

MARCH  
2006  
VOL.49 No.1

### 卷頭言

## 環境政策と技術

Environmental Policy & Technology

環境問題は現在3つのテーマが主柱となっている。1つは、地球温暖化と温暖化ガス、特に二酸化炭素発生の削減の問題であり、エネルギー問題と直接関わっている。

2つは、有害物質による環境汚染と人の健康の問題であり、

3つは、森林や野生生物を含めた生態系保全の問題である。

これらの3つの課題は、人類の生存基盤のサステナビリティを担保するものである。また直接的に或は経済や貿易を通して、相互に関連をもっており、地球全体のシステムに対する最適の解(地球的ソリューション)と局所的な最適解(地域的ソリューション)の両方が解決の上で必要である。そして多くは技術的な問題として解かれていく。

21世紀には、環境は社会の中核に入り、このような環境の問題は市場経済の中に折り込まれながら解決していくことになる。ところで生産活動と環境保全をどのように結びつくことになるのであろうか?法律的な規制で行うのか、経済的な手法で誘導されるのか、市民の意識により達成していくのか、いろいろな手法がある。いずれにしてもかつて成長の限界で指摘されたように、地球の有限性から来る制約下の中に人類の活動が

(独)国立環境研究所 客員研究官  
東京大学大学院工学系研究科  
博士課程修了

森田 昌敏



あるということに留意して対応する必要がある。また情報技術の急速な発展と共に経済変化の高速化が進んでおり、資本収益性の極大化を求めて進む資本や技術の寡占化等が、有限の資源の争奪に向かっている現代において、国益と世界平和の達成も最大の課題と言えよう。

化石燃料からのエネルギー抽出に伴なう大気中二酸化炭素濃度の増加が、地球温暖化と関連付けて語られている。その一方でエネルギー源の不足、中でも石油のショートは、今後50年間に必ず起こることであり、それに結びついての価格の高騰はすでに始まっている。石油の代替は、天然ガスと石炭(石炭液化を含めて)、そして原子力となるが、天然ガスやウラニウムも今世紀末にはまとまった資源としては存在しない。石炭も200年位あとには不足しあらじめる。エネルギー源の変換を考えるにしても、現在築き上げられた石油社会のインフラの価値を十分に考慮しておく必要がある。この点で現エネルギー源を大切に使いつつ、自然エネルギーの活用を広げることの重要性がある。我が国が火山列島の上にあることを考えると、今は下火になった感のある地熱エネルギーの活用拡大も視野にいれる必要があろう。エネルギー関連の技術革新のニーズは環境と関連してますます

### C O N T E N T S

#### ■卷頭言

- ・環境政策と技術  
森田昌敏 ..... 1
- 報文  
・質量分析法による糖鎖構造解析  
出口喜三郎／武川泰啓  
伊藤裕基 ..... 3
- ・ポリマー系固相抽出剤の開発と応用  
井上嘉則 ..... 8

#### ■解説

- ・L-8900形高速アミノ酸分析計  
伊藤正人／丸岡幹太郎  
久保善太郎／吉田昌明  
源 法雅／筒田恒治  
富田幸治／福田真人  
奥澤和彦 ..... 13
- ・F-7000形日立分光蛍光光度計  
江畠佳定 ..... 15

#### ■学会発表ミニファイル

- 新製品紹介  
・コロナグレーティングマイクロ  
プレートリーダSH-8000Lab ..... 19
- ・日立卓上遠心機CT6E/6EL ..... 19
- ・『平沼産業 塩分・酸度測定専用測定装置 新発売』 ..... 19
- ・F-7000形 日立分光蛍光光度計 ..... 20

大きくなっている。

有害物質による環境汚染問題については、人の健康被害を中心に日米欧の先進国において、いろいろな政策が取られてきている。かつて、反公害の高まりを受けて1971年の公害国会で多数の法律の成立と改正を行った日本は、1970年代半ばまで世界の先端にあった。やや遅れて、米国で生まれたマスキー法はその後の自動車産業に大きな影響を与え、日本車躍進の原因となっている。1980年代終わりごろから1990年代始め、リードしたのは米国カリフォルニア州であり、プロポジション65にみられるような有害物質規制の提案をしている。その思想は現状では技術的に困難という声があつても、高い目標(数値)を政策に掲げることにより、技術は追随し、目標は達成されるというものであり、一定の効果があつたことは事実であろう。石原慎太郎都知事のディーゼル車対策もこののようなアプローチに類似している。

現在の環境政策の先導役はヨーロッパになっている。ヨーロッパの最近のアプローチも技術誘導型の傾向がある。RoHS指令やREACHもその線上にあり、人の安全や生態系の保全のために、被害が起つてからではなく予防的に有害物質の利用を限定しようという目標設定は、具体的なアプローチはともかく、正しい方向であるといえよう。電機機器に適用されるRoHSも突然生まれたのではない。その前に、自動車の鉛含有規制などがある。また先の課題であるが、ディーゼル車からのナノ粒子も対策の必要性が指摘されている。

例えば、鉛について筆者の個人的体験がある。今から20年前、筆者らは、ICP発光分析を用いた多元素同時分析により、毛髪の分析を行っていた。毛髪中の鉛濃度はしばしば子供に高く、そのような児童は学習能力の発達が遅れると言われている。知人たちから子供の毛髪を集め分析した結果、幾人かの子供に比較的高濃度が見出され、私の息子もその内の一人であった。そこで、鉛の汚染ルートを探ろうとして、食事や室内環境などを調べたが、原因として辿りついたものは輸入品のおもちゃであった。2歳くらいまでの乳幼児は、オモチャをなめたり噛んだりしており、そこから溶出してしていくのである。当時すでに、日本の業界団体は、厚生省の指導もあって、幼児用玩具については食品容器と同じように、鉛を含まないように自主基準を適用していたのであるが、会員以外の業者(輸入品を含めて)の製品には適用されていなかったのである。ソニーのプレイステーションがカドミウムを含むとしてヨーロッパで問題になった時にこれは本機が玩具であるのか、一般的な電機製品であるかが判断の分かれどころであったとも聞くけれども、家庭内で子供が口にする

かもしれない有害物質をできるだけ少なくするべきだという考えに、異論を挟む親はないであろう。安全の問題は貿易戦争的一面を持つことは否定しきれないものの、環境安全を製品コンセプトに入るべき時代になってきたと言える。

REACHは、化学品の製造事業者に、その安全性試験のコストを負担させる仕組みである。化学品の有害性が後に示され、その補償に多額のお金を支出しないために、このような予防的措置は重要であるかもしれない。従来、政府が負担していたものを、少量多品種生産の化学品メーカーに負担させることがどの程度可能かは予期できないが、関連して生物試験が新たなビジネスになる可能性がある。

尚、有害物質対策として頭が痛いものとして、過去の汚染の修復がある。例えば重金属やダイオキシン汚染の土壤修復のコストは、我国のみで数兆円~十数兆円に達すると思われるし、これにアスベスト対策(1兆円?)、PCB汚染(1兆円?)などがある。安価で且つ周辺の住民に受け入れられる対策が求められている。

地球生態系の保全を考えるのであれば、世界人口の抑制こそ最重要との考えもある。ただ1種の生物種が地球を独占し、破壊していくのは困ったことである。人工衛星から、地球を観察することは、今では普通のこととなっている。森林破壊、砂漠化の進行ばかりでなく、道路の建設状況や車の走行状況、土地改善、農作物の作況、海の船舶の蛇行状況なども一目の元に見られるようになった。このような開発が、制限なく行われている状況は、地球生態系の破壊が留まることを知らないことを意味しよう。

いずれにしても、監視し、警告を出すことが、解決の出発点である。インターネットの発達により、情報や意見が瞬時に伝達され、世界の政府の政策決定に影響を与える時代になってきている。必要なコンテンツとして画像や観測値のデータがきめ細かく求められる。環境の計測、環境監視からパーソナルモニターに至るまで、その手法の更なる発展に期待したい。また環境ソリューション技術が産業技術の中核の一つとなり、我国の輸出産業として育って欲しいところである。

#### 著者略歴

##### 森田 昌敏

1944年生まれ。

東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。

昭和47年 東京都立衛生研究所 研究員

昭和53年 国立公害研究所(現在、国立環境研究所)主任研究員を経て計測技術部長、化学環境領域長を務める。

平成13年 独立行政法人 国立環境研究所 総括研究官。

現在、同研究所 客員研究官の他、国連大学 顧問、早稲田大学及び金沢工業大学の客員教授、NPO環境テクノロジーセンターの理事長を務める。

日本環境化学会 会長、日本内分泌搅乱化学物質学会 会長。

専門は分析化学、環境科学、環境毒性学。

U.D.C.543.51 : 547.963.1 : 547.476.6 : 544.126 : 577 : 543.54

## 質量分析法による糖鎖構造解析

Structural Analysis of Oligosaccharides using Mass Spectrometry

出口 喜三郎\* 武川 泰啓\*\* 伊藤 裕基\*\*\*



出口 喜三郎



武川 泰啓



伊藤 裕基

### 1. はじめに

2003年は、“ヒトゲノムシーケンス”が解読され生命科学にとって記念すべき年となった。そして、約25,000の遺伝子の転写翻訳により生体内で合成されるタンパク質や代謝物を網羅的に解析する“プロテオーム”や“メタボローム”的新たな幕開けともなった。ところで、タンパク質の半数以上(細胞表面では90%以上)は、糖鎖により翻訳後修飾され、糖タンパク質として存在していることをご存知だろうか? 糖鎖はタンパク質の構造の安定化や機能に直接関与しているのみならず、細胞間の接合や外部から進入するバクテリア、ウイルス、毒素などを認識し、その情報を伝達するアンテナ的役割も担っている。したがって、その機能の異常は癌など多くの疾病とも深く関わっている<sup>1)</sup>。また、タンパク質同様、糖鎖の構造と機能は密接に関連しているため、糖鎖構造解析はポストゲノム時代の重要な研究テーマの一つである。

生体内のタンパク質は、NMRやX線回折で構造解析できるほどの量(mg)を入手するのが困難な場合が多い。MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)<sup>2)</sup>やESI(Electrospray Ionization)<sup>3)</sup>を装備した種々のタイプの高感度質量分析計(MS)がタンパク質の同定やペプチドのアミノ酸配列(シーケンス)解析で大きな役割を担っている所以である。プロテオーム解析は、今や、質量分析法(MS)とデータベース検索でほぼルーチン化されていると言って良い。一方、糖鎖の分子量は数百~数千と小さいにも拘らず、迅速で高感度な構造解析法はまだ確立されていない。その最大の理由は、糖鎖特有のグリコシド結合の枝分かれやアノメリック( $\alpha$ ,  $\beta$ )結合による糖鎖構造の多様性にある。本報文では、最初に糖鎖構造解析の現状とその課題を概括し、我々がここ2~3年研究開発してきた“MS”スペクトルマッチング

