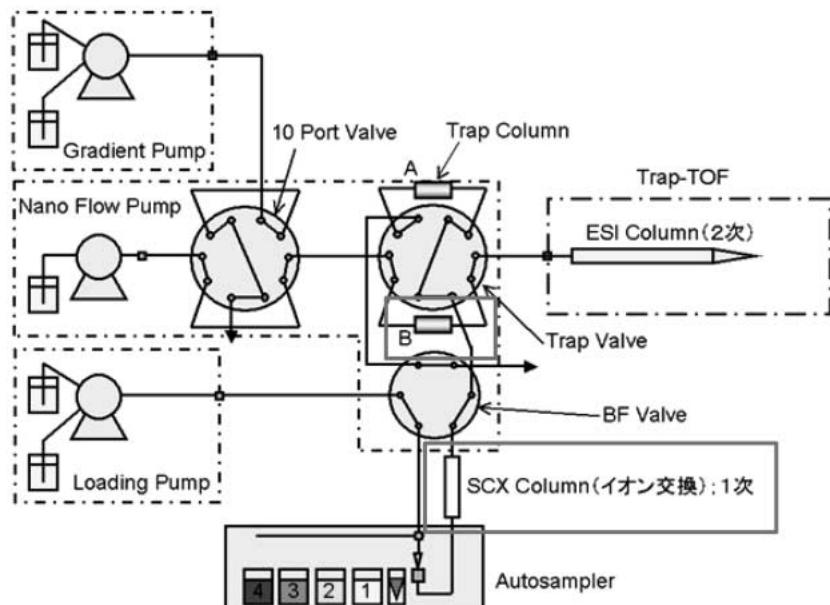


図5 2次元NanoLC構成図

定した。2回目の測定では332個、3回目の測定では530個となり、3回の測定で1回の測定と比較すると、約3倍のタンパク質を同定した。 nanoLCの分離が不足する場合でもIBAを用いることで同定タンパク数を増加させることができることが判る。また、これは測定毎に異なるターゲットイオンを選択しMS/MS分析を実行している結果である。図4.2は同定したタンパク中で特にEnolase2\_Yeast単体に注目した場合の測定回数に対するカバー率の変化を示した。1回目の測定ではカバー率が16%だったのに対して3回の繰り返し測定により43%に向上した。IBAを用いて繰り返し測定を行うことで、個々のタンパク質の同定精度も向上することが判る。これは測定回数を重ねる毎に、同一イオン種の信号強度の低いターゲットイオンを選択してMS/MSを行っている結果であると考えられる。

#### 4. 2次元nanoLC(オプション)

NanoFrontier Lでは、測定試料の分離分画性能の向上のため2次元nanoLCシステムを製品化した。この2次元nanoLCは、1次元目の分離をイオン交換カラム、2次元目の分離は逆相カラムとしている。その特長は簡単に1次元と2次元の nanoLCシステムを交換できることである。2次元 nanoLCの分離分画性能は1次元LCを上回るが、測定時間が長くなるという欠点もある。そこで、測定する試料の複雑さに合わせて1次元と2

次元を選択することで、効率的な測定が可能となる。図5に2次元 nanoLCの構成図を示す。2次元から1次元 nanoLCへの切替は、

- ・逆相カラム(図5中 SCX Column)を取り外し、配管に変更する。
- ・トラップカラム(図5中 Trap Column B)のひとつを取り外し、配管に変更する。

ことで、1次元と2次元のシステムを切り替えることが可能となる。

#### 5. 終わりに

NanoFrontier LはLIT搭載による高感度化を実現し、さらにターゲットイオンの選択性能を向上させるためにIBA機能を搭載した。また測定試料の分離分画性能の向上を目的とした2次元 nanoLCも接続可能となっている。NanoFrontier Lを用いることにより、プロテオーム解析、創薬等の分野で新たな発見が期待される。

本開発の一部は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の助成事業「バイオ・IT融合機器開発プロジェクト」の一環として行われました。

