

KLA-2 形 日 立 ア ミ ノ 酸 分 析 計

Model KLA-2 Hitachi Amino Acid Analyzer

波 多 野 博 行*
Hiroyuki Hatano

江 頭 暁*
Satoru Egashira

小 沢 恭 一*
Kyoichi Ozawa

鴈 野 重 威**
Shigetake Ganno

黒 羽 逸 平***
Ippei Kuroha

宮 内 圭 治***
Keiji Miyauchi

内 容 梗 概

アミノ酸分析計は試料中のアミノ酸をイオン交換クロマトグラフ法により分離した後、ニンヒドリンで発色させ、光度定量する一連の分析操作を自動的に行なう装置である。この種の分析計においては容量分割方式と連続流動方式の二つの形がある。後者は定量性の高い微量定量ポンプの採用によってはじめて可能であるが、従来この目的にかなう微量ポンプはみられなかった。

日立製作所では電動弁式復動ポンプの開発により連続流動式アミノ酸分析計の製品化に成功し、KLA-2 形日立アミノ酸分析計として本年5月以来市販に供している。ここに本装置の概要を紹介する。

1. 緒 言

生物界において、蛋白質は最も重要な物質であって、蛋白質のないところに生命は存在し得ないといっても過言ではない。この蛋白質を酸、アルカリ、または酵素などを用いて加水分解するとアミノ酸が得られる。また、生体内では蛋白質はアミノ酸を原料として合成されることが知られている。蛋白質は多少ほかの成分を含んでいるものもあるが、一般にその大部分の構成成分はアミノ酸であり、アミノ酸の縮合したポリペプチド鎖が骨格を形造っていることが知られている。

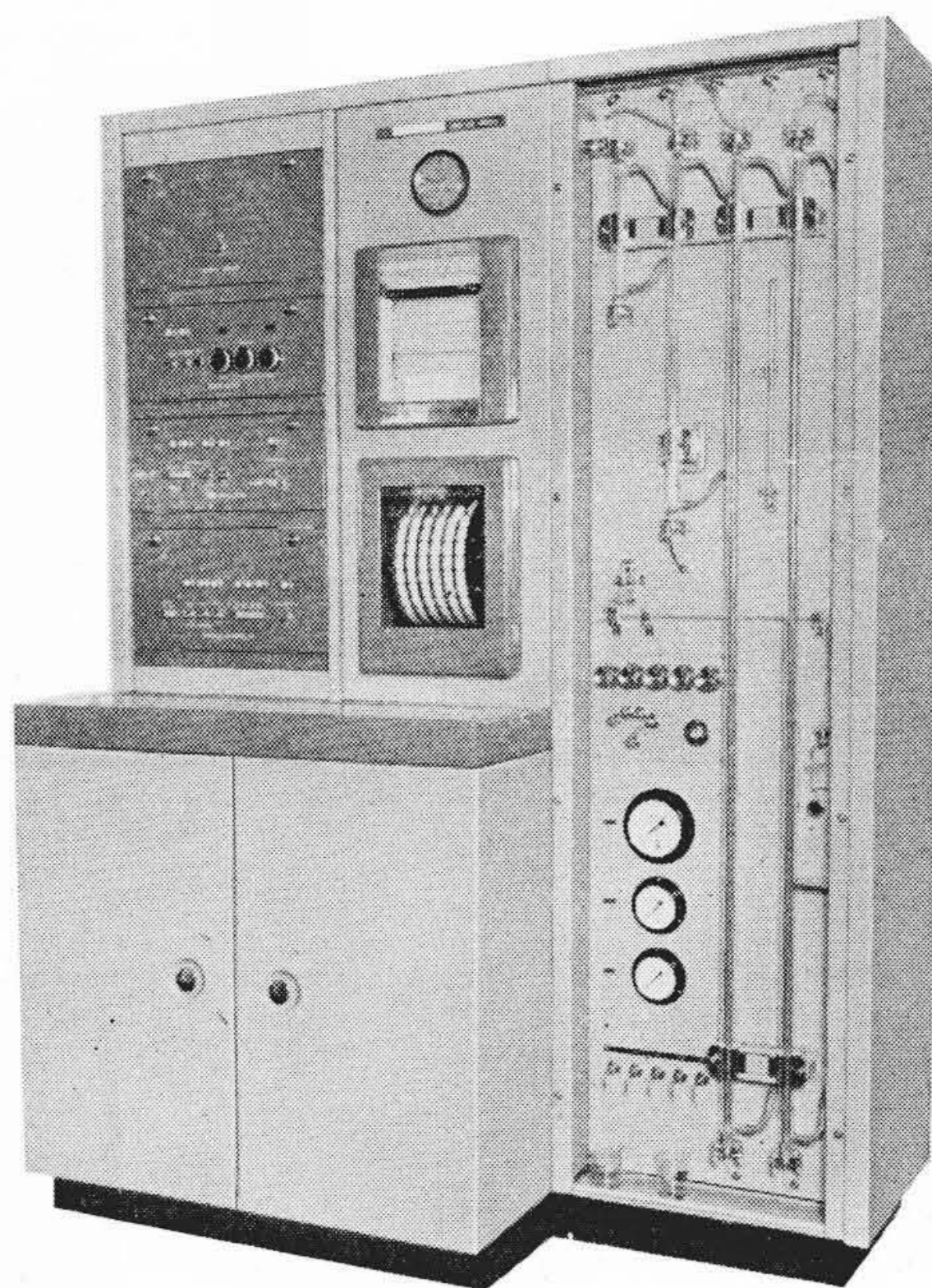
この蛋白質の構造研究におけるアミノ酸の分析は、有機化合物における元素分析のようなもので、蛋白質の構造を決定するためにそのアミノ酸分析が盛んに行なわれる。また生体内には、アミノ酸、および関連物質が多数存在しており、生命現象の秘密を解明する手段の一つとして、これらの分析が行なわれている。