法”によるMS糖鎖構造解析法の最近の成果について紹介したい。また、今後の展望についての私見も述べたい。

### 2. 糖鎖構造の多様性と構造解析の難しさ

図1は、構成单糖の異性体とそのグリコシド結合様式を示している。グルコース、ガラクトース、マンノースは、OH基の配向が異なる分子量180の異性体である。5個のOH基は等しくグリコシド結合する可能性を持つが、1位のOH基の結合には2つのアノメリック( $\alpha$ ,  $\beta$ )タイプがある。ある試算によれば、4糖鎖の構造異性体数は1,500万にもなるという<sup>4)</sup>。ちなみに、DNAの4塩基(A, T, G, C)の配列の組み合わせ数は $4^4 = 256$ であり、4アミノ酸(20種)の場合は $20^4 = 160,000$ である。実際には、全ての構造が存在するわけではないが、糖鎖構造の多様性は理解していただけだと思う。しかし、この多様性、即ち、構造異性

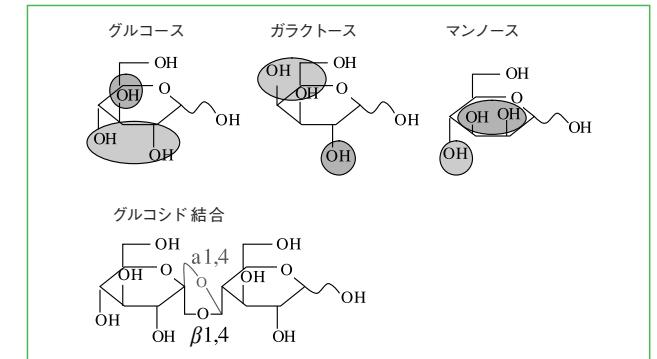


図1 構成单糖の異性体とアノメリック( $\alpha$ ,  $\beta$ )グリコシド結合

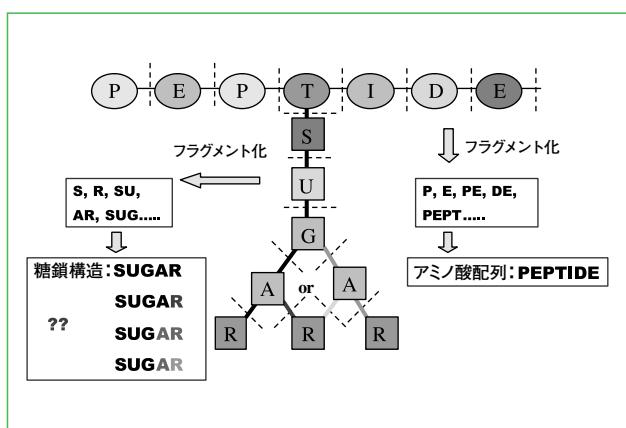


図2 ペプチドと糖鎖のMS/MS構造解析の違い  
ペプチドのアミノ酸配列は、MS<sup>2</sup>フラグメントから決定できる。  
多様な構造異性体が存在する糖鎖でも同様に可能だろうか？

体は、MSによる糖鎖構造解析を難しくしている最大の原因でもある。

図2は、糖ペプチドにおけるペプチドと糖鎖のMS/MS解析の違いを模式的に示している。MS/MS解析では、通常、HeやArガスによる衝突誘起解離で、分子イオンを断片(フラグメント)化する。幾つかのペプチド結合の断片(P, E, PE, DE, PEPT...)を検出できれば、元のアミノ酸配列(PEPTIDE)を決定できる<sup>5)</sup>。しかし、糖鎖の場合、同じようにフラグメントを検出できたとしても、枝分かれした構造のどれかを(図2では4種のみ表示)、単純に特定することはできない。この違いは、アルファベット文化と漢字文化の違いに匹敵するほどのものかもしれない。それでは、どのような方法が考えられるのか？現在、2つの方法が提案されている。(1)フラグメント数を増やし、構造異的なフラグメントのm/z値(質量と電荷の比)から構造を推論する。(2)フラグメントのm/z値と相対強度(%)の両方を構造情報として利用する。本報告では、後者の方法(MS<sup>n</sup>スペクトルマッチング法と呼ぶ)による構造異性体の識別と同定を議論するが、もちろん、二者択一ではなく、双方で補完しながらより確実に構造を推定するのが現実的である。

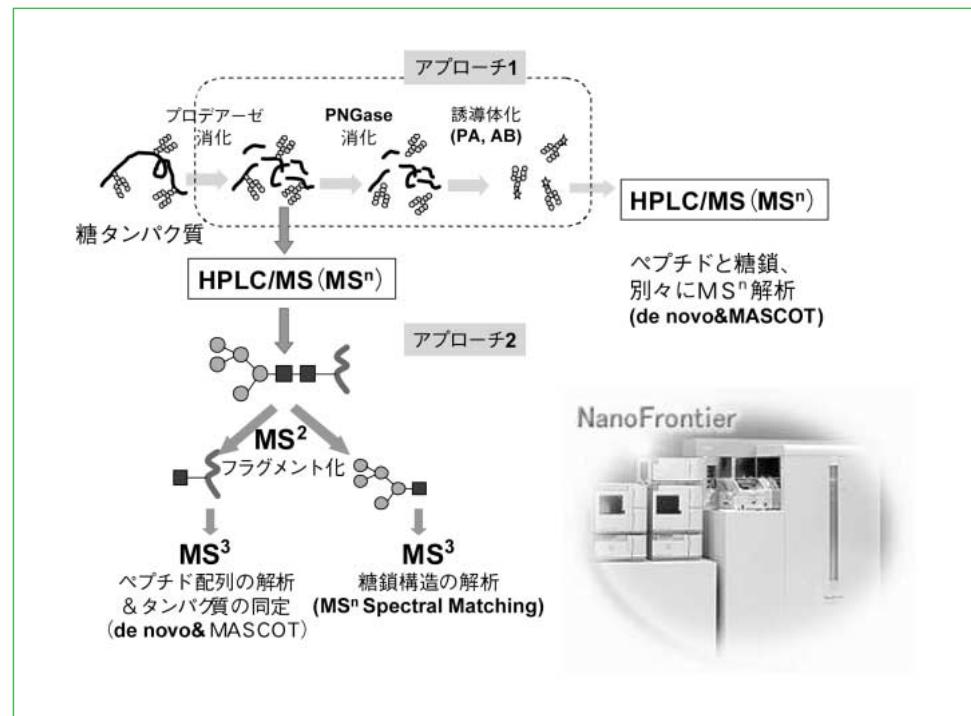


図3 HPLC/MS( MS<sup>n</sup> )によるN-型糖鎖構造解析の2つのアプローチ

### 3. MSによる糖鎖構造解析の現状：2つのアプローチ

図3は糖タンパク質分離後の糖鎖構造解析を図示している。アプローチ1では、プロテアーゼ消化された糖ペプチドを、更にPNGase酵素消化してN型糖鎖を切り出す(\*).その後、誘導体化(例えば、PA:2-アミノピリジン, AB:アミノベンズアミド)し、液体クロマトグラフィ(HPLC)分離とMS<sup>n</sup>解析を行う。アプローチ2は、プロテアーゼ消化された糖ペプチドを直接HPLCで分離し、MS<sup>n</sup>解析を行うものである。以下に、それぞれのアプローチでの糖鎖構造解析の例を記述する。

(\* )PNGase酵素はアスパラギン(N)に結合したN型糖鎖にのみ有効である。セリン/スレオニンに結合したO型糖鎖に対しては、ヒドラジン分解など化学的方法が用いられる。

#### 3.1 MS<sup>n</sup>スペクトルマッチング法による糖鎖構造解析(アプローチ1)

例えば、2つのUVスペクトルの一一致度(Spectral Matching)を評価する場合、“スペクトル角”(多次元空間における2個のベクトルの内積)や“相関係数”がよく用いられる。MS/MS(以後、MS<sup>2</sup>と表示)スペクトルに対しても適用可能であるが<sup>6)</sup>、2つの前提条件がある。(1)MS<sup>2</sup>スペクトルに再現性がある。(2)MS<sup>2</sup>スペクトルに糖鎖構造識別に十分な情報が含まれている。まず、これ

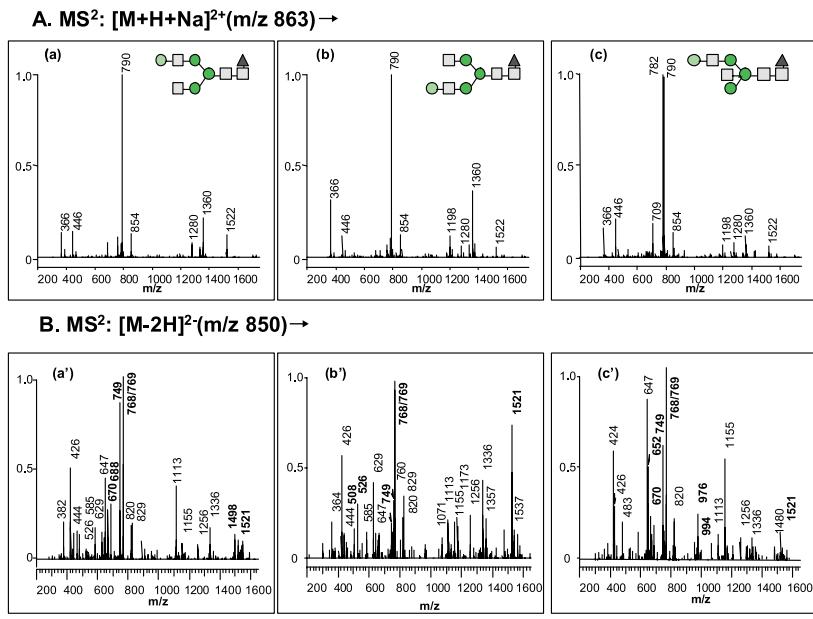


図4 ヒトIgG糖鎖異性体3種(Scheme 1)の正(A)負(B)イオンMS<sup>2</sup>スペクトルの比較  
正イオンモードでは、フコース脱離(m/z 790)が起こりやすい。

らの検証を、以下(Scheme 1)の3種の典型的なバイアンテナ構造のN-型糖鎖異性体で行ってみた<sup>7, 8)</sup>。

図4はイオントラップ(IT)型の質量分析計(日立M-8000形3DQ LC-MS)で測定した正(A)負(B)イオンMS<sup>2</sup>スペクトルである。また、表1には、それぞれのスペクトル間で計算された相関係数の平均値と標準偏差(SD)をまとめてある。これらの結果から、上記2条件はまずまず満たされているといつてよいだろう。ここで一つ注目すべき点は、正イオンでは糖鎖210.2と210.3の相関係数:0.928で識別が困難であったが、負イオンでは相関係数:0.606となり識別可能である。負イオンモードでは、フラグメント数が増えるのに加えて、フコースの脱離も起こり難いことが、相関係数による識別に有利に働いている。