#### 参考文献

- 1) 松原 謙一, 楢 佳之, 「ゲノム機能発現プロファイルとranscriptome」, 中山書店, Tokyo, (2000)

## 学会発表 ミニファイル

### 1. 日本金属学会(2005.3/31 神奈川県)

上野(日立ハイテクノロジーズ那珂アプリケーションセンター), 他:高位置精度デバイス構造解析

### 2. 医学生物学電顕技術学会第21回学術討論会(2005.5/21~22 岐阜県)

中澤(日立ハイテクノロジーズ那珂アプリケーションセンター), 他:透過電子顕微鏡による生物試料のデジタル観察技術

### 3. 日本顕微鏡学会第61回学術講演会チュートリアル(2005.5/31 茨城県)

上野(日立ハイテクノロジーズ那珂アプリケーションセンター), 他:FIBの特長と電子顕微鏡学への応用

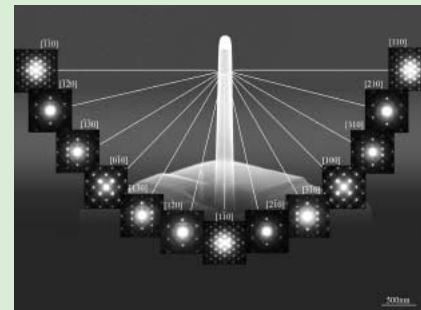
### 4. 日本顕微鏡学会第61回学術講演会(2005.6/1~3 茨城県)

今野(日立ハイテクノロジーズ), 他:高分解能3D観察法とその応用

**【要旨】** 試料の三次元FIB加工およびTEM/STEMによる三次元直接観察のためのFIB/STEM共用3D解析ホルダーと高電圧STEM/TEM観察による原子レベルでの三次元微細構造解析法を開発した。試料作製には, FIBマイクロサンプリングシステムを備えたFB-2100 FIB加工観察装置(加速電圧: 10~40kV)を用いた。試料の仕上げ加工にはLINDA社製GENTLE MILL Arイオンミリング装置を用い, 加工は加速電圧200Vで行った。試料の観察には, H-9500高分解能電子顕微鏡(加速電圧300kV)およびHD-2300超薄膜評価装置(加速電圧200kV)を用いた。直径70nmの円柱状Si単結晶試料の高分解能TEM像観察により, Si結晶表面は

約3nmの非晶質層で覆われていることが分かった。

日本顕微鏡学会  
第61回学術講演会写真コンクール  
最優秀賞受賞写真



試料を180°回転しながら観察した電子線回折像(試料: Si単結晶)

矢口(日立ハイテクノロジーズ), 他:三次元元素分布像のための試料作製

中澤(日立ハイテクノロジーズ), 他:電子線トモグラフィー用3D-TEMシステムとその応用

黒田(日立ハイテクノロジーズ), 他:FB-2100のFIB自動加工機能を用いた高位置精度薄膜作製法

**【要旨】** FB-2100 FIB加工観察装置の自動加工機能向上の一環としてエミッション電流安定度の向上と, 加工位置を正確に検出するための新アルゴリズムを開発した。加速電圧40kV, ビーム径約150nm, ビーム電流7nAの条件で16箇所のマイクロサンプリング自動周囲加工を行った。加工に要した時間は約8時間であった。自動薄膜加工機能を用いてマイクロサンプルを0.1μmの厚さに薄膜化した。粗加工には加速電

圧40kV, ビーム径15nm, ビーム電流20pAを行った。薄膜加工箇所の位置決めは, まず, 試料台に固定したマイクロサンプルの両端を45度で断面加工し, その断面から試料内部の構造を確認する。次に, マイクロサンプルの垂直度, 水平度を補正した後, 加工位置の設定をする。これにより高位置精度での自動加工が可能となった。加工に要する時間は15分である。

