

アミノ酸分析の全自動化

Full Automation of Amino Acid Analysis

塚田 勝男*
Katsuo Tsukada

藤井 芳雄*
Yoshio Fujii

嶋田 三男*
Mitsuo Shimada

The KLA-5 Hitachi amino acid analyzer has been developed with the aim of automating the entire process of amino acid analysis and improving the performance of the former model on the basis of past experience. The new instrument automates all steps ranging from sample introduction to peak area calculation for each amino acid. The calculated results are printed out together with the retention time. The autosampler, which automatically introduces samples into the column, is offered in two versions—one holds 6 sample coils (for 3 kinds of samples) and the other 24 sample coils (for 12 kinds of samples). Reproducibility of the retention time is $100 \pm 1\%$ and that of peak area $100 \pm 2.5\%$.

1. 緒言

アミノ酸分析計は、タンパク質、生体組織、食料品、医薬品などの試料中に含まれているアミノ酸をイオン交換クロマトグラフィにより相互に分離し、定量する装置である⁽¹⁾。日立製作所では昭和37年にKLA-2形アミノ酸分析計⁽²⁾を製品化して以来、KLA-3形、KLA-3A形、KLA-3B形と改良を重ねて常に時代の要求に合致したアミノ酸分析計を提供してきた。

近年、ライフサイエンスの活発化、医薬、食料品工業の発展により、アミノ酸分析計の需要台数は依然上昇しつつあるとともに、アミノ酸分析計1台当たりの1日に分析すべき検体数の増加も要求されるようになった。このことはアミノ酸分析計の質的变化を促すこととなった。すなわち、一つには分析時間の短縮であり、いま一つは従来の1試料ずつ手動操作により試料を添加して分析する半自動機器から、自動的に試料を添加し連続分析が可能な全自動機器への転換である。これは同時におびただしいデータの産出をもたらすこととなり、データ処理の面でも非能率的な手計算によるピーク面積の計算から積分器あるいはコンピュータによる計算にたよらざるを得ないこととなった。KLA-5形はこれらの要求を完全に満たすとともに、自動機器としての安全性、保守および操作の簡便性も考慮して設計された全自動アミノ酸分析計であり、以下のような特長を有している。

- (1) 試料導入からピーク面積の計算に至るまでの全行程が自動化されている。積分器はコンパクト設計で本体に内蔵されている。
- (2) 6試料オートサンプラの、サンプルコイルは6本であるが分析の終わったサンプルコイルへは分析中、随時試料の充填（じゅうてん）ができるのでエンドレスに連続分析が可能である。
- (3) 24試料オートサンプラは定容量（0.5ml）の試料が充填できるだけでなく、10～250 μ lの微量の試料をも充填することができる。また冷却装置を付けることもできる。
- (4) 高感度であり、0.0005 μ moleまで検出することができる。
- (5) プログラムは多様なプログラミングが可能のため、複雑な分析行程を有する分析にも適用することができる。
- (6) 調製分取装置（LP-5形）と組み合わせることにより試料の分取ができる。

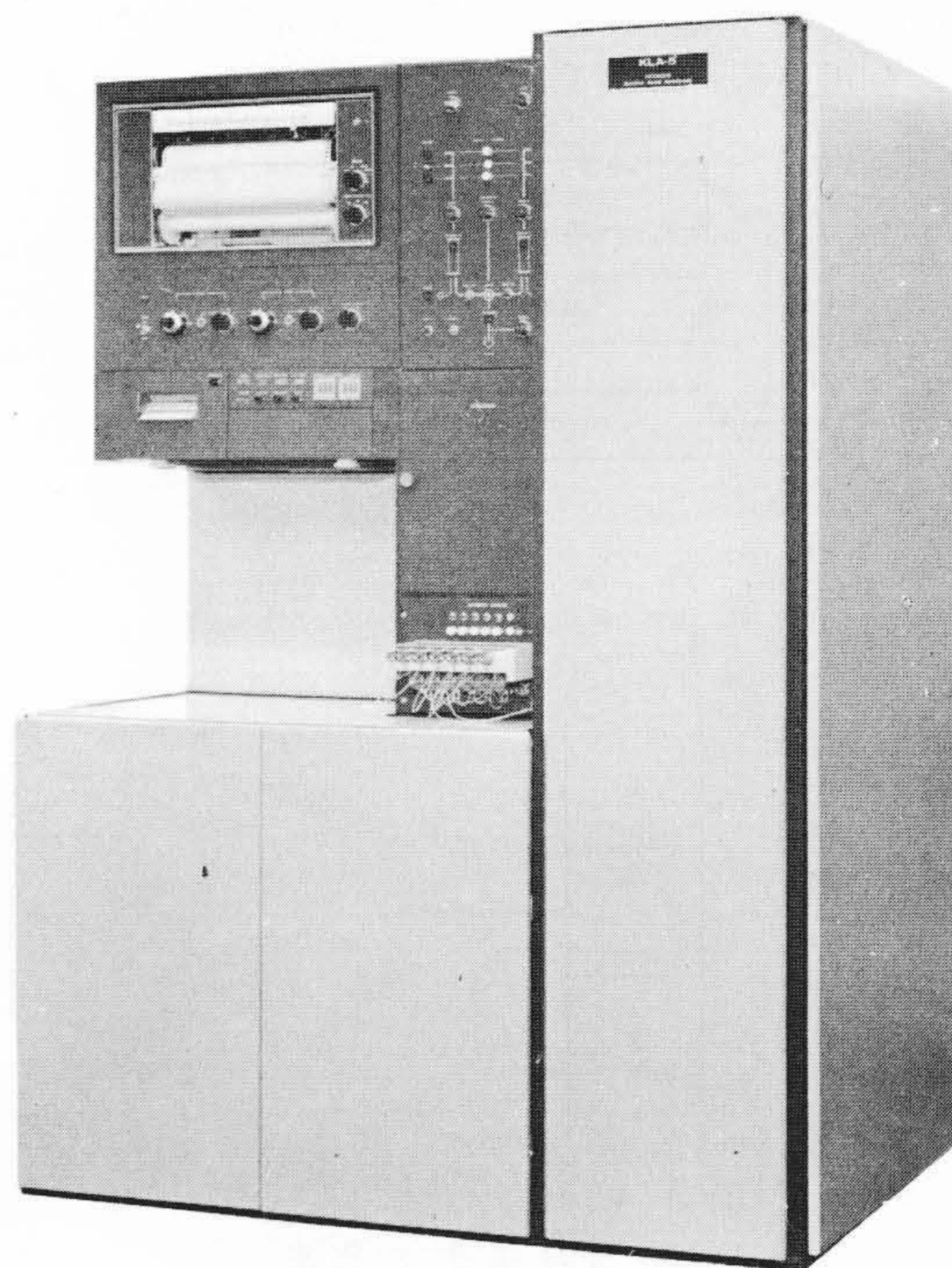


図1 KLA-5形日立アミノ酸分析計

- (7) 流路系統順に操作ボタンと表示ランプを配した操作パネルにより操作が簡単であり、かつ動作状態が一目でわかる。

図1はKLA-5形日立アミノ酸分析計の外観である。

2. 分析行程

アミノ酸の混合物である試料はイオン交換クロマトグラフィにより個々のアミノ酸に分離される。分離されたおのおののアミノ酸には、発色試薬（ニンヒドリン試薬）が加えられ一定温度で発色後、光度計で比色定量される。結果は記録計によりクロマトグラムとして記録され、ピーク面積は積分器により計算される。図2はこの分析行程とその行程を遂行する分析計の各ユニットについて示したものである。複数の検体を分析する場合にはこの行程を繰り返し、所定の検体数の分析を終了すると自動停止する。