図5はシアル酸の結合様式(a 2-3とa 2-6)の異なる4種のシアル酸糖鎖(Scheme 2)の負イオンMS<sup>2</sup>(上段)及びMS<sup>3</sup>(下段)スペクトルである。使用した装置は日立NanoFrontier(NanoLC/ESI-

IT-TOF-MS)である。データは示していないが、負イオンモードでは、MS<sup>1</sup>スペクトルでシアル酸脱離が起こらない。AとB及びCとDのMS<sup>2</sup>スペクトル相関は0.98と0.97となり、識別困難である。しかし、(A, B)と(C, D)間のMS<sup>2</sup>スペクトル相関係数は0.75(平均値)なので、シアル酸が上下どちらのアンテナについているかは識別可能である。一方、MS<sup>3</sup>スペクトルでは、B<sub>1</sub><sub>β</sub>とB<sub>3</sub><sub>β</sub>のイオン強度が全く反対のパターンを示すことから、シアル酸の結合様式(a 2-3とa 2-6)は識別できる。このようにMS<sup>2</sup>及びMS<sup>3</sup>スペクトルマッチングの組み合わせにより、4種のN-型モノシアリル糖鎖異性体を完全に識別することが可能である<sup>9)</sup>。

図4, 5で用いたサンプルは、PA標識化した後、HPLCで分離精製されたものである。実際には、多成分が混合したサンプルをLC-MSで分離しながら検出同定しなければならない。ヒトIgG(免疫グロブリンG)や血清由来の糖鎖の一斉分析でも、MS<sup>n</sup>スペクトルマッチング法が有効であることが検証されている<sup>10, 11)</sup>。また、ヒトIgG由来の中性糖鎖は16種類であるといわれていたが、“17番目”的新規糖鎖があることが分かり、その構造解析に本方法が有効であった<sup>12)</sup>。

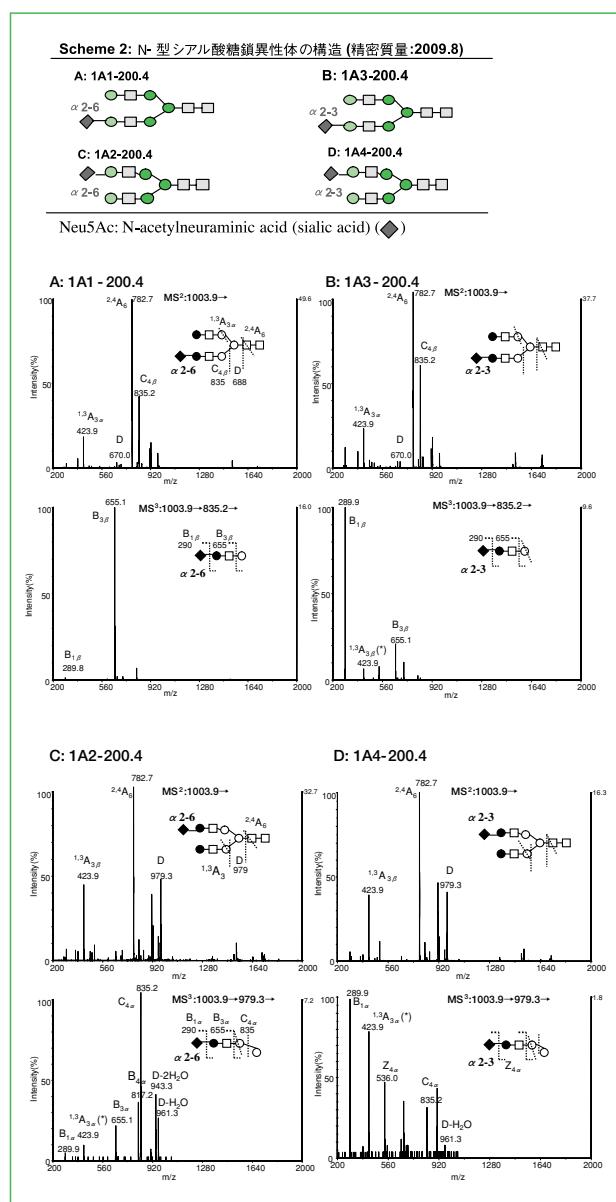
#### 3.2 糖ペプチドの直接解析への試み(アプローチ2)

分析対象の糖タンパク質の微少量化に伴い、糖鎖のみを切り出し精製した後、MS測定することは一層困難になる。できればトリプシン消化した

表1 IgG糖鎖異性体のMS<sup>2</sup>スペクトル相関係数

	210.2 平均値 / SD	210.3 平均値 / SD	111.3 平均値 / SD
210.2 負イオン (正イオン)	<b>0.977 / 0.007</b> (0.995 / 0.002)		
210.3 負イオン (正イオン)	<b>0.606 / 0.046</b> (0.928 / 0.018)	<b>0.948 / 0.023</b> (0.991 / 0.004)	
111.3 負イオン (正イオン)	<b>0.712 / 0.054</b> (0.556 / 0.042)	<b>0.372 / 0.081</b> (0.617 / 0.038)	<b>0.931 / 0.027</b> (0.992 / 0.002)

平均値、標準偏差(SD)は異なる日時で収集された5回のデータの計算値。



AとBおよびCとDは $MS^2$ スペクトル相関では識別困難だが、 $MS^3$ スペクトルで識別できる。(A, B)と(C, D)間の識別は、 $MS^2$ スペクトル相関で可能。

糖ペプチドを直接MS解析する方が有利である。しかし、異性体糖鎖が付いた糖ペプチドを直接解析するには、LCによる糖ペプチド(異性体)の分離も同時に必要がある。そこで、我々は、高感度なプロテオーム解析を目標に開発されたNanoLC/ESI-IT-TOF-MS<sup>13-15)</sup>による糖ペプチドの直接解析を試みている。手順は次のとおりである。(1)トリプシン消化されたペプチドと糖ペプチドを直接NanoLC部に導入し、異性体を分離する。(2)糖ペプチドの多価イオン( $z=2, 3$ )をプレカーサーイオンとして選択し、糖鎖の一部(GlcNAc)がペプチド側に残るように、かつ、糖鎖と

ペプチドに電荷が分配されるように、低エネルギー-CID条件を最適化する。(3)得られたペプチドイオンと糖鎖イオンの $MS^3$ スペクトルから、ペプチドシーケンス解析(糖鎖結合位置も含めて)と糖鎖構造解析を行う。

図4はリボヌクレアーゼB(RNase B)の糖ペプチドを上記の手順で収集した $MS^n$ ( $n=1, 2, 3$ )スペクトルである。(A)の $MS^1$ スペクトルで選択された糖ペプチドの2価イオン $[M+2H]^{2+}$ ( $m/z$  846.4)は、(B)の $MS^2$ スペクトルで、1糖(GlcNAc)付きのペプチド( $m/z$  678.4)と残りの糖鎖部分( $m/z$  1014.5)のフラグメントになっている。(C), (D)は、これらのフラグメントから得られた $MS^3$ スペクトルである。(C)からペプチドのアミノ酸配列(NLTK)が容易に決定できる。また、糖鎖の結合位置がN(アスパラギン)であることも分かる。また、(D)の各糖鎖フラグメントイオンも容易に帰属できる。

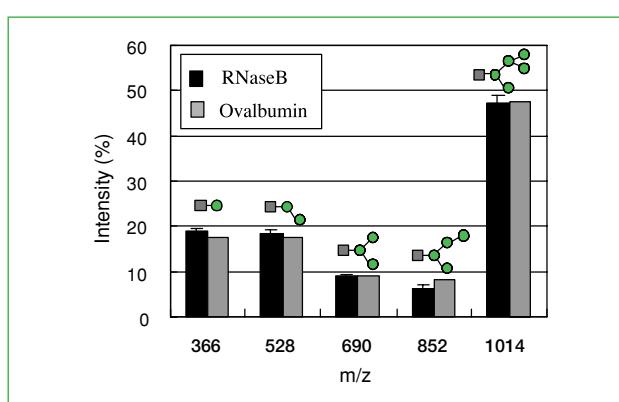
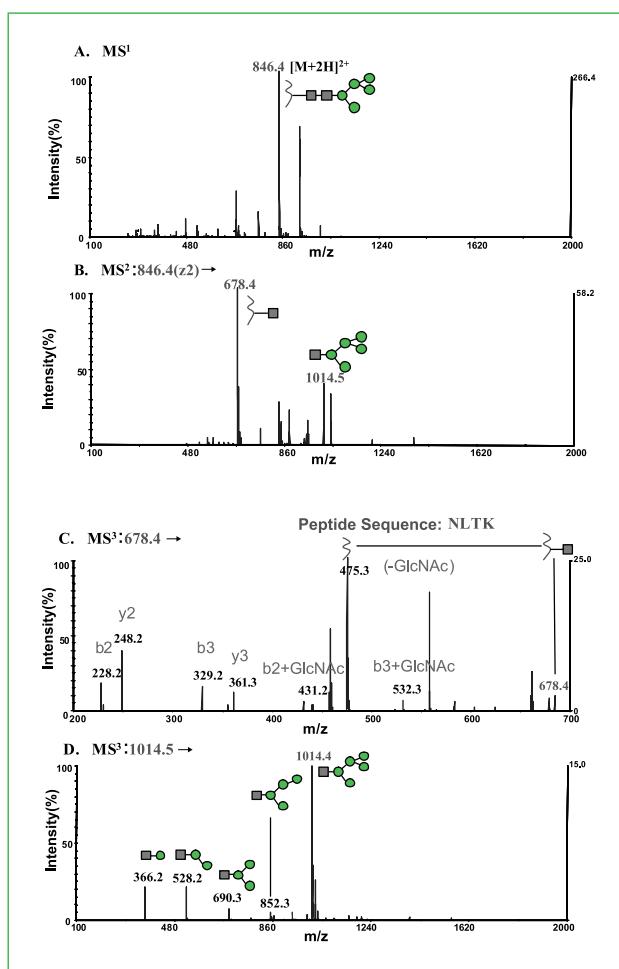
しかし、この段階では糖鎖構造を決定したことはならないので、上記の $MS^n$ スペクトルマッチング法が適用できるかを調べてみた。図5はその結果である。エラーバーは標準偏差(SD)を示しており、図4Dの $MS^3$ スペクトルは再現性があることが分かる。更に、オバルブミン(Ovalbumin)由来の糖ペプチド(アミノ酸配列:NLTSVL)から得られた糖鎖フラグメントの $MS^3$ スペクトルとも、非常によく一致している。ここでは1例を示したに過ぎないが、卵黄やヒトIgG由来の糖ペプチドなどでも期待どおりの結果が得られている。