武藤(日立ハイテクノロジーズ), 他: 低照射電圧による低ダメージ観察法  
壇(日立ハイテクノロジーズ), 他: 低真空観察法によるチャージアップ軽減  
伊藤(日立ハイテクノロジーズ), 他: イオンミリングによる多様な試料前処理例  
渡邊(日立ハイテクノロジーズ), 他: In-Lens FE-SEMによる各種信号を用いた多角的な観察手法  
小笠原(日立ハイテクノロジーズ), 他: 超高圧電子線トモグラフィーによるLSIデバイス3次元診断

小柏(日立ハイテクノロジーズ), 他: リターディング法を用いた低加速電圧SEMの分解能向上

**【要旨】** 低加速電圧SEM法は, 試料の表面観察やダメージ軽減など, さまざまな状況下で積極的に利用されている。これに伴い, SEM装置に対しては, 低加速電圧領域の分解能向上が求められてきている。低加速電圧領域の分解能を向上させる方法としては, これまでさまざまなアプローチがなされてきた。この分解能向上策の一つにリターディング法があり, 近年の高分解能FE-SEMにも採用されてきている。リターディング法とは, 平坦な試料に負の電圧を印加して一次電子を試料直前で減速し, 電子銃の加速電圧よりも低い加速電圧で一次電子線を試料に照射させる方法である。このとき, 一次電子線は対物レンズ磁場内を照射電圧より高い加速電圧で通過するため, 対物レンズの色収差および球面収差の影響(低加速電圧領域では主に色収差)による像のぼけを少なくすることができ, 分解能を向上させることができる。

稻田(日立ハイテクノロジーズ), 他: 走査透過電子顕微鏡における倍率自動構成機能の開発  
揚村(日立ハイテクノロジーズ), 他: 高角・高精度イメージシフト機能の開発  
神谷(日立ハイテクノロジーズ), 他: インレンズ形超高分解能走査電子顕微鏡S-5500の機能と特長  
佐藤(日立ハイテクノロジーズ), 他: SEM情報制御によるチャージアップの影響軽減  
北(日立ハイテクノロジーズ), 他: 薄切・試料支持・電子染色におけるトラブルシューティング

平根(日立サイエンスシステムズ), 他: 日立卓上顕微鏡「TM-1000」Miniscope™

**【要旨】** 生物・材料・化学・電気分野などの試料が金属薄膜コートなしで観られ, 操作が簡単で, 机上に設置できる低真空SEMを開発した。低真空に制御するための真空計やバルブを除去し, 真空ポンプの排気速度とエアーリーク部に設けた固定絞りのコンダクタンスをバランスさ

せ, 試料室を30~50paの真空度に保つ排気系を実現した。本装置では, 光学顕微鏡とほぼ同様に低伝導性の試料でも金属薄膜コートなしで観察でき, 反射電子検出器による組成像や光学顕微鏡像に比べ焦点深度の深い立体的な画像を得ることができる。

## 5. LCテクノプラザ(2005.2/1~2 千葉県)

井上(日立ハイテクノロジーズ), 他: 新規イオン交換樹脂を用いたアミノ酸分析法の開発

## 6. 日本分析化学会第66回討論会(2005.5/14~15 北海道)

吉岡(日立ハイテクノロジーズ), 他:ナノ高速液体クロマトグラフィー・質量分析法のナノ流量グラジェント装置の開発

**【要旨】**タンパク質・ペプチドなどの極微量サンプルを測定する際に用いられるナノフロー領域におけるグラジェント溶出には課題がある。最も簡便な方法として多用されているスプリット方式によるグラジェント送液は、キャピラリーカラム等の圧力変動がそのまま流量変動となるために再現性の良いデータを連続して測定するには不安がある。

今回、開発を行ったバルブ＆ループ法を用いたナノ流量グラジェント装置は、10方バルブに備え付けられた二つのループを用いて、10方バルブを切り替えることにより、ループにロードされていた溶離液がナノ流量ポンプによりカラム側へ送り出され、一方のループにマイクロ流量の低圧グラジェントポンプから溶離液がロードされる。この10方バルブの切り替えを一定時間ごとに繰り返すことによりナノ流量で