また、動物は自己の体蛋白質の合成の原料を食物の蛋白質中のアミノ酸に仰いでいるから、種々の飲食料品、医薬品、栄養剤などのアミノ酸組成を明らかにするために、栄養化学の分野でもアミノ酸分析は重要な仕事である。また諸種の疾患で、排泄物や、血液中の遊離アミノ酸の質的量的な異常と関係があるものが知られており、医学の分野でもアミノ酸分析は重要な技術の一つになっている。

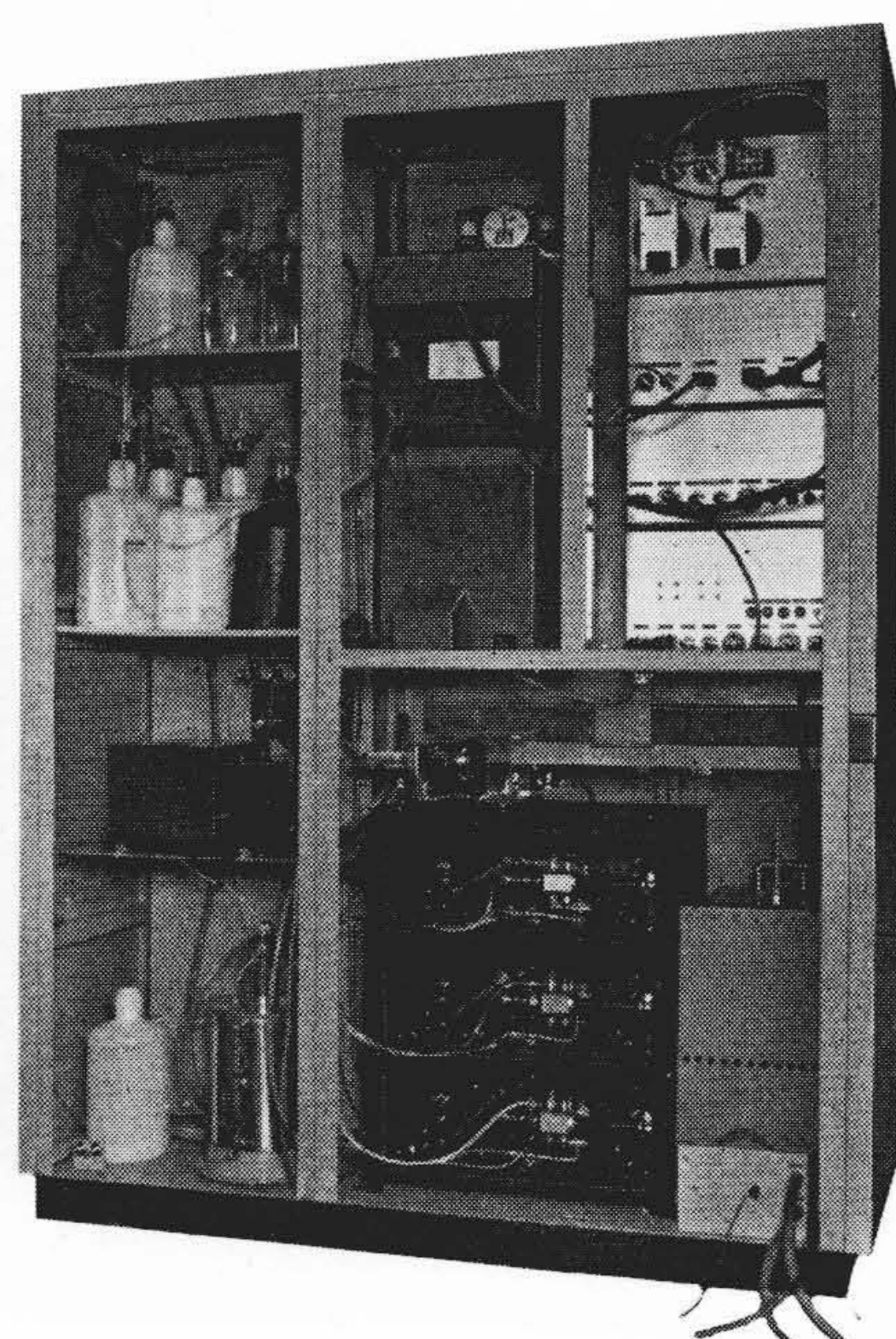
日立製作所では、このような各界の要望に応じて、KLA-2 形アミノ酸分析計を設計した。また、さきに京都大学理学部において、容量分割方式の自動液体クロマトグラフ装置を試作して⁽²⁾、液体クロマトグラフィの自動化に対して、多くの知見を得ているので、その協力のもとに製品化を企図し、昭和37年5月それを完了した。第1図および第2図にその外観を示す。

2. 分析計の原理と概要

アミノ酸のイオン交換クロマトグラフィは、第二次世界大戦中およびその後非常に発達したイオン交換樹脂を用いる液体クロマト



第1図 KLA-2 形日立アミノ酸分析計
外観（正面）



第2図 KLA-2 形日立アミノ酸分析計
（裏面）

グラフィの一つで、主としてロックフェラー研究所の H. Stein 氏と S. Moore 氏 によって研究されてきたが、最近になって、自動化に適するよう比較的簡単な操作で全アミノ酸の分析ができるように改良された⁽³⁾。