#### 4. おわりに

紙面の都合上、糖ペプチドの直接構造解析に対する他のアプローチについて言及できなかった。本稿で述べたHeガスを用いる低エネルギー-CIDだけでなく、MALDI<sup>16)</sup>, MALDI-CID<sup>17)</sup>, IRMPD (Infrared Multiphoton Dissociation)-ECD (Electron Capture Dissociation)<sup>18)</sup>などを用いた方法が報告されている。どのような方法が最も有効かは、現段階では予断を許さないが、糖鎖構造解析では異性体の識別ができるることは必須条件である。MSも広い意味では分離分析あるが、複数の異性体が混在した状態では、MS解析は一層困難になる。従って、クロマトグラフィや電気泳動などの分離分析法との組み合わせが必要である。この観点から、4節で述べたNanoLC/ESI-IT-TOF-MSによる糖ペプチドの直接解析は、今後ますます重要ななると思っている。

#### 文献

- R. A. Dwek, Chem. Rev., 96, 683 (1996).
- K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 151, (1988).
- J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Science, 246, 64 (1989).
- T. Meder, SCIENTIFIC AMERICAN, July (2002).
- K. Yoshino, N. Oshiro, C. Tokunaga, K. Yonezawa, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 52, 106 (2004).
- B. Mulroney, J. C. Traeger, B. A. Stone, J. Mass Spectrom., 30, 1277 (1995).
- Y. Takegawa, S. Ito, S. Yoshioka, K. Deguchi, H. Nakagawa, K. Monde, S-I. Nishimura, Rapid Commun. Mass Spectrom., 18, 385 (2004).
- Y. Takegawa, K. Deguchi, S. Ito, S. Yoshioka, H. Nakagawa, S-I. Nishimura, Rapid Commun. Mass Spectrom., 19, 937 (2005).
- K. Deguchi, Y. Takegawa, S. Ito, S. Nagai, S. Yoshioka, H. Nakagawa, S-I. Nishimura, Rapid Commun. Mass Spectrom., 20, 412 (2005).
- Y. Takegawa, K. Deguchi, S. Ito, S. Yoshioka, A. Sano, K. Yoshinari, K. Kobayashi, H. Nakagawa, K. Monde, S-I. Nishimura, Anal. Chem., 76, 7294 (2004).
- Y. Takegawa, K. Deguchi, S. Ito, S. Yoshioka, H. Nakagawa, S-I. Nishimura, Anal. Chem., 77, 2097 (2005).
- Y. Takegawa, K. Deguchi, H. Nakagawa, S-I. Nishimura, Anal. Chem., 77, 6062, (2005).
- K. Deguchi, S. Ito, S. Yoshioka, I. Ogata, A. Takeda, Anal. Chem., 76, 1524 (2004).
- Y. Hashimoto, I. Waki, K. Yoshinari, T. Shishika, Y. Terui Y, Rapid. Commun. Mass Spectrom., 19, 221 (2005).
- S. Ito, S. Yoshioka, I. Ogata, E. Yamashita, S. Nagai, T. Okumoto, I. Ishii, M. Ito, H. Kaji, K. Takao, K. Deguchi, J. Chromatogr. A, 1090, 178 (2005).
- M. Kurogochi, S-I. Nishimura, Anal. Chem., 76, 6097 (2004).
- Y. Fukuyama, Y. Wada, Y. Yamazaki, N. Ojima, M. Yamada, K. Tanaka, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 52, 328 (2004).
- K. Hakansson, M. J. Chalmers, J. P. Quinn, M. A. McFarland, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, Anal. Chem., 75, 3256 (2003).



#### 謝辞

本稿の研究は、北海道大学大学院理学研究科西村研究室の皆様と(株)日立ハイテクノロジーズの多くの技術者の協力を得てなされたものである。心から感謝申し上げます。

U.D.C.543.07 : 687.746.2-19 : 544.722 : 543.544.15 : 661.7 : 661.183.7

# ポリマー系固相抽出剤の開発と応用

井上 嘉則\*

**1. はじめに**  
近年の科学技術の進歩に伴い、分析機器の進歩も著しく、ng/Lレベルの極微量の化学物質の測定が可能となった。しかし、高度な分析機器を用いたからといって、信頼性のある結果が得られるわけではない。試料中に共存成分が多種・多量に存在すると、対象成分に対する特異性や選択性を低下させたり、ある種の共存成分があたかも対象成分であるというような応答を示すことがある。従って、信頼性の高い分析結果を必要とするのであれば、共存成分の影響を低減するための何らかの前処理が必須となる。

前処理の第一の目的は、使用する分析手法に適応できるような状態にすることである。例えば、HPLCを用いる場合には試料は液体でなければならぬため、溶解、ろ過、抽出等の操作が必要となる。第二の目的は、試料中の共存成分が対象成分の測定に影響を与えないようにすることである。共存成分の除去が不十分であると、HPLCやGCの場合にはピークのオーバーラップ、ICP-AESやICP-MSの場合には分光学的干渉や減感等の問題が生じる。

前処理には種々の操作が用いられるが、生体試料や環境試料のような高度に共存成分を含む試料の場合には、抽出、クリーンアップ、脱塩等の工程が重要である。従来、これらの工程では有機溶媒を用いる液-液抽出が用いられてきたが、再現性や選択性、さらに塩素系有機溶媒による環境汚染の問題等から、近年は固相抽出法に移行しつつある。

固相抽出法は、農薬をはじめとする有機物の前処理手法として定着しつつあるが、昨年、新規なキレート型固相抽出剤<sup>1)</sup>が日立ハイテクノロジーズより発売され、金属元素の前処理においても有効な手法であることが示された。本稿では、固相抽出法の概要について述べると共に、ポリマー系

固相抽出剤の開発と応用  
に関する筆者の経験を基に記述する。

## 2. 固相抽出法(Solid Phase Extraction: SPE)

### 2.1 基本操作

固相抽出法とは、固相と液相との間の相互作用による物理的抽出方法で、図1左に示すような固相抽出剤が充てんされた小容量のカートリッジを用いる。カートリッジ形状、容量、固相抽出剤の種類、充てん量等種々のものが市販されている。

固相抽出法の基本操作は、『コンディショニング』、『捕捉』、『洗浄/乾燥』そして『溶出』の4つの工程からなる(図1)。この内、『捕捉』と『溶出』の工程は、特に重要な工程である。『捕捉』工程では、固相抽出剤への親和性を利用して対象成分を捕捉させる。ここで用いられる捕捉機構は、吸着、分配、イオン交換等である。固相抽出剤への親和性が高い共存成分は対象成分と共に捕捉されるが、親和性が低い共存成分は捕捉されることなく排出される。『溶出』工程では、捕捉された対象成分の脱離を行う。適切な溶離液を選択すれば不要の共存成分との分離を行うことができるが、次工程を十分考慮しなければならない。濃

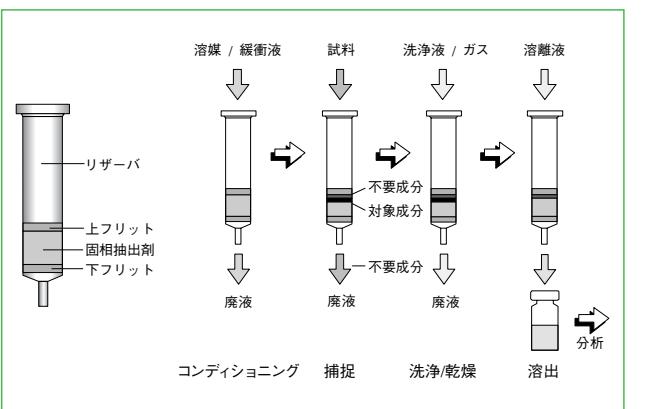


図1 固相抽出カートリッジと固相抽出法の基本的工程

報文：ポリマー系固相抽出剤の開発と応用

縮・乾固が必要な場合には、揮発性が高く水と混和しない溶媒が好ましい。また、分析手法との兼ね合いも重要で、例えはHPLCを用いる場合には移動相と十分混和する溶媒でなければならない。

固相抽出法の最大の特長は、『使用溶媒の制限が少なく適用範囲が広い』、『抽出の選択性を容易に変化させることができ』という点である。液-液抽出法では、水試料中の成分をメタノールで抽出することは困難で、一旦水と混和しない溶媒で抽出後、試料を乾固し、メタノールに溶解するといった手順が必要である。一方、固相抽出法では、固相抽出剤との相互作用により水試料から対象成分を抽出後、対象成分をメタノールで溶出させればよい。この方法は、工程も簡便であり、試料の損失・変性や精製率の低下等の問題が発生する可能性は低い。その他の特長としては、簡便性、迅速性、溶媒の低減、高回収率、高精度等があげられる。また、安全性、自動化、コスト等の面でも、液-液抽出法よりも優れている。

### 2.2 固相抽出剤

固相抽出法で最も広く利用されているのは逆相分配モードである。表1に、代表的な逆相分配型固相抽出剤とその基本構造を示す。逆相分配型固相抽出剤は、シリカ系とポリマー系に大別される。シリカ系固相抽出剤はHPLC用充てん剤と同様で、シリカゲルに疎水基を化学結合したものである。この内、ODSシリカゲルが最も広く使用されている。ポリマー系固相抽出剤もHPLC用充てん剤から派生したもので、ポリスチレンゲルはゲル浸透クロマトグラフィー用充てん剤と同様である。当初はポリスチレンゲルが使用されたが、最近は親水性モノマーとの共重合型であるコンビネーション型が主流になりつつある。

ポリマー系固相抽出剤の特長は、高捕捉力、高負荷量で、高濃度共存成分を含む試料、大量試料処理に有効である。また、シリカ系固相抽出剤は、アルカリ性で溶ける、強酸性でアルキル鎖の切断が生じる等の問題があるが、ポリマー系固相抽出剤は耐酸・耐アルカリ性であるため、試料液性の影響を受け難く安定した抽出が可能である。このような特長により、ポリマー系固相抽出剤が急速に広がりつつある。

一般的な固相抽出剤の粒子径は30~120μmであるが、少量試料でかつ分離能を要求される場合には30μm程度の固相抽出剤が、試料量が多い場合には100μm程度の固相抽出剤が用いられる。一般

表1 市販逆相分配型固相抽出剤の種類と基本構造

基材	固相抽出剤	基本構造
シリカ系	C <sub>18</sub> (ODS)	<chem>R-O-Si(R)(R)-C18H37</chem>
	C <sub>8</sub> (Octyl)	<chem>R-O-Si(R)(R)-C8H17</chem>
	C <sub>4</sub> (Butyl)	<chem>R-O-Si(R)(R)-C4H9</chem>
	C <sub>1</sub> (TMS)	<chem>CH3-O-Si(CH3)(CH3)-</chem>
	Ph(Phenyl)	<chem>R-O-Si(R)(R)-C6H5</chem>
ポリマー系	ポリスチレン(PS, SDB)	<chem>-C-C-C-C-</chem> <chem>  </chem> <chem>-C-C-</chem> <chem>  </chem> <chem>-C-C-C-C-</chem> <chem>  </chem> <chem>-C-C-C-C-</chem>
コンビネーション型 (親水基導入型疎水性樹脂)		<chem>-C-C-C-C-</chem> <chem>  </chem> <chem>-C-C-C-C-</chem> <chem>  </chem> <chem>O=C-N(R)-C(=O)-</chem>