のグラジェントが実現できる。本システムを用いて、グラジェントカーブの安定性を評価するためにBSA(Bovine Serum Albumin)のトリプシン消化物を流量200nL/minで分析を行った。その結果、下図に示すような良好な分離パターンが得られ、安定したナノ流量でのグラジェント送液が可能であることがわかった。

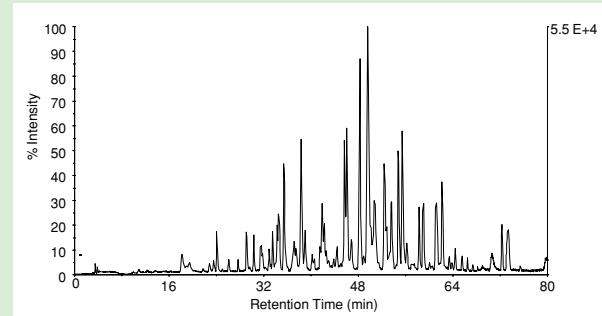


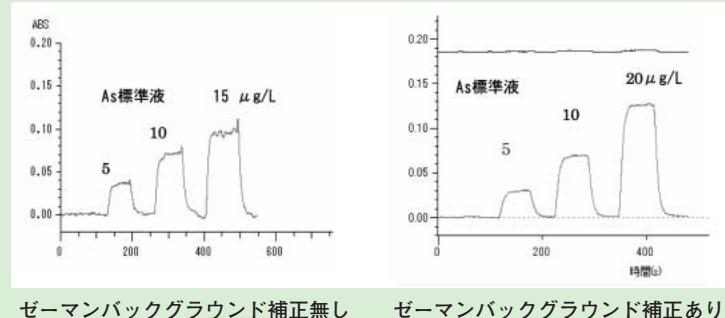
図 BSAトリプシン消化物のトータルイオンクロマトグラム  
(Flow rate : 200nL/min)

米谷(日立ハイテクノロジーズ), 他:ゼーマンバックグラウンド補正を用いた水素化物発生-原子吸光度法によるヒ素分析方法の基礎

**【要旨】**水素化物発生原子吸光法においては、発生した水素化物を原子化するため、水素化物を加熱した石英セルに導入する方法が用いられている。ゼーマン効果を用いた装置の場合、石英セルの大きさやバーナ部の炎の影響により、従来は磁石の外部に設置して測定している。このためゼーマンバックグラウンド補正を使用できなかった。今回石英セルの改良と磁石部の炎熱処理を行った。それにより、ゼーマンバックグラウンド補正が可能となった。水素化物発生法の干渉は主に、目的元素を水素化物として還元気化するときに影響を受けるものと、水素化物が原子化されるときに受けると想像される。本研究では、これらにおける基礎的な実験を行い報告した。

硝酸の干渉において、吸収信号増加という現象がみられるが、これは多量に発生したバックグラウンド吸収を起すガス成分によるものであり、ゼーマン補正を行った結果増感干渉でないこ

とが明らかになった。また、ゼーマン補正を用いた場合でも、原子化部に導入された時に発生したバックグラウンド吸収は補正されるが、還元反応時に発生するガス成分を抑制することはできない。このことから、水素化物発生法を用いたヒ素測定で、硝酸の共存濃度は、0.5%以下にする必要があることがわかった。データは、標準液の測定においてゼーマンバックグラウンド補正をした場合としない場合との比較をしたもので、ベースラインノイズの低減および安定性が向上した。



### 石川(日立ハイテクノロジーズ), 他:環境水中の陰イオン界面活性剤の分析

**【要旨】**HPLCを用いた環境水中の陰イオン界面活性剤の分析について検討した。前処理は、日立固相充填カラムNOBIAS RP-OD1(日立ハイテクノロジーズ製)を用いた。この時の試料中のマトリックスの影響について検討した結果を報告した。特に、水道水中ではカルシウムやマグネシウムの影響で炭素数の大きい成分の回収率が低下した。試料水に、メタノールを添加することで、カルシウムによる陰イオン界面活