* 日立製作所那珂工場

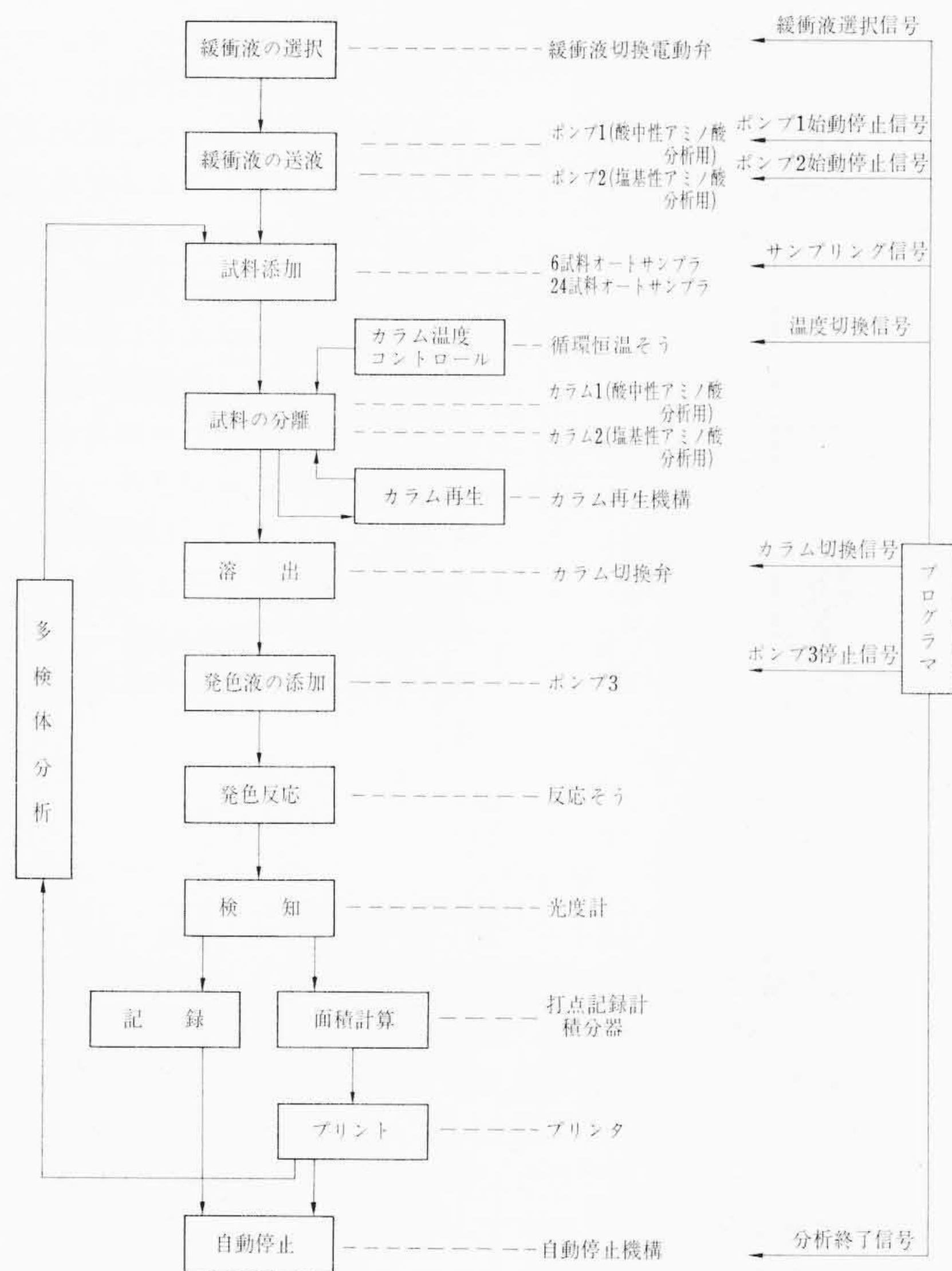


図2 分析行程およびユニット

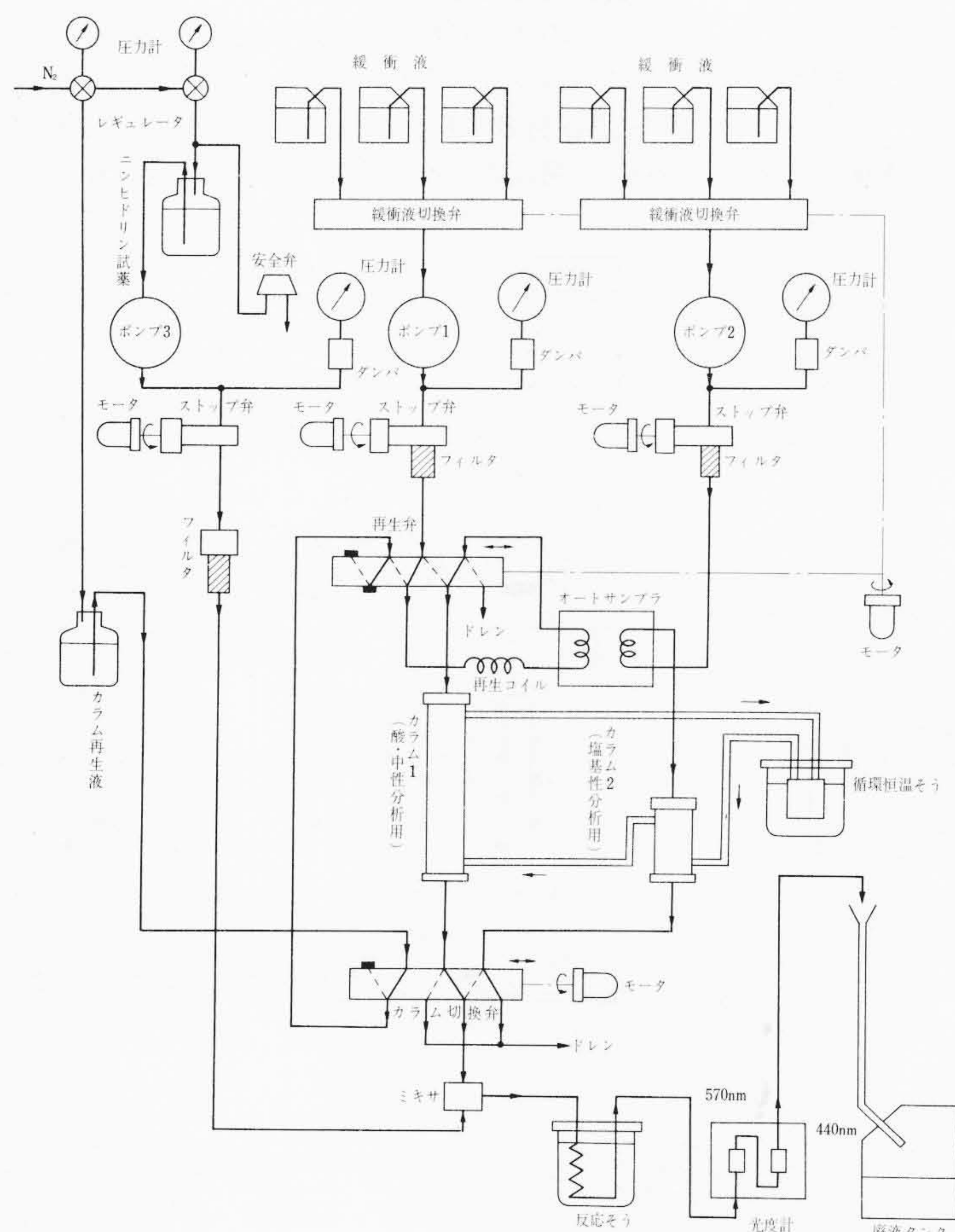


図3 KLA-5形
流路系統図

3. 流 路 系

KLA-5形の流路系統は図3に示すとおりである。アミノ酸の分析には、Stein, Moorら⁽³⁾によるイオン交換クロマトグラフィーを標準分析法とし、自動再生弁を含む2系列の溶離系を交互に切り換えることによって、連続的に分析ができるようになっている。また分離したアミノ酸を分取する場合には、LP-5形調製分取装置を組み込み配管することにより可能である。

4. 機能と構造

主要なユニットについて、その機能と構造を以下に述べる。

4.1 プログラム

アミノ酸分析計のプログラムの条件として、(1) プログラミングが簡単であること。(2) 種々の分析法に適用できるよう幅広いプログラミングが可能なること。(3) 分析中プログラミングの変更が可能なること。(4) 同一プログラムのエンドレス使用が可能なること。(5) 緩衝液などの蒸気により腐食され誤動作しないことなどである。これらの条件を満足する簡易なプログラムとして、KLA-5形では図4に示したように、紙テープに穿孔(せんこう)した穴が、金属製ドラムとブラシの間を通過するときの電氣的導通でリレーを動作させる方式としている。このテープは任意の長さ(任意の分析時間)の輪状になっており、複数の検体を分析する場合にはエンドレスに繰り返し使用される。特に時間精度を必要とする緩衝液の切替え、カラム切替え、サンプリング信号などは穿孔穴のずれによる設定時間の誤差を防ぐため、穿孔穴と1分(あるいは2分)ごとに発生しているパルスとが同期したときに信号が出るようになっている。