に、粒子状の固相抽出剤が用いられるが、ディスク型やモノリス型の固相抽出剤も市販されている。

## 3. ポリマー系固相抽出剤の開発

### 3.1 ポリマー系多孔質粒子の調整

固相抽出剤用の多孔質粒子は懸濁重合法によって合成される。単官能モノマーと多官能モノマーの混合溶液を水中に分散させ重合反応を行う。多官能モノマーの橋かけ反応によって不溶性の樹脂粒子ができる。懸濁重合時に、モノマーを溶解するが生成ポリマーを溶解しない反応性のない溶媒(細孔調節剤)を混合しておくと、細孔が形成される<sup>2), 3)</sup>。図2に多孔質ポリスチレンゲルの電子顕微鏡写真を示す。細孔調節剤の種類を変化させることで、数nm~数百nmの細孔を調節可能である。

### 3.2 固相抽出剤の設計要件

ポリマー系固相抽出剤として真っ先に市販されたものは、ポリスチレンゲルである。ポリスチレンゲルはODSシリカゲルよりも疎水性が高く、水試料中の広範囲な有機化合物を抽出可能で、かつメタノールやアセトニトリルで容易に溶出可能である。しかし、撥水性が強いため、細孔内部まで水が浸透することができず、回収率が低い場合も多い。コンディショニングの方法を工夫することによりある程度回収率を改善できるが、個人差

\* 大阪市立大学大学院医学研究科産業医学分野  
非常勤講師 工学博士

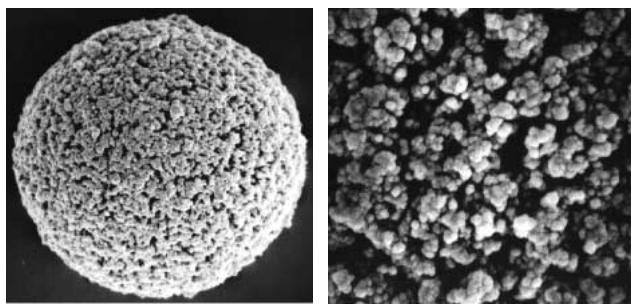


図2 ポリマー系多孔質粒子の電子顕微鏡写真

が出やすく、極性成分の回収率が変動するといった問題が指摘されている。

コンビネーション型はこのような問題に対して開発されたもので、疎水性と親水性のモノマーを共重合させた多孔質粒子である。親水基の導入により撥水性が低減されると共に、細孔内部まで親水基が存在するため有効表面積を大幅に増加させることが可能である。これにより、コンディショニングに過剰な神経を使わないので済むようになり、回収率、再現性といった点で大幅に改善される。

表2に種々の逆相分配型固相抽出剤を用いたときの水中農薬の回収率を比較した例を示す。コンビネーション型では全ての農薬を高い回収率で再現性良く回収することができているが、ODSシリカゲルでは、親水性の高いasulamの回収率が非常に低い結果となった。このときの通過液をコンビネーション型で再濃縮したところ82.3%が回収され、捕捉されずに通過していることが判った。oxine-Cuも回収率が低かったが、通過液からは2.3%しか回収されなかった。これは、シリカゲル中に存在する金属とoxineが強い錯体を形成したため、溶離されなかつたものと推定される。ポリスチレンゲルでもasulamの回収率は低かったが、oxine-Cuの回収率は90%以上であった。

以上の結果は、逆相分配型固相抽出剤において親水基の存在が重要であることを意味している。また、oxine-Cuの問題は、基材や残留物等に起因する二次効果相互作用が測定結果に大きく影響する恐れがあることを示唆しており、固相抽出剤開発における重要検討課題の一つである。

ポリマー系逆相分配型固相抽出剤開発における検討因子とその影響に関して表3にまとめた。固相抽出剤の基礎設計においては、捕捉機構、捕捉力に直結する基材と官能基の種類および官能基の導入量の検討が重要である。これらはHPLC用充てん剤の基礎設計と同様であるが、固相抽出法は大気圧下で、親和性の低い液性の試料を大量に取

り扱うため、固相抽出剤固有の設計が必要である。最も重要な検討項目は、既に述べた濡れ性の改善と有効表面積の問題である。また、共存成分の分子サイズや存在量によって、細孔径も検討すべき重要な因子となる。

### 3.3 水酸基を導入した新規逆相分配型固相抽出剤

逆相分配型固相抽出剤では、その高い捕捉特性と比表面積を有効に利用するために親水基の導入が不可欠である。昨年、日立ハイテクノロジーズにより商品化されたNOBIAS RP-SG1, RP-OD1は、疎水基と親水基とのバランスを十分考慮し設計されている。これらの基本構造を図3に示す。

NOBIAS RP-SG1はいわゆるコンビネーション型の固相抽出剤であるが、ポリスチレン骨格に基づく撥水性を改善するため、ジオール型水酸基を有するメタクリレートが配合された共重合体である。この水酸基は細孔内部にも存在し、水との濡れ性の改善による有効表面積の増加に大きく寄与している。

一方、NOBIAS RP-OD1はポリマー版ODSといった構造である。NOBIAS RP-SG1のような明確

表2 異なる逆相分配型固相抽出剤における農薬の回収率

農薬	ODSシリカゲル	ポリスチレンゲル	コンビネーション型	
	回収率 [%]	回収率 [%]	回収率 [%]	RSD [%]
asulam	<b>8.1</b>	<b>55.7</b>	102.6	1.2
oxine-Cu	<b>17.3</b>	90.7	98.2	2.9
mecoprop	92.0	99.5	100.6	3.3
thiram	93.9	96.9	100.1	2.0
iprodione	87.7	97.2	96.3	1.8
bensulide	88.6	95.8	102.6	3.0

表3 ポリマー系逆相分配型固相抽出剤開発における検討因子と影響

因子	影響
基材の種類	機械的強度、膨潤・収縮性、試料溶液への濡れ性、pH範囲等に影響する。特異的官能基や不純物が二次効果相互作用を引起する。
官能基の種類	捕捉特性に影響する。見掛けの疎水性が同一であっても官能基により捕捉特性は変化する。例えば、芳香環やニトロ基はπ-π相互作用を示す。官能基の導入方法によっても捕捉特性は変化する。
官能基の導入量	捕捉力に影響する。二次反応により官能基を導入する場合には、導入方法、導入密度により捕捉特性が変化する。未反応官能基は二次効果相互作用を引起する。
細孔径	捕捉に寄与する有効表面積に影響する。対象成分が十分に浸透可能な細孔径を持っている必要がある。除去したい共存成分により細孔径を変化させる必要がある。非多孔質のものも有効な場合がある。
比表面積	対象成分が相互作用可能な面積に相当し、捕捉力に影響する。一般に、細孔径が小さいほど比表面積は大きくなる。有効表面積は対象成分の分子サイズ、試料液性によって変化する。
細孔容積	捕捉力や捕捉特性には大きな影響を与えないが、固相抽出剤の充てん量に影響する。

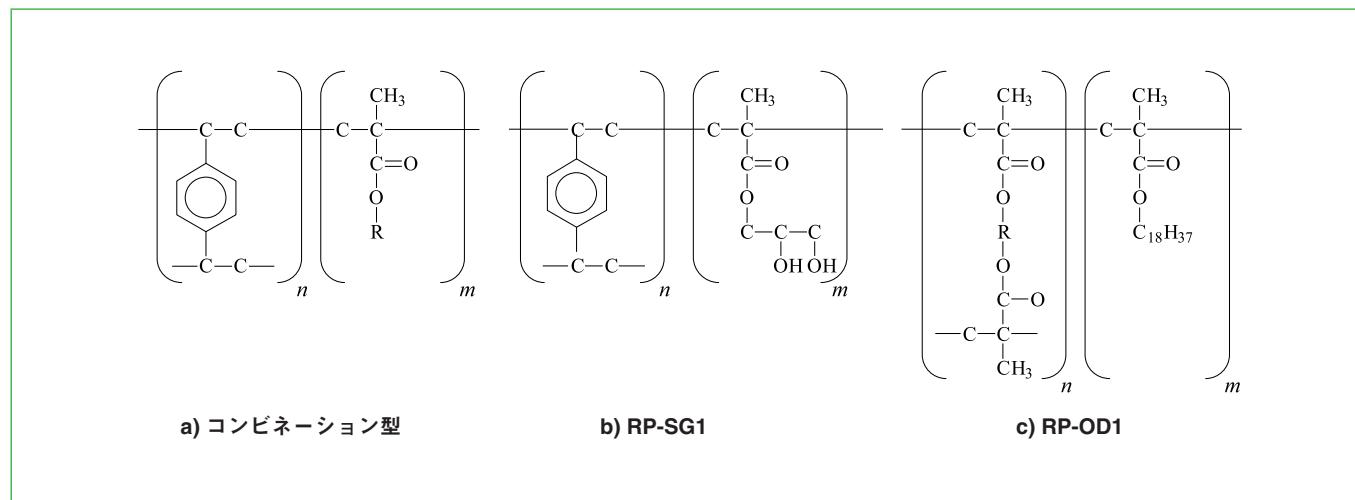


図3 新規逆相分配型固相抽出剤の基本構造(NOBIAS RP-SG1, OD1)

な親水基は有していないが、基材樹脂骨格が親水性のメタクリレートであるため、ODSシリカよりも良好な濡れ性を示す。また、疎水性官能基がアルキル鎖であるため、ODSシリカと同様、比較的単純な疎水性相互作用により捕捉するという特長を持つ。

表4にNOBIAS RP-OD1による水道水中的アルキルベンゼンスルホン酸の測定例を示す<sup>4), 5)</sup>。水道水質基準の試験方法に準じて前処理を行った後、HPLC-蛍光検出法により測定した。2種の水道水ともμg/Lレベルのアルキルベンゼンスルホン酸が検出された。水道水Bに標準試料を添加した検液の添加回収率は95%以上と良好で、RSDも5.5%以下であった。

### 3.4 イオン排除機能を有する新規キレート型固相抽出剤

ポリスチレンゲルにイミノ二酢酸(IDA)基を導入したキレート樹脂は、遷移金属の捕捉・濃縮に広く利用されている。しかし、海水のようにアルカリ金属、アルカリ土類金属を多量に含む試料の場合には、回収率が変動する、捕捉後の抽出液にこれらの金属が高度に残存するという欠点が指摘されている。特に、アルカリ土類金属は錯形成機構により捕捉されているため固相抽出剤からの洗浄が難しく、ICP-MS等の測定において干渉を引き起す原因となる。

上記の問題を解消するため、イオン排除機能を併せ持つ新規なキレート型固相抽出剤が開発された<sup>1)</sup>。昨年、日立ハイテクノロジーズにより商品化されたNOBIAS Chelate-PA1, Chelate-PB1の基本構造を図4に示す。Chelate-PA1とChelate-