性剤の凝集性を解消し90%以上の回収率が得られた。図は、東京都の水道水および標準試料各0.004mg/L添加したクロマトグラフを示した。蛍光検出器L-2480を用い、告示法の1/10の濃縮倍率で基準値の1/10の標準試料を添加した。この結果、高感度で、環境水中のマトリックスの影響を解消した陰イオン界面活性剤の分析が可能となった。

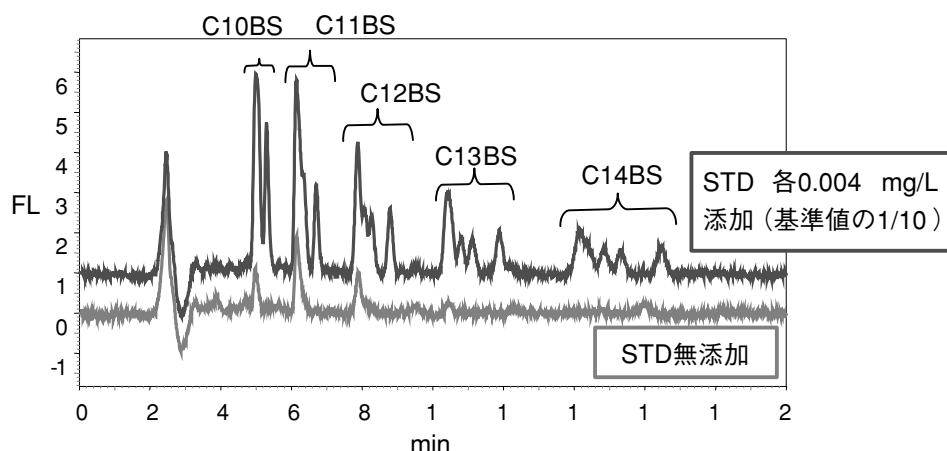


図 東京都水道水抽出液の測定

坂元(日立ハイテクノロジーズ), 他:ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂を用いたマトリクス元素の除去能力と海水試料への適用

### 7. 第53回質量分析総合討論会(2005.5/26~27 埼玉県)

永井(日立ハイテクノロジーズ), 他:NanoHPLC/ESI-IT-TOFMSを用いた糖ペプチドのMS<sup>n</sup>スペクトル構造解析

### 8. 14回環境化学討論会(2005.6/15~17 大阪府)

坂元(日立ハイテクノロジーズ), 他:PAAC型キレート固相抽出法を用いた天然水中微量元素の分析

### 9. 第16回日本微量元素学会(2005.6/30~7/1 京都府)

山本(日立ハイテクノロジーズ), 他:PAAC型キレート固相抽出法を用いた尿中微量元素の分析

## 新製品紹介

### NEW PRODUCTS

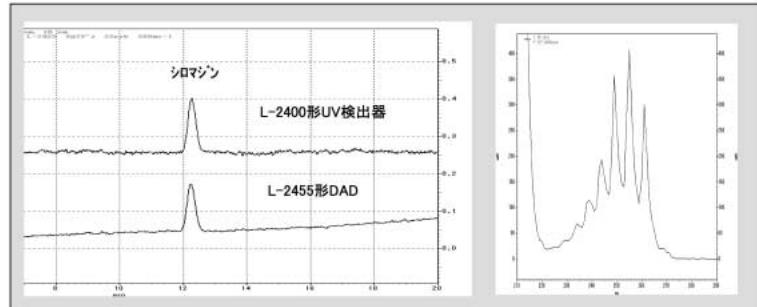
#### 新型検出器L-2455形DADのご紹介

集光効果を改良した新光学系の採用とデジタル信号処理の改良により、世界最高水準の低ノイズを実現しました。L-2450形に比べ、ノイズレベルを1/3に低減し、高感度クロマトグラフを測定することが可能です。