4.2 微量定量ポンプ

緩衝液およびニンヒドリン試薬を送液するポンプの精度は、そのまま分析精度に現われる。すなわち、ポンプの流量の変動はピーク位置、ピーク面積の変動となって現われる。KLA-5形ではピーク位置の再現性は、4時間標準分析法で実質的には $100 \pm 0.2\%$ 以下であり、流量の安定性がきわめて高いことを示している。図5に示すようにポンプはダブルピストン駆動式で、ピストンの動きに同期して弁が切り換えられる。ポンプピストンと弁ピストンはカムを中心として両側に配置され、カムの回転により左右のポンプが交互に動作し、連続した送液をする。

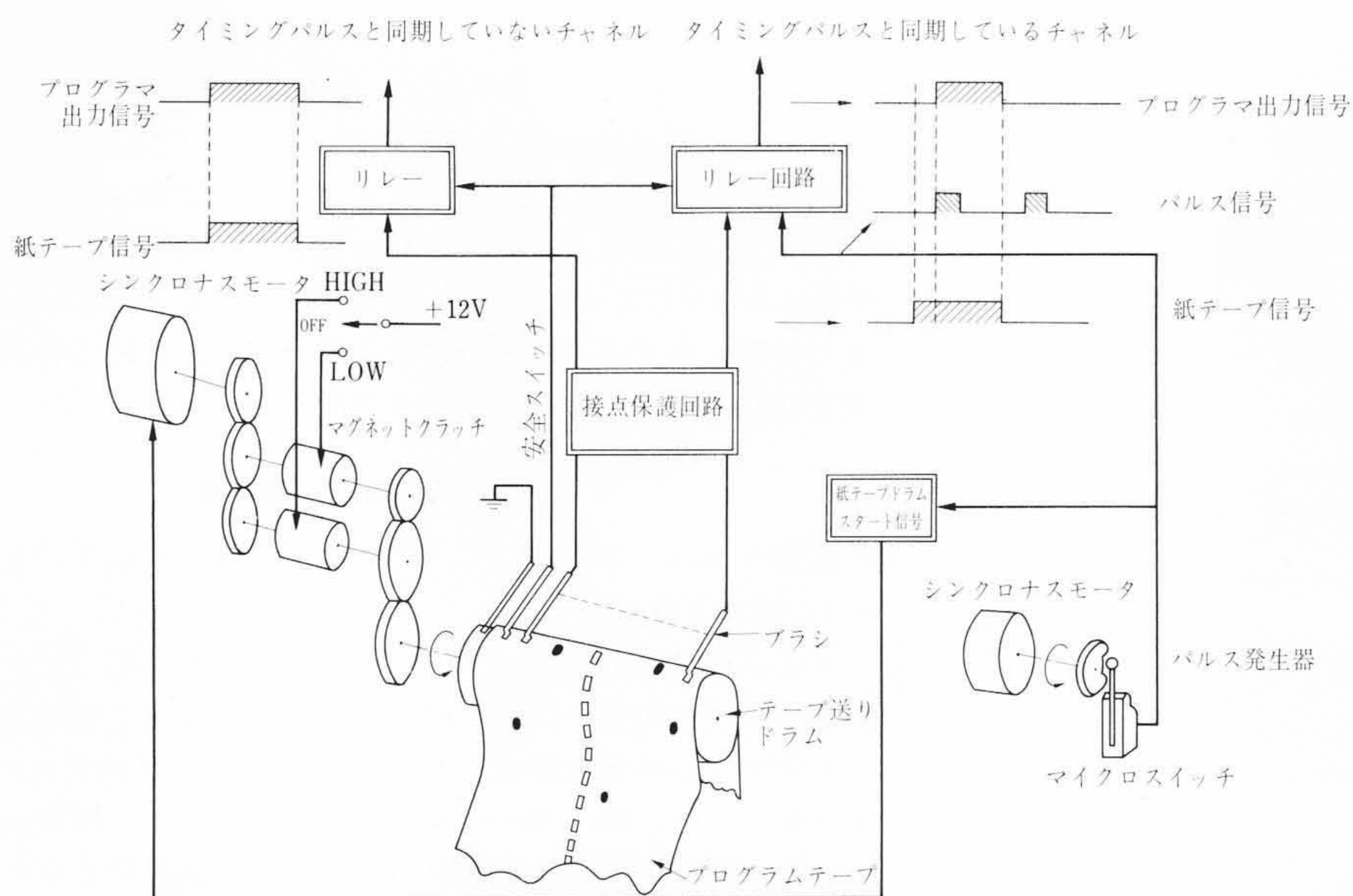


図4 プログラム

4.3 オートサンプラ（自動試料添加装置）

4.3.1 6試料オートサンプラ

図6に示すようにこのサンプラは、それぞれ独立したサンプルコイルと試料吸引口を備えている。サンプルコイルは弁の切換えによりカラムに接続され、試料添加が行なわれる。サンプルコイルにはそれぞれ独立した流路切換弁があるため、カラムへ接続しているサンプルコイルを除き、分析中でもサンプルコイルへ自由に試料の充填ができる。サンプルコイルは6本だけであるが、分析の終わったコイルへ次々と試料を充填してゆけば、エンドレスに分析を継続できるのが特長である。