PB1の違いは基材樹脂の疎水性で、Chelate-PB1のほうが疎水性の高い基材樹脂を用いている。官能基は、両者共ジエチレントリアミン三酢酸とイミノ二酢酸の混合型(PAPC型と呼ぶ)である。この樹脂を酸性条件下で操作するとイミノ基の解離が起こり、強陽イオン性金属はイオン排除効果により、樹脂に捕捉されることなく排除されてしまう。この機能によりアルカリ金属、アルカリ土類金属の影響を受けずに遷移金属を捕捉することが可能となる。

図5に市販IDA型と新規PAPC型キレート樹脂の捕捉特性比較を示す。特筆すべき点は、カルシウムの捕捉特性で、IDA型ではpH3.5でほぼ100%捕捉されてしまうが、イオン排除機能を有するPAPC型ではpH6.5まで捕捉されることはない。実際に海水試料の処理を行い、捕捉後の溶出液中のナトリウムとカルシウムの濃度を測定したところ、IDA型ではそれぞれ16.4mg/Lおよび35.4mg/Lであったのに対して、イオン排除機能を有するPAPC型ではそれぞれ0.00mg/Lおよび0.02mg/Lであった。

NOBIAS Chelate-PA1を用いた標準河川水およ

表4 NOBIAS RP-OD1による水道水中的界面活性剤の測定

LAS	測定値[mg/L] <sup>1)</sup>		添加回収率 <sup>2)</sup> [%]	RSD <sup>2)</sup> [%]
	水道水 A	水道水 B		
C10BS	0.0006	0.0002	96.0	5.59
C11BS	0.0013	0.0004	100.0	2.77
C12BS	0.0007	0.0003	98.7	4.00
C13BS	0.0003	ND	96.5	4.08
C14BS	ND	ND	95.2	4.51
Total	0.0029	0.0009	-	-

1) HPLC-蛍光検出法で測定（日立ハイテクノロジーズ製L-2000 HPLC + L-2480 蛍光検出器）  
2) 各0.04mg/Lを水道水Bに添加して試験

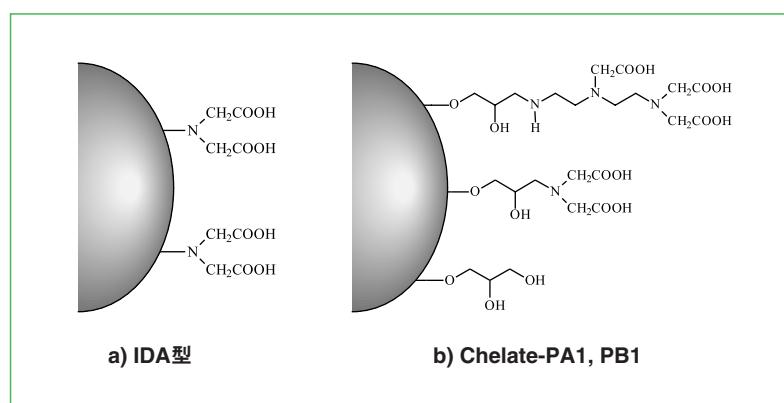


図4 新規キレート型固相抽出剤の基本構造(NOBIAS Chelate-PA1, PB1)

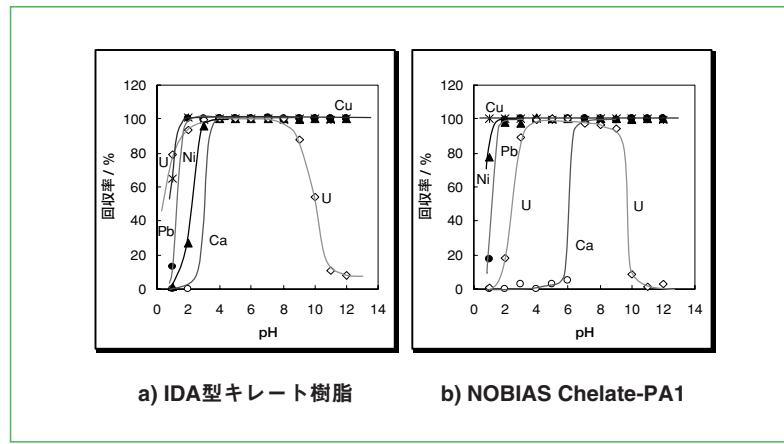


図5 IDA型とPAPC型キレート樹脂の金属捕獲特性

び標準海水中の金属の測定結果を表5に示す。溶出液中にカルシウムがほとんど含まれないため、分子イオン干渉が問題となる鉄やニッケルをはじめ、何れの金属も認証値の範囲内の値を得ることができた。

#### 4. おわりに

本稿では、筆者の経験を基にポリマー系固相抽出剤の開発に関して記述した。固相抽出法は環境適合性という点も含め市民権を得て急速に普及し

表5 NOBIAS Chelate-PA1による標準河川水および標準海水の測定例

元素名	標準河川水 (NRC・CNRC SLRS-4)		標準海水 (NRC・CNRC CASS-4)	
	認証値	測定値 <sup>1)</sup>	認証値	測定値 <sup>1)</sup>
V	0.32±0.03	0.34±0.01	-	-
Mn	3.37±0.18	3.19±0.02	2.78±0.19	2.68±0.14
Fe	-	-	0.713±0.058	0.674±0.058
Co	-	-	0.026±0.003	0.023±0.002
Ni	0.67±0.08	0.67±0.01	0.314±0.030	0.319±0.012
Cu	1.81±0.08	1.77±0.01	0.592±0.055	0.550±0.023
Zn	0.93±0.10	1.02±0.01	0.381±0.057	0.377±0.037
Mo	0.21±0.02	0.19±0.01	8.78±0.86	8.42±0.48
Cd	-	-	0.026±0.003	0.023±0.006

1) 日立ハイテクノロジーズ製P-6000 MIP-MSで測定

つつあるが、肝心の固相抽出剤に関しては未完成で、依然発展途上のものである。今後も化学分析における信頼性の要求は高まっていくものと思われ、ニーズの変化や対象試料の拡大に適合する固相抽出剤の開発が必要となると思われる。クロマトグラフィー用充てん剤の延長ではなく、固相抽出法独自の視点から新規な基材や官能基の開発が望まれる。

#### 引用文献

- 1) 山本和子, 坂元秀之, 白崎俊浩, 小野哲義, 世津育明, 小沼哲昭, Hitachi Scientific Instrument News, Vol. 47, No.1, p.25 (2004).
- 2) J.C. Moore, J. Polym. Sci., A-2-10, 835 (1964).
- 3) J.C. Moore, J. Polym. Sci., C-8, 233 (1965).
- 4) 石川昌子, 松 彩子, 岩渕等, 白崎俊浩, 小野哲義, 井上嘉則, 第66回分析化学討論会, P2043, p.22, (2005).
- 5) 松 彩子, 石川昌子, 岩渕等, 白崎俊浩, 三浦順吉, 井上嘉則, Separation Sciences 2005, P-28, p.66, (2005).
- 6) 山本和子, 坂元秀之, 三浦和代, 米谷明, 白崎俊浩, 三浦順吉, 井上嘉則, 分析化学会第53年会, A1009, p. 3, (2004).
- 7) 坂元秀之, 山本和子, 三浦和代, 米谷明, 白崎俊浩, 三浦順吉, 井上嘉則, 分析化学会第53年会, A1010, p. 3, (2004).

U.D.C.543.544.14 : 681.3.02 : 543.645.6 : 547.96 : 611.745 : 577.112.38

## L-8900形高速アミノ酸分析計

HITACHI Model L-8900 High Speed Amino Acid Analyzer

伊藤 正人\* 丸岡 幹太郎\* 久保 晋太郎\* 吉田 昌明\*\* 源 法雅\*  
筒田 恒治\* 富田 幸治\* 福田 真人\* 奥澤 和彦\*

#### 1. はじめに

アミノ酸は、たんぱく質の構成分子として20種類存在する。血液・尿などの生体液中にも40成分以上のアミノ酸類縁物質が含まれている。日立アミノ酸分析計は1962年発売当時よりニンヒドリン反応検出方式を用いるイオン交換クロマトグラフィー専用分析装置としてユーザーにより常に高い性能が望まれてきた。特に正確な定量値を追求する医薬品・食品・飼料の研究・品質管理部門から高精度・高分離・高速化が常に要求されてきた<sup>1)</sup>。昨今では、健康サプリメントの成分分析や呈味の研究など新しいアミノ酸関連物質の分析ニーズも広がっている。

またユーザー層からは分析装置をまず簡単に操作できるようにして欲しいという要求もある。分析装置は各方面からの要望に応えるべく様々な機能を搭載するように発展してきた。しかしこの多

様性という特徴はその反面、簡単に操作したいユーザーや初心者にとって多くのことを予め習得した上でしか操作が始まらないという取りつきにくさも生んだ。

今回、これらの要求に応えるためさらなる自動化を進めると同時に、タッチパネル操作ソフトウェアにAMINOOCASYSを採用し、簡単操作に対応することもできる分析システムとした。また、ポンプ、オートサンプラー、カラム恒温装置などのハードウェアも一新することにより高性能を実現する新形のアミノ酸分析計を開発した(図1)。

#### 2. 製品の特長

従来のL-8800A形のハードウェアに比較し、次の仕様が拡張された。

1. 溶離液ボトル数を今後の分析法拡充に備え5液から6液に対応可能とした。
2. オートサンプラーの設置本数を120本から200本へ増加した。またオプションの冷却ラックも200本対応とした。
3. カラム恒温装置の上限温度を分析の高速化のために、70°Cから85°Cに引き上げた。
4. 反応装置の上限設定温度を135°Cから140°Cへ拡大した。



図1 L-8900形高速アミノ酸分析計

\*株日立ハイテクノロジーズ

\*\*日立計測器サービス㈱

#### 3. 分析法

L-8900形では新規の充填剤である3 μm陽イオン交換樹脂#2623を採用する高速生体液分析法が開発された<sup>3)</sup>。新規樹脂を充填するツインカラムφ5.4×(25+25) #2623PFを用いて生体液中のアミノ酸類縁物質約40成分を分析する高速分析法の例を示す(図2)。

#### 4. 自動化機能とタッチパネル操作ソフトウェア

L-8900形ではいくつかのハードウェアを付加することによりさらなる自動化機能を発展させた。またタッチパネル操作ソフトウェアにAMINOOCASYSを採用し、簡単操作に対応する