またフォトダイオードアレイは1024bitで、スペクトルの高分解能を実現しています。高感度と高分解能を兼ね備えた日立新型



DAD(3次元検出器)は、お客様のさまざまなニーズにお応えします。



【シロマジンの測定例】

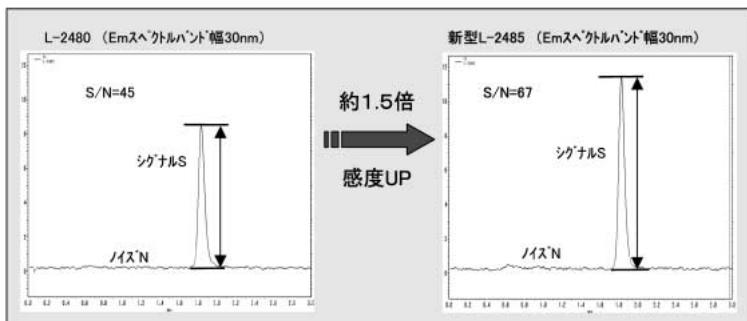
【ベンゼンのスペクトル測定例】

##### 測定条件

流量: 0.5mL/min  
溶離液: アセトニトリル: リン酸バッファー=1:49  
注入量: 10µL(シロマジン25ppb)

カラム: ODS(5µm)4.6mmΦ×150mmL  
カラム温度: 40°C  
検出器: 240nm

#### 新型検出器L-2485形蛍光検出器のご紹介



【アントラセン 1 pgの測定例(感度比較)】

##### 測定条件

流量: 1mL/min メタノール  
注入量: 10µL(アントラセン1pg)  
カラム温度: 40°C

検出器: Ex 250nm Em 400nm  
カラム: ODS(5µm)4mmΦ×125mmL

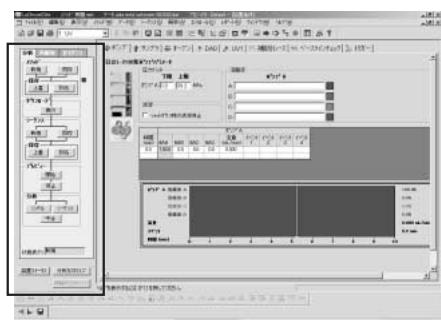
光量UPを目的とした新光学系の採用とフローセルの改良により世界最高水準の高感度を実現しました。

日立の新型蛍光検出器で、未知の高感度領域の世界を体感してください。



#### EZChrom Elite™操作フローガイド機能のご紹介

分析・再解析の流れを示す操作フローガイドが画面左端に表示されます。ボタンをクリックすることにより、対応するEZChrom Eliteの画面が開きますので、慣れない方でも迷わずに操作できます。さらにフローはカスタマイズ可能。もうEZChrom Eliteをらくらく操作！(操作フローガイド機能はEZChrom Eliteの新バージョン(Ver3.7.1J)に標準搭載された機能です。)



【分析フローガイド 画面例】

## 新製品紹介

## NEW PRODUCTS

日立卓上顕微鏡  
「TM-1000」 Miniscope™

4月1日発売の本製品は、どこでも・簡単・スピーディーに観察倍率1万倍という世界を実現可能にしました。

光学顕微鏡ではもの足りず電子顕微鏡では大掛かりで…という方へ。

より多くの方にミクロの世界を知って頂きたいという夢と共にご紹介します。

## 特長

1. 卓上サイズで省エネタイプ
- 電源はAC100V5Aコンセントひとつだけ。
2. ワンクリックの簡単操作
- 装置立ち上げ時間は約3分。  
冷却水不要。
- デジカメ感覚簡単操作画面。
- ワンクリックで像観察！

新型高速アミノ酸分析計「L-8900形」を発売  
—簡単操作、効率的な分析をサポート—

アミノ酸分析計は、日立ハイテクでは1962年より製造販売しており、最近ではアミノ酸飲料、サプリメントの分析にも利用されています。このたび、国内トップシェアであるアミノ酸分析計を8年ぶりにモデルチェンジしました。

L-8900形は分析の専門でない方でも簡単に操作できることをコンセプトに開発されました。タッチパネル画面の操作案内に従っていいくだけでは分析が開始できます。フルスペック版ではポンプページの自動化や、重量センサにより試薬残量や廃液量の自動監視ができます。また、60分高速生体液分析法を用いれば40成分のアミノ酸が一斉に分析できます。