4.3.2 24試料オートサンプラ

このサンプラは24試料までの多試料の連続分析ができるだけでなく、 $10\sim 250\mu\text{l}$ という微量の試料をもサンプルコイルに充填できるのが特長である。その原理を示したのが図7である。サンプラ本体のターンテーブルが回転し、サンプルコイルが Analyzing の位置にくると、吸引ポンプの吸引動作とサンプル導入弁の流路切換えによって、試料は導入チューブ内へ移動する。さらにサンプル導入弁の流路切換えにより、導入チューブ内の試料は緩衝液

で押し出されカラムへ添加される。図から明らかなように、サンプラ本体は分析流路から独立しているため、サンプルコイルに圧力は負荷されない。サンプルコイルは正確に 0.5ml に計量されているので、定容量コイルとしても使用されるが、各サンプルコイルにはそれぞれ注入口があり、試料量が微量の場合には、あらかじめ緩衝液で満たされたサンプルコイルへマイクロシリンジにより、 $10\sim 250\mu\text{l}$ の任意量を注入することもできる。試料採取量が少ないとき、試料を100%有効に用いるのに便利である。

5. J221形積分器

J221形積分器はKLA-5形本体に組み込まれており、各アミノ酸のピーク面積を計算する。積分器にはプリンタが内蔵され、チャンネル番号（1けた）、溶出位置（分、3けた）、積分値（6けた）がプリントアウトされる。通常のアミノ酸は 570nm の出力が、プロリン、ヒドロキシプロリンは 440nm の出力が積分されるが、これらのチャンネル切換えはプリセットタイマにより行なわれる。図8に示したのは標準分析法におけるリジンのピークのHW法による面積の再現性と、積分器によるそれとの比較である。試料量としては $0.1\mu\text{mole}$ およびこれの $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{4}$, 8倍量（ 0.00625 , 0.0125 , 0.025 , $0.8\mu\text{mole}$ ）をとり、各3回ずつ測定し各試料量につき平均値との差を百分率で表わした。図に示したのは平均値との差の最大値、すなわちばらつきの幅である。積分器を用いた場合、各試料量とも $\pm 3.2\%$ 以内であり、特に試料量が $0.0125\sim 0.8\mu\text{mole}$ の場合は $\pm 1\%$ 以内である。微量試料の分析では、ピーク

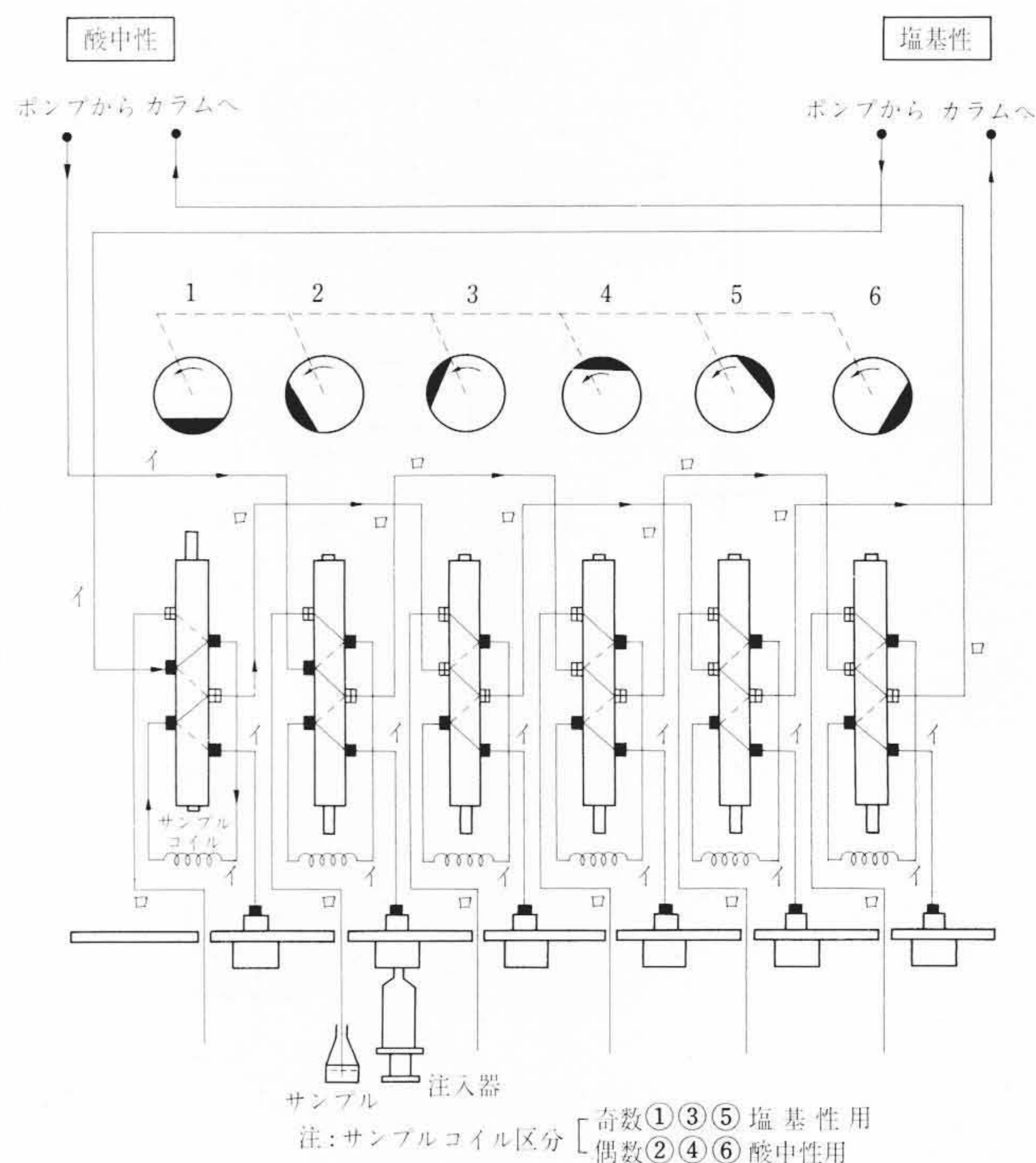
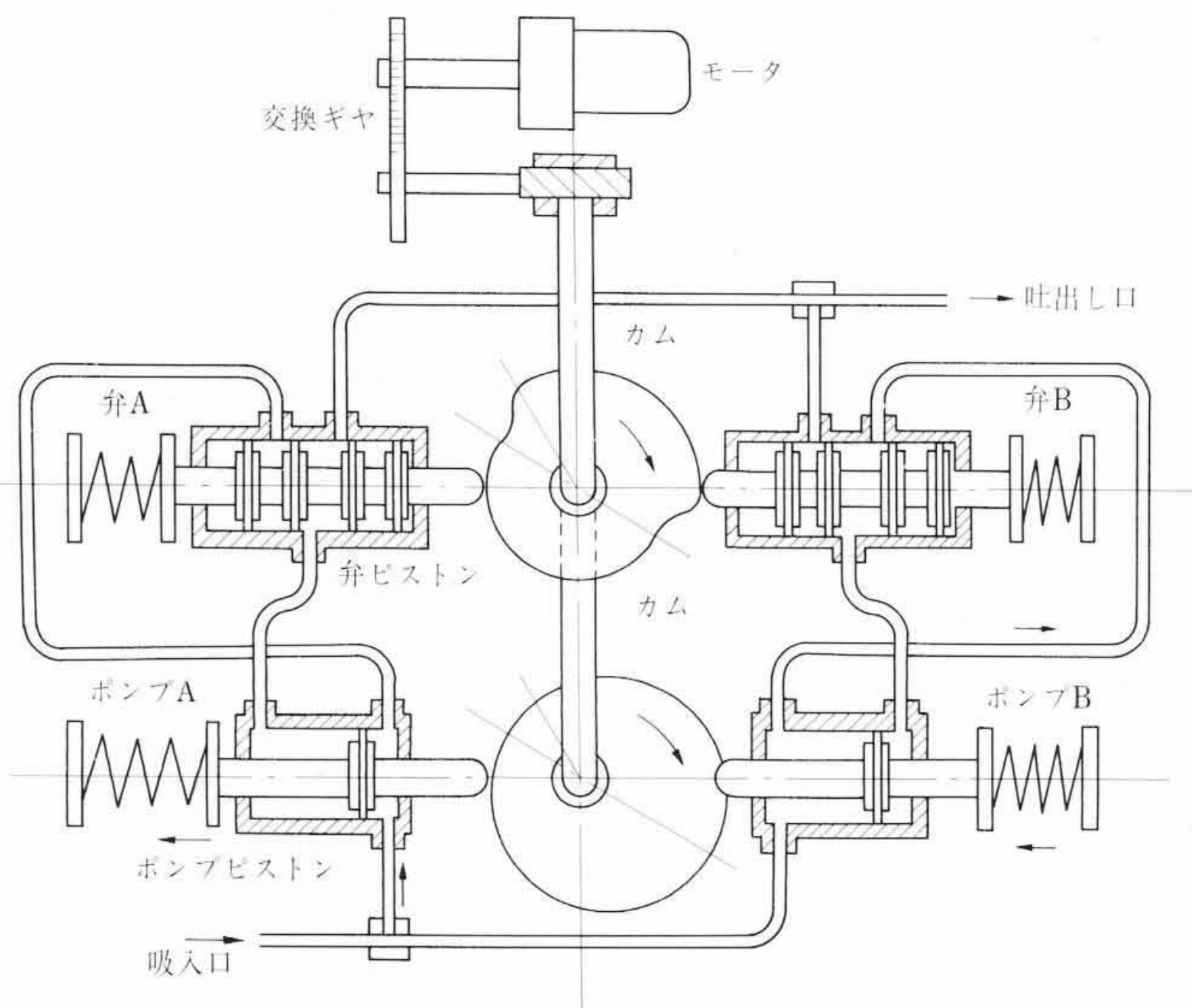