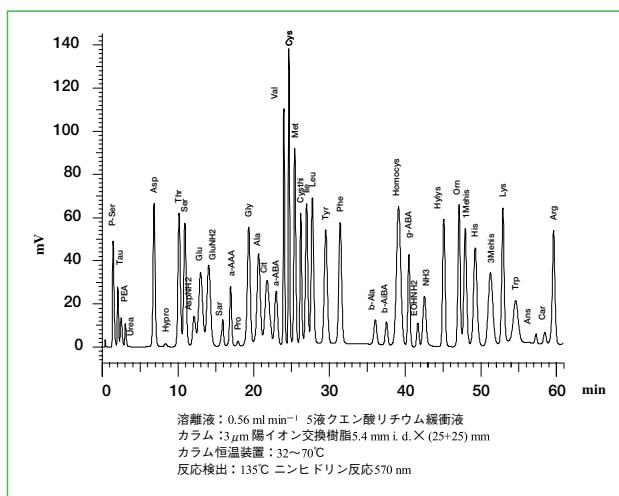


図2 高速生体液分析法

こともできる分析システムとした。次に特徴的な機能を紹介する。

#### (1) 自動化サポートハードウェア

基本機能として付加された自動化機能に、ニンヒドリン反応試薬を酸化から防止する窒素ガス( $N_2$ )バブリングがある。ボトル中の反応試薬残量が多ければバブリング時間を長くする自動調節方法を採用している。また、3種類のアラームセ

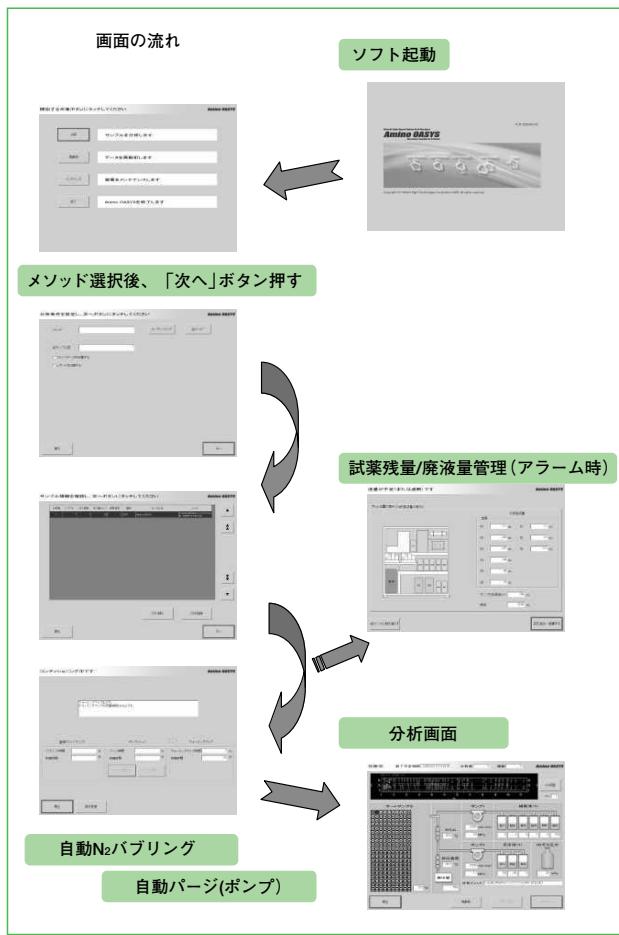


図3 簡易操作ソフトウェアAMINOOSYS

ンサ(窒素ガス圧力値、液漏れ、検出器のランプエネルギー)を付加して、エラーを未然に防止することを目的とした。

L-8900形フルスペック版には、オプショナル仕様としてポンプバージの自動的に切り替えられる高圧バルブを搭載した。ポンプの停止時間に応じてバージ時間の長さを自動的に調節することができる。さらに、試薬量を重量計測するセンサを設置し、溶離液・反応液の試薬残量および廃液タンク内の廃液量をリアルタイムで監視することができる。この試薬残量管理機能により、設定注入検体数に基づき、分析するために十分な試薬量があるか、分析スタート時に確認することができる。

#### (2) 簡易操作画面ソフトウェア

データ処理の基本ソフトウェアにはEZChrom Elite™ for Hitachi AAAが搭載されている。操作性をより簡単にするためにディスプレイにタッチパネルを採用し、EZChromの専用画面サポートソフトウェアとしてAMINOOSYSを開発した。AMINOOSYSからはカーナビ感覚で分析条件を設定し、分析をスタートさせることができる。図3に示すように画面の案内に従っていくことにより、分析方法を設定したり、検体数や、注入回数、注入量、サンプル名称などを簡単に登録したりすることができる。ユーザーが最低限の設定項目を登録した後、装置は各種センサを用いて装置状態を監視しながら、自動的にポンプ送液を開始し、各モジュール・ハードウェアを順次動作していく。カラム再生液を送液した後、標準試料や未知試料の分析注入を開始し、一連の分析工程を実行していく。分析工程終了後は、カラムおよび流路の洗浄まで自動的に完了することができる。

#### 5. おわりに

日立高速アミノ酸分析計においては、高速・高分離・高精度を追求してきた歴史がある。今後ともこれらの高性能を目指す分析法の開発を推進ていきたい。本開発は、味の素株式会社と共同で行ったものであり、宮野博氏と小澤真一氏に感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 雁野重威：タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー、化学増刊102、化学同人、3-12、(1984).
- D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, Anal. Chem., 1190, 30 (1958).
- 源法雅ら、第11回クロマトグラフィーシンポジウム要旨集 63, 25 (2004).

## F-7000形日立分光蛍光光度計

### F-7000 FLUORESCENCE SPECTROPHOTOMETER

江畠 佳定\*

各分光器に使用される回折格子の大型化を目的として、新規に回折格子を刻線し、分光器のFナンバーを従来の3.0から2.2へと大幅な効率の改善を行った。また、同時に光学系の最適設計を行い、感度を従来の2.5倍にすることに成功した。

#### 3. 測定例

##### (1) フルオレセイン

フルオレセインは、非常に感度のよい蛍光物質であることが知られている。その特性からタンパク質ラベリングや環境のpH測定など様々な分野で応用されている。

図2に $1 \times 10^{-12}$  mol/L,  $1 \times 10^{-11}$  mol/L,  $3 \times 10^{-11}$  mol/L,  $6 \times 10^{-11}$  mol/L,  $9 \times 10^{-11}$  mol/L,  $1.2 \times 10^{-10}$  mol/Lの各濃度フルオレセインの蛍光スペクトルを示す。

F-7000形は高感度化により、従来機のF-4500より1桁低濃度のフルオレセインを測定することが出来る。(F-4500形の検出下限は約 $1 \times 10^{-11}$  mol/L)

##### (2) BRET

BRET(Bioluminescence Resonance Energy Transfer)やFRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)などの分子間相互作用の測定に応用できる新しいアプリケーションが注目されている。

発光分子あるいは蛍光分子から近接する(1~10nm)分子に高い効率で励起エネルギーの伝達が



図1 F-7000形分光蛍光光度計外観

\*株日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー製品事業部 那珂事業所  
バイオシステム設計部

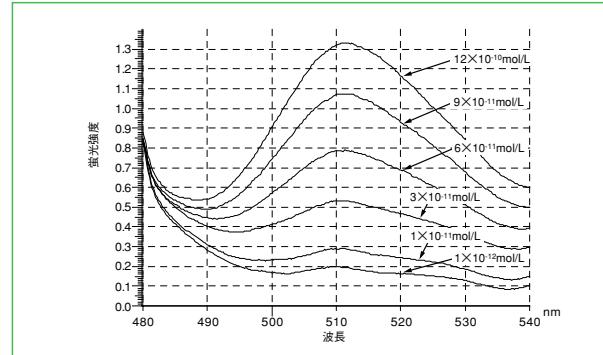


図2 フルオレセインの蛍光スペクトル

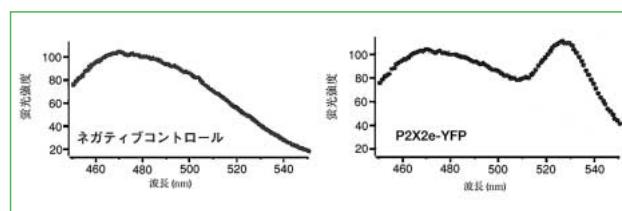


図3 BRET測定例

起こる現象は光エネルギー移動と呼ばれ、エネルギー供与体の消光と、エネルギー受容体の蛍光発光が起こる。光エネルギー移動の効率は、供与体と受容体分子の距離と向き(配向)を敏感に反映するので、2分子間、あるいは生体高分子内の2点間における空間的配置に関する情報を得ることが出来る。

光エネルギー移動が起こるために供与体より出る光のスペクトルと、受容体の吸収スペクトルの間に重なりがあることが必要となる。

図3はBRETの一例であり、ATP作動性ブリン受容体サブユニット蛋白質の相互作用を示す蛍光スペクトルである。供与体としてルシフェラーゼ、受容体としてYFP(Yellow Fluorescent Protein)を使用した。ネガティブコントロールの蛍光スペクトルと比較し、YFPの蛍光が530nm附近に現われ、相互作用が起こっていることが判る。

#### (3) 有機EL材料

有機ELとは有機化合物を発光体に用いた面発光型ディスプレイである。有機ELはディスプレイの軽量化、薄肉化が可能であり、次世代のディスプレイとして注目されている。この有機ELの発光剤として用いられるトリス(8-キノリノラト)アルミニウム錯体(Alq3)粉末の蛍光スペクトルの測定例を図4に示す。

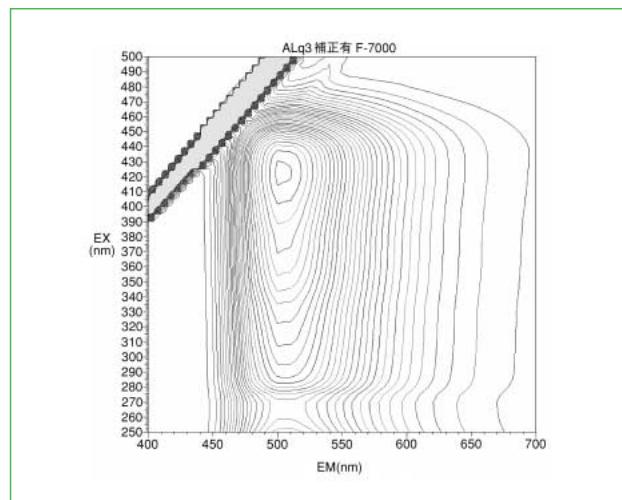


図4 トリスアルミニウムの3次元蛍光スペクトル(スペクトル補正有)

正確に蛍光剤を評価するためには、装置特性を含まない真の発光スペクトルを得る必要がある。F-7000形は、ローダミンBと副標準光源を使用することにより、蛍光側200~800nmの装置関数を補正できる。

#### (4) 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定

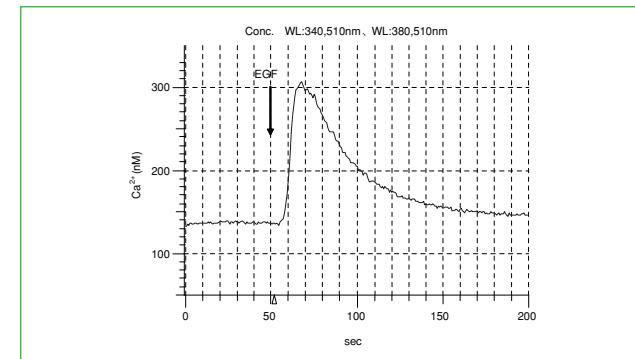
細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を測定するための代表的な試薬にFura2-AMがある。この試薬は膜透過性を持ち細胞懸濁液に混ぜると細胞内に入り、細胞内のアセチルエステラーゼにより分解されFura2となる。Fura2はCa<sup>2+</sup>結合能をもち、結合により励起波長のピークが顕著にブルーシフトする。これを用いて2波長測定を行うと、2波長の蛍光強度比をとることにより色素の濃度、光源の強度、細胞の大きさ等のファクターをキャンセルすることができる。