L-8900形は分析操作者が装置から離れられる時間が大幅に拡大できるため、分析業務の効率向上に大きく貢献できると期待しています。



## 新製品紹介

### NEW PRODUCTS

#### タンパク質解析用液体クロマトグラフ 質量分析計NanoFrontier Lのご紹介

ご好評頂いておりますタンパク質解析用液体クロマトグラフ質量分析計NanoFrontierに、この度、さらに機能向上したNanoFrontier Lが誕生しました。

##### 特長

- Linear Ion Trapを搭載し、当社比10倍の感度向上を実現しました。

- IBA (Information Based Acquisition)機能により、情報量の多いMS/MS分析を実現しました。
- 従来分離が困難であった複雑なペプチド試料の分離を実現するため、2次元LC(オプション)を接続可能にしました。



#### ◎ 株式会社日立ハイテクノロジーズ

北海道支店 電話 札幌 (011) 221-7241  
東北支店 電話 仙台 (022) 264-2219  
筑波支店 電話 土浦 (029) 825-4801  
中部支店 電話 名古屋 (052) 219-1881

本 社 電話 東京 (03) 3504-7211  
静岡営業所 電話 静岡 (054) 262-0561  
三島営業所 電話 三島 (055) 989-7571  
関西支店 電話 大阪 (06) 4807-2511  
京都営業所 電話 京都 (075) 241-1591

四国営業所 電話 高松 (087) 825-9977  
中国支店 電話 広島 (082) 221-4511  
九州支店 電話 福岡 (092) 721-3511

##### 〈編集後記〉

今年も暑い夏が過ぎようとしています。今年の夏は何かとオーバーヒート気味であったような気がします。小泉首相が思いがけない衆議院解散を行ったりしました。また、暑い夏の呼び物の一つである夏の甲子園(高校夏の野球大会)では北海道の駒大苫小牧高校が見事57年ぶりの連覇を遂げ、見ている観客をさらに熱くしました。一方、政府が提唱したクールビズも一般に認知されたようで、我々もノーネクタイを遠慮なくすることができ、かえって例年より過ごし易かったような気がします。

さて、本号は、巻頭言に兵庫県立大学の寺部先生(前日本分析化学会会長)に分離分析の振興と題する巻頭言を、(有)GC技術研究所の竹内先生、(株)日立製作所の馬場先生及び佐竹先生には各報文をいただきました。また、ラウンジには大阪府立大学名誉

教授の中原先生(社)日本分析化学会元副会長)に「微量元素の化学種分析(化学形態別分析)の重要性」と題するお話をいただきました。いざれも時宜を得た内容で読者の皆様には興味深く読んでいただけるものと思います。

現在、もっと面白く、もっと読みやすく目標に小誌の内容の見直しを行っております。ご意見等ありましたら、ご一報ください。

(原田 記)

##### ■インターネットホームページ

○(株)日立ハイテクノロジーズ

ライフサイエンス関連

URL : <http://www.hitachi-hitec.com/science/>

ナノテクノロジー関連

URL : <http://www.hitachi-hitec.com/em/>

■本ニュースに関するお問い合わせは、右記、または、(株)日立ハイテクノロジーズの上記各事業所へご連絡ください。

○(株)日立ハイテクノロジーズ 販売促進部  
〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14  
電話(03)3504-7811 FAX(03)3504-7756

○(株)日立ハイテクノロジーズ  
那珂アブリケーションセンタ  
〒312-0057 茨城県ひたちなか市石川町11-1  
電話(029)354-1970(代)

**HITACHI  
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS**  
**SEPTEMBER, 2005 VOL. 48 No. 2**

発行 2005年9月20日

編集人 原田 勝仁

発行人 小林 紀雄

発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ

〒105-8717

東京都港区西新橋1-24-14

電話(03)3504-7811(ダイヤルイン)

印刷 日立インターメディックス株式会社