図6 6試料オートサンプラ



(図はポンプA(左側)は吐出し、ポンプB(右側)は充填過程を示す)

図5 微量定量ポンプ

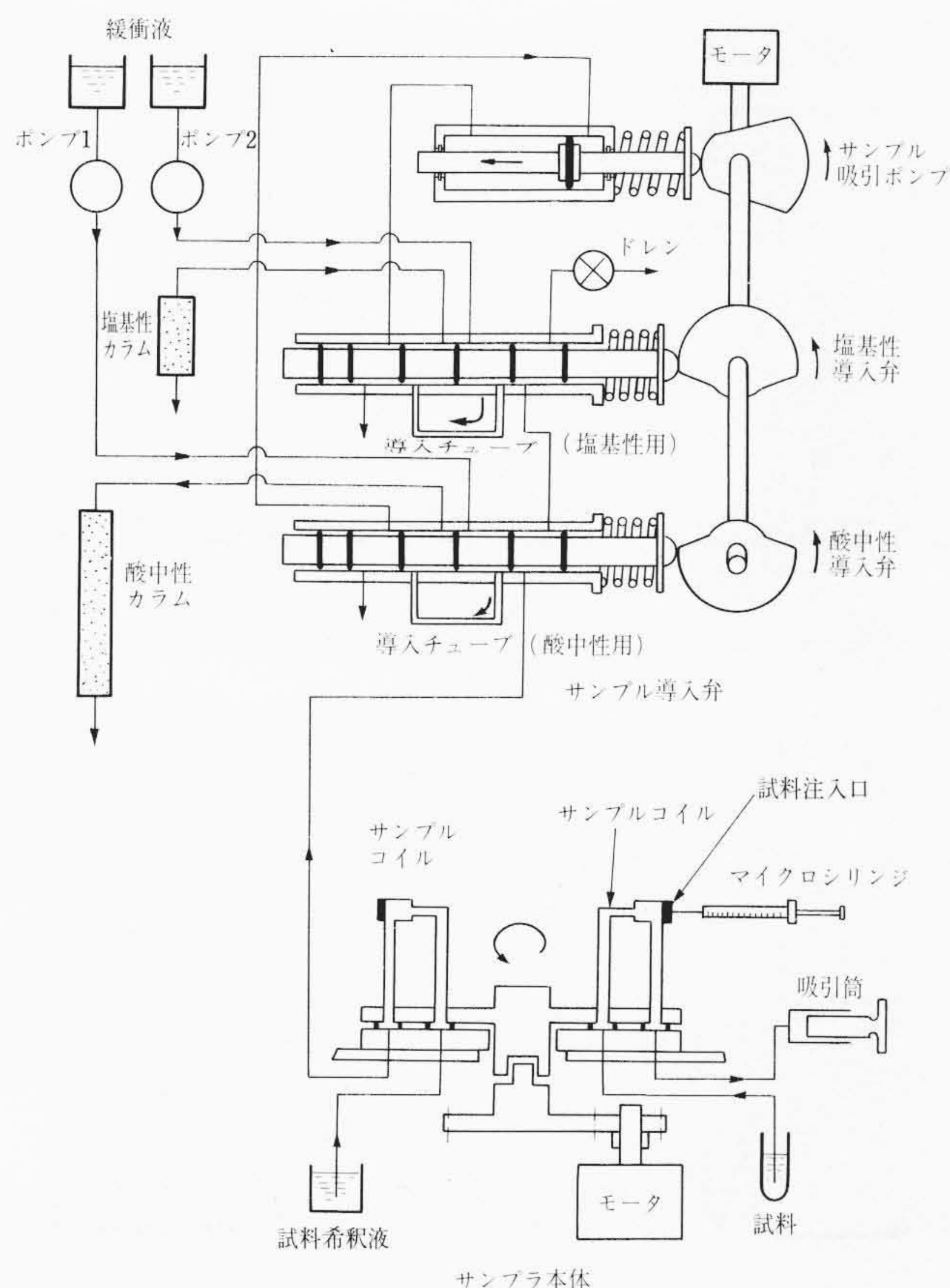


図7 24試料オートサンプラ

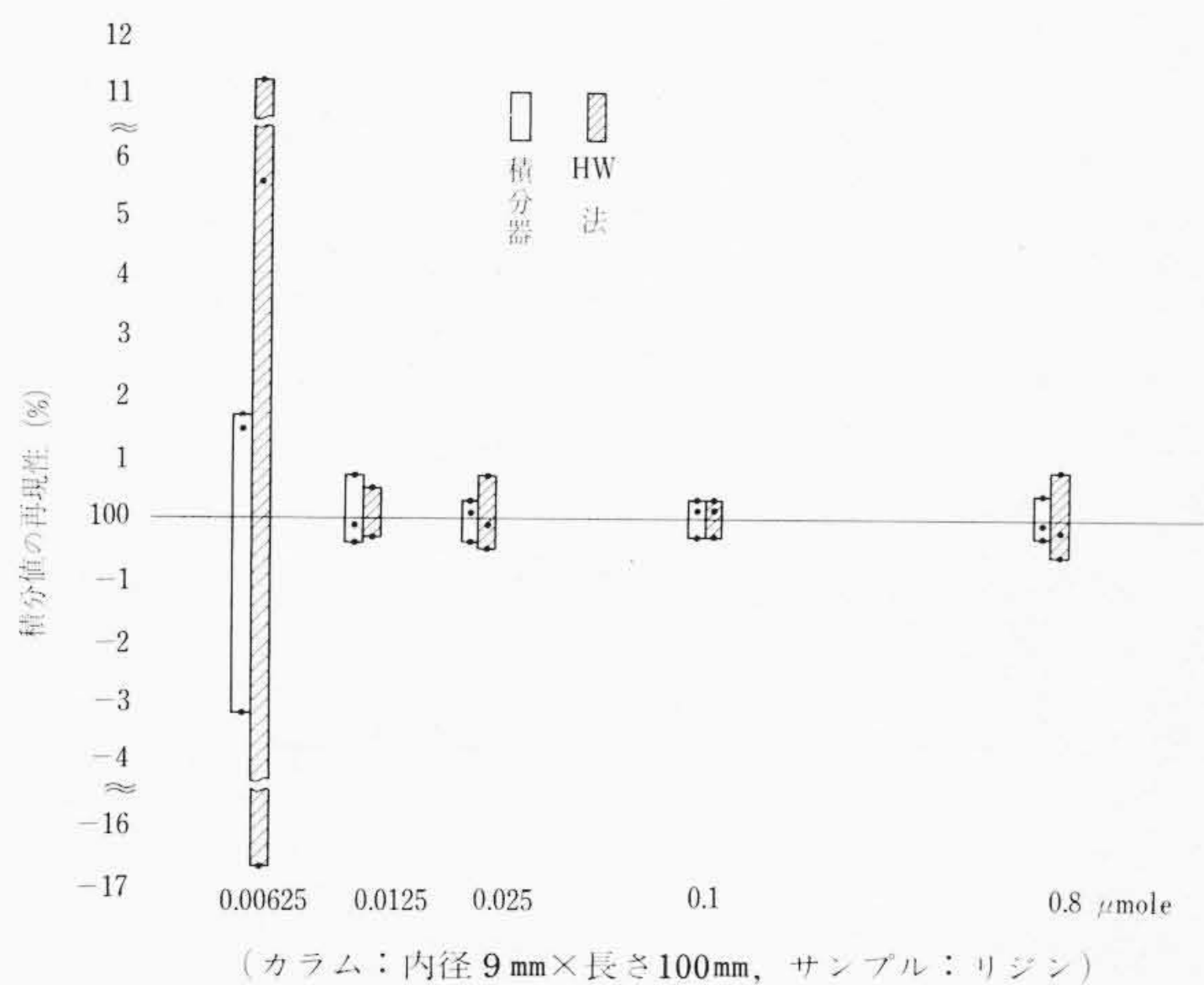


図8 積分器およびHW法により計算したピーク面積の再現性

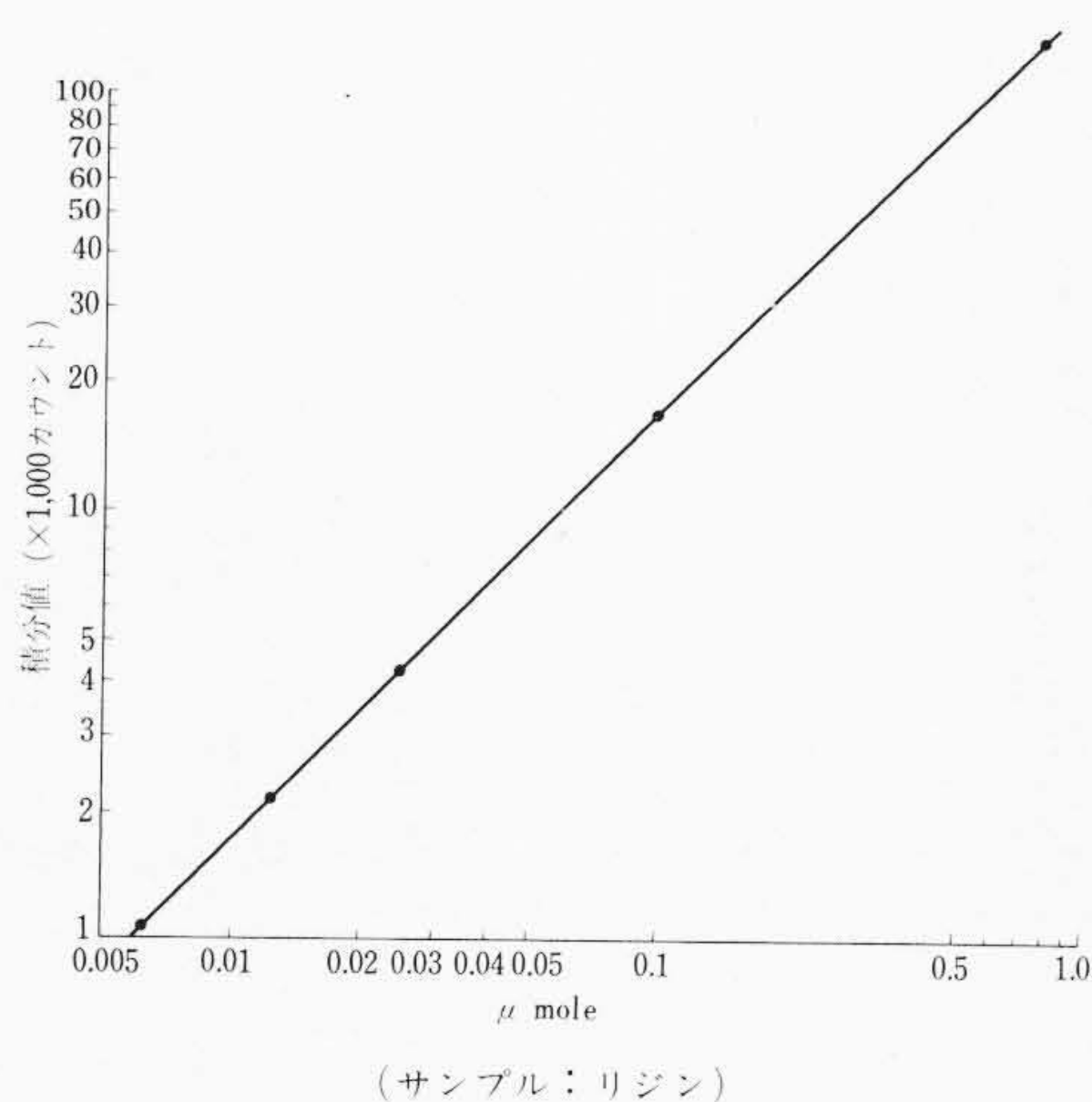


図9 積分器の直線性

高さが小さいためHW法では正確なピーク面積の計算が困難である。リジン $0.00625\mu\text{mole}$ の場合、HW法ではばらつきの幅が $\pm 17\%$ にも達するのに対し、積分器では $\pm 3.2\%$ 以内であり積分器の有用性が認められる。図9は試料量に対する積分値の直線性を示したものである。

6. 分 析 法

アミノ酸の分析法は多種にわたるが、分析目的に最も適した分析法を選ぶことが肝要である。したがって装置は多様な分析法が適用できるものでなければならないが、KLA-5形はこの点も十分考慮されている。表1に示したのはKLA-5形による分析法の一覧表である。ここではイオン交換クロマトグラフィによる標準分析例と、迅速分析例を示すにとどめる。