COS-7細胞(サル腎臓由来)にEGF(上皮増殖因子)を投与したときの、2波長の蛍光強度からCa<sup>2+</sup>濃度を算出した例を図5に示す。試料は培養細胞をFura2-AMにより蛍光標識したもので、細胞内でのCa<sup>2+</sup>濃度の経時変化を生きたまま測定することができる。EGFの投与によりCa<sup>2+</sup>が上昇しているため、COS-7にはEGF受容体が発現していることが確認された。

#### 4. 終わりに

F-7000形分光蛍光光度計は高感度、高速スキャンを特長とし、豊富な付属装置を用意した、様々なアプリケーションに対応可能な装置である。今後はBRET(FRET)を応用了した分子間距離の推定など、新しい応用分野に利用されることが期待できる。本説の執筆にあたりご協力いただいた方を以下に紹介すると共に感謝の意を表したい。

図3 BRET測定例のデータご提供：京都大学 大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野 舞水崇鏡先生

図5 COS-7にEGFを投与したときの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化

## 学会発表 ミニファイル

### 1. Separation Science 2005(2005.7/28~29 東京都)

松(日立ハイテクノロジーズ)、他：陰イオン界面活性剤の高感度分析

### 2. 液体クロマトグラフィー研究懇談会創立30周年記念シンポジウム(2005.8/3 千葉県)

谷川(日立ハイテクノロジーズ)：クロマトグラフィーの來し方行く末；検出編

### 3. 分析化学会第54年会(2005.9/14~16 愛知県)

和久井(日立ハイテクノロジーズ)、他：クロメート処理部品中におけるクロム(VI)の前処理／定量法の開発

**【要旨】**RoHS指令では、電気電子機器の生産から処分に至る全ての段階において、水銀、カドミウム、鉛、クロム(VI)、ポリ臭化ビフェニル、ポリ臭化ジフェニルエーテルの6物質を特定有害物質に指定し、2006年7月1日以降の使用を制限した。しかし、これら化合物の定量法についてEUから具体的な指針は示されていないため、現状把握のために定量法の開発が急務とされている。我々は、クロメート処理部品中におけるクロム(VI)を定量するために、沸騰水抽出・ジフェニルカルバジド-吸光光度法(DPC法)を用いる一連の前処理／定量法を提案したが本法では2時間の抽出によりクロム(VI)は50%の溶出率であった。そこで、今回は、抽出時間の短縮と溶出率の向上を目的に、希酸を用いた前処理法について詳細に検討した。

クロメート被膜の脱離時間は5 minが良く、これを超過するに従ってクロメート被膜の下層に存在する亜鉛、鉄が溶出し、クロム(VI)の定量を妨害した。また、脱離したクロメート被膜の溶解時間は、50°C、塩酸3Mの条件下では30minであった。この一連の操作で、試験片の浸漬時にクロム(VI) [K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>として添加]を100μg添加し同様に前処理／定量した。未添加時とクロム(VI)量を比較し回収率を算出した結果、亜鉛の溶出量が40μg以内で87%と高い回収率が得られた。

河原井(日立ハイテクノロジーズ)、他：非放射線電子捕獲検出器の開発(2)；有機塩素系農薬分析による性能評価

山本(日立ハイテクノロジーズ)、他：新規ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂固相抽出剤を用いた尿中マトリックスの除去効果とカドミウム、鉛の高感度原子吸光分析

米谷(日立ハイテクノロジーズ)、他：Z-2000形原子吸光光度計の新しい機能とノビアスキレートを用いたアプリケーションのご紹介

蛭田(日立ハイテクノロジーズ)、他：非放射線電子捕獲検出器の開発(3) PCB分析による性能評価

で法的規制を全く受けない。この検出器を用いて、高濃度サンプル(400 mg/L)を連続分析した場合の感度低下、低濃度サンプル(40μg/L)の再現性を確認した。その結果、高濃度の連続測定に対して頑健であること、相対標準偏差は0.34~1.33%(n=5)と良好なデータが得られた。更に、実試料への応用として魚介類中のPCBを測定したところ、放射線ECDと同等の定量結果が得られ、加えて、Nr-ECDのベースラインは放射線ECDより安定しており、マトリックスの影響が少ないことが確認された。

#### 4. プラズマ分光分析研究会第65回講演会(2005.10/14 岡山県)

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AA, ICP-AES, プラズマイオン源質量分析計法による微量元素分析

#### 5. 第2回茨城地区分析技術交流会(2005.10/28 茨城県)

蛭田(日立ハイテクノロジーズ), 他: 非放射線電子捕獲検出器の開発; PCB分析による性能評価  
和久井(日立ハイテクノロジーズ), 他: クロメート処理部品中におけるクロム(VI)の前処理/定量法の開発

#### 6. 第16回クロマトグラフィー科学会議(2005.11/7~8 岐阜県)

吉江(日立ハイテクノロジーズ), 他: ナノ流量グラジェント装置のプロテオーム解析への応用

**【要旨】** 極微量タンパク質の測定解析にはLC/MSが有用な装置となっているが、ナノフロー領域における安定したグラジェント溶出に課題が残っていた。現在、最も簡便な方法として多用されているスプリット方式でのグラジェント送液は、キャピラリーカラムなどの圧力変動がそのまま流量変動となるために、再現性の良いクロマトグラムデータを取得することが困難であった。我々は、バルブ&ループ法を用いたナノ高速液体クロマトグラフィーの開発を行い質量分析計との接続によるタンパク質同定に応用した。

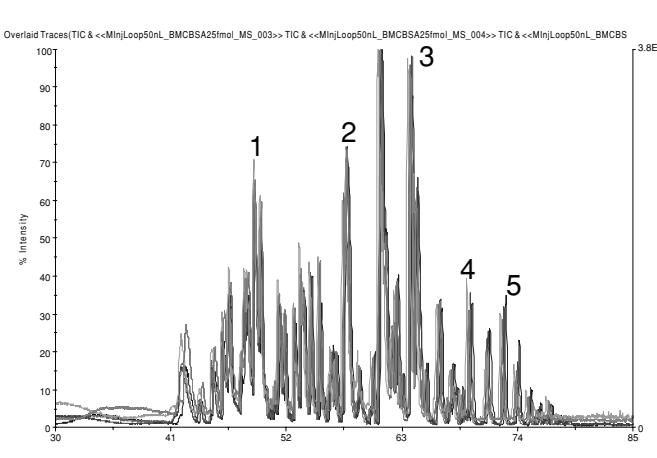
本システムのグラジェントカーブの安定性を評価するために、BSA(Bovine Serum Albumin)のトリプシン消化物25fmolを流量50

表1 クロマトグラム中各ピークの保持時間再現性

ピーク No.	1	2	3	4	5
保持時間 (min)	49.08	57.95	66.66	69.55	72.73
m/z	511.63	653.34	507.84	740.36	746.35
RSD (%)	0.64	0.56	0.46	0.41	0.36

nL/minにおいて、マニュアルインジェクションにより繰り返し測定(n=6)した。その結果、図1に示すような良好な分離パターンを得られ、またクロマトグラム中の主要な10ピーク(溶出区間49min~80min)について保持時間再現性を確認した結果、全てのピークについてRSD<1%の良好な再現性が得られた。一例として表1にトータルイオンクロマトグラム中5成分の再現性確認結果を示した。

また、実際のプロテオーム解析においては極微量タンパク質の検出・同定が必要とされるため、試料溶液の導入量を増やし感度を確保する手法が必須となる。本システムでは、トラップカラムを用いることで大量の試料を導入可能したことにより、BSA1fmolで配列カバー率20%以上を確保できる高感度分析が可能となった。



## 新製品紹介 NEW PRODUCTS

### F-7000形 日立分光蛍光光度計

F-7000形は、高感度化により微量の高感度分析を可能としている。

また、波長スキャン高速化により情報量の多い定性分析に利用されている3次元蛍光データを、さらに短時間(1~3分)で測定可能とした。

従来より高感度分析法として注目されている室温りん光測定も標準機能搭載、豊富な付属装置を準備し、幅広い分野で行われている高感度を特徴とした蛍光分析に対応可能としている。

#### 主な特長

##### 1. 高感度

水のラマン光をSN比250以上で測定可能  
(従来機種F-4500: 100以上)

##### 2. 60,000nm/minの高速スキャンを実現

(従来機種F-4500: 30,000nm/min)

##### 3. 3次元蛍光時間変化測定機能を標準搭載

##### 4. りん光スペクトル、りん光寿命を測定可能 5. バイオ分野に対応したマイクロプレートリーダー付属装置を搭載可能



### ◎ 株式会社日立ハイテクノロジーズ

北海道支店 札幌 (011) 707-3343  
東北支店 仙台 (022) 264-2219  
筑波支店 土浦 (029) 825-4801

本社(コールセンタ) 東京 (03) 3504-7211  
中部支店 名古屋 (052) 219-1881  
関西支店 大阪 (06) 4807-2511  
京都営業所 京都 (075) 241-1591

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

#### 〈編集後記〉

トリノオリンピックも熱気の中で終了しました。前評判の高さとは裏腹にメダルが金一つとは残念の極みです。選手達は一生懸命競技を行っており、責める気持ちは毛頭ありませんが、これもひとえに相手の実力や状況を伝えないマスコミと一部の企業に踊らされた結果のような気がします。荒川静香選手の優雅な演技で金を取れたことで救われた気がします。次のオリンピックにはぜひ期待したいものです。

さて、既にお知らせしましたように本号から電子顕微鏡関係を分離した内容で再発しました。今後は分析とバイオを中心に構成して行きます。本号は独立行政法人国立環境研究所客員研究官の森田昌敏先生に

「環境政策と技術」と題する巻頭言を、報文には「質量分析法による糖鎖構造解析」と「ポリマー系固相抽出剤の開発と応用」を掲載しました。

読者の方のご意見をいただき、内容の一層の充実に努めていくつもりです。ご意見等ありましたら、ご一報くださいるようお願いします。

(原田 記)

■インターネットホームページ  
○株式会社日立ハイテクノロジーズ  
ライフサイエンス関連  
<http://www.hitachi-hitec.com/science/>  
■本ニュースに関するお問い合わせは、右記、または、  
株式会社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。

○株式会社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

○株式会社日立ハイテクノロジーズ  
那珂ア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**

**MARCH, 2006 VOL. 49 No. 1**

発行 2006年3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