6.1 イオン交換標準分析法

この4時間標準分析法はタンパク質加水分解物のアミノ酸分析に最もよく用いられ、分離、定量の点で十分なデータが得られる。カラムは内径 9mm のものが一般に用いられるが、図10に示したクロマトグラムは内径 6mm のカラムを用いて3分析した例である。内径 6mm のカラムを用いた場合、内径 9mm のカラムに比べ、試薬の消費量が $\frac{1}{2}$ ですむほかに、感度が2倍になるという利点がある。

6.2 イオン交換迅速分析法

この分析法は、緩衝液流速を標準のそれと同じ条件で、カラム長さ（樹脂の有効充填高さ）を約 $\frac{1}{2}$ にすることにより、時間を約 $\frac{1}{2}$ に短縮したものである。この際分離が低下しないようにイオン交換樹脂に改良が加えられている。

図11に示した例は、18成分のアミノ酸をオーバーラップ法により115分で分析したものである。

表1 KLA-5形日立アミノ酸自動分析計による分析法一覧表

分析法	分析対象	カラム法	カラム内径 (mm)	緩衝液流速 (ml/h)	公称分析時間 (h)	主要用途
I	PH	2カラム法	9	60	2	迅速分析 (カラム長さ約 $\frac{1}{2}$)
			9	90	3	
			6	30	4	
	PF	2カラム法	9	60	4	標準分析
			9	30	8	高分離分析
			6	30	4	標準分析
I	PH	1カラム法	9	60	5	1カラム法標準分析
			6	30	5	
			9	60	12	生体液標準分析
	PF	2カラム法	9	60	12	
			6	30	12	
			9	60	6	Glu-NH ₂ , Asp-NH ₂ の分離
リチウム分析	PF (酸中性アミノ酸のみ)	2カラム法	18	120	8	
			18	120	24	
	調製分取分析	2カラム法	18	120	8	調製分取分析 (LP-5形)
			18	120	24	
ペプチド分取分析	1カラム法	1カラム法	9	90	4	ペプチド分取分析
			9	90	4	

注：I：イオン交換分析法 (Ion Exchange Chromatography)
 PH：蛋白加水分解物 (Protein Hydrolyzate)
 PF：生体液 (Physiological Fluid)

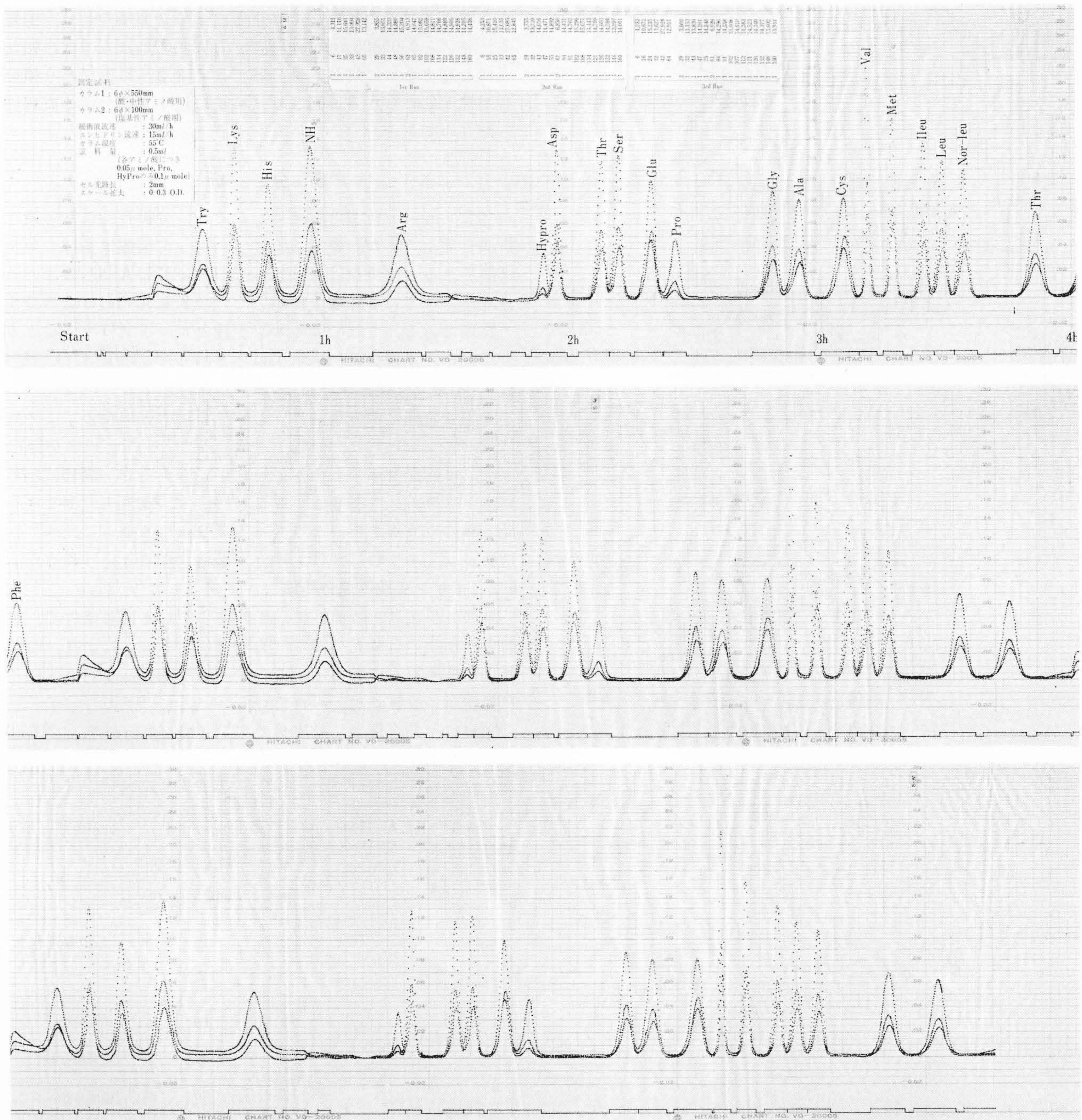
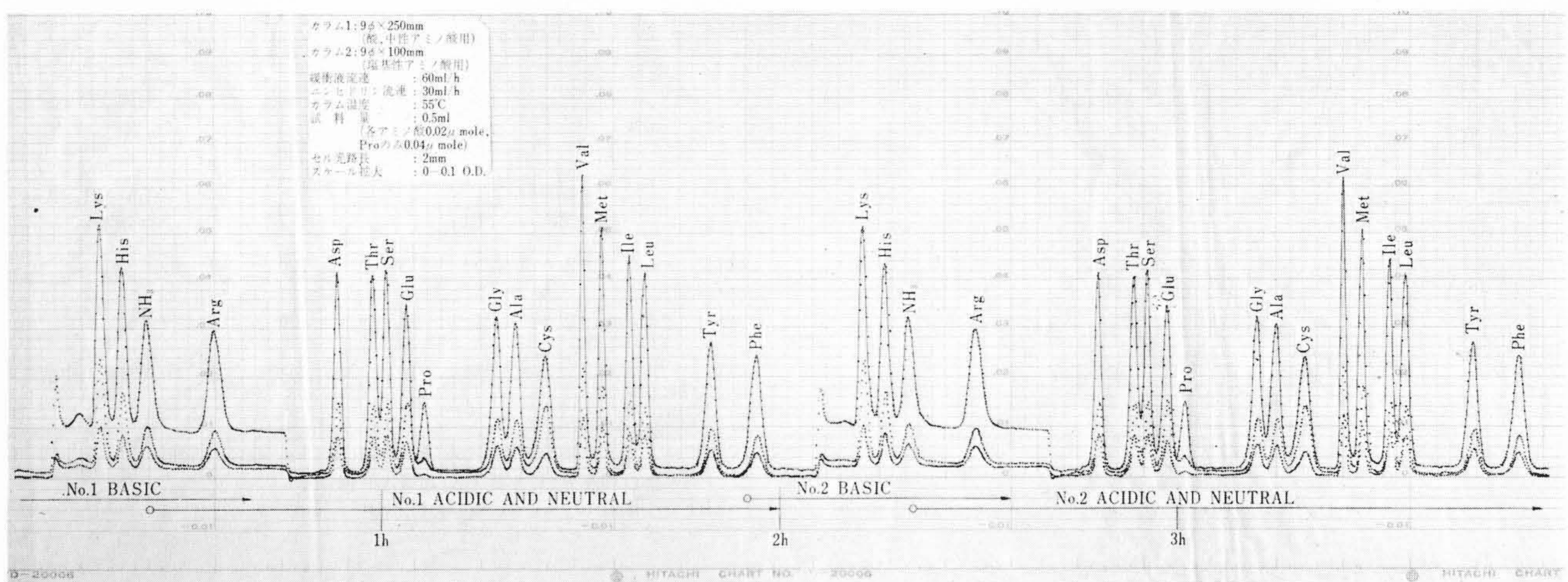


図10 イオン交換クロマトグラフィによる4時間標準分析法のクロマトグラムと積分値



7. 結 言

以上、全自動化したK L A-5形日立アミノ酸分析計につきその概要を述べた。これの完成により、オートサンプラへの試料の充填が終わればあとは無人運転のため、夜間や休日の分析続行も可能となり、稼働率は著しく向上する。また従来、多大の時間を費やしていたピーク面積の計算から解放されることは稼働率の大幅向上とともに特筆される。たとえば4時間標準分析法の場合、1日6検体の分析ができるが、1日分のクロマトグラム上の各ピークの面積をひとりの人間がHW法で計算するとまる一日を費やすことからその意義が理解できる。

また分析精度については、アミノ酸の標準試料(アミノ酸各0.1 μ mole)の4時間標準分析法において、ピーク面積の再現性は100 $\pm$ 2.5%, ピーク位置の再現性は100 $\pm$ 1%以内である。この数値は、オートサンプラへの試料充填から積分器による計算に至るま

での全行程の誤差が重畳された値であり、分析計の総合精度を示すものである。

K L A-5形日立アミノ酸分析計は、アミノ酸分析の全自動化という所期の目的を十分に達成したものであるが、今後はさらにいっそう分析感度の向上と分析時間の短縮を目ざして努力してゆきたい。

終わりにあたり、ご指導、ご協力をいただいた関係者の各位に深く感謝する。

参 考 文 献

- (1) 波多野博行：アミノ酸自動分析法(昭39 化学同人)
- (2) 波多野、江頭、小沢、鴈野、黒羽、宮内：日立評論 44, 134 (昭37-2)
- (3) D.H. Spackman, W.H.Stein, S.Moore：Anal. Chem., 30, 1191 (1958)

Vol. 33

日 立 造 船 技 報

No. 2

目 次

■ 論 文

- ・船舶におけるタンクヒーティングコイルの熱貫流率および有効長さに関する実験的研究
- ・進水時に船体船底に働く外力の調査研究
- ・波浪中を航行する船舶が受ける波浪衝撃力の一推定

- ・従属・独立インパルス併用式放電加工における適応制御の一手法
- ・蒸気ドラム内水位の盛り上りと気水分離性能
- ・噴流層における静圧分布とたい積圧力分布
- ・噴霧液滴の塔壁付着機構の解析

……………本誌に関する照会は下記に願います……………

日立造船株式会社技術研究所
大阪市此花区桜島北之町60 郵便番号 554



特 許 と 新 案



■ 制御および保護装置 (56ページより続く)

登 録 番 号	公 告 番 号	名 称	登 録 番 号	公 告 番 号	名 称
特 225791	31-2556	発電機の停止制御装置	実 883515	44-6265	移相回路
特 450185	39-29999	リングカウンタ誤動作検出方法	実 798727	40-11047	電動機の起動制御装置
特 457615	40-10095	表示線監視回路	実 887497	44-13434	A—D変換器
特 510236	42-14722	温度特性補償用電源装置	実 819831	41-15122	変形論理積回路
実 833511	42-1084	樹脂モールドにおける 内蔵部品の保護装置	特 459410	39-23133	回転数制御装置
実 824484	41-20658	近接スイッチ検出部	特 473908	39-16380	電磁接手を使用した 負荷の駆動方式
実 772271	39-36129	ピンボードプログラムの 故障検知装置	特 528611	43-9409	フリップフロップ回路
実 790889	40-22047	表示線監視回路	実 837589	42-11866	抽出形制御盤
実 529731	35-18699	巻付接続端子の巻戻工具	実 737715	38-26019	締着装置
実 783909	40-12607	電線支持クリート	実 724057	38-7619	机形制御盤の机板開閉機構
実 725689	38-11717	配電盤用配線支持金具	実 900977	44-23633	制御箱等の内枠取付装置
実 803503	40-26700	故障表示装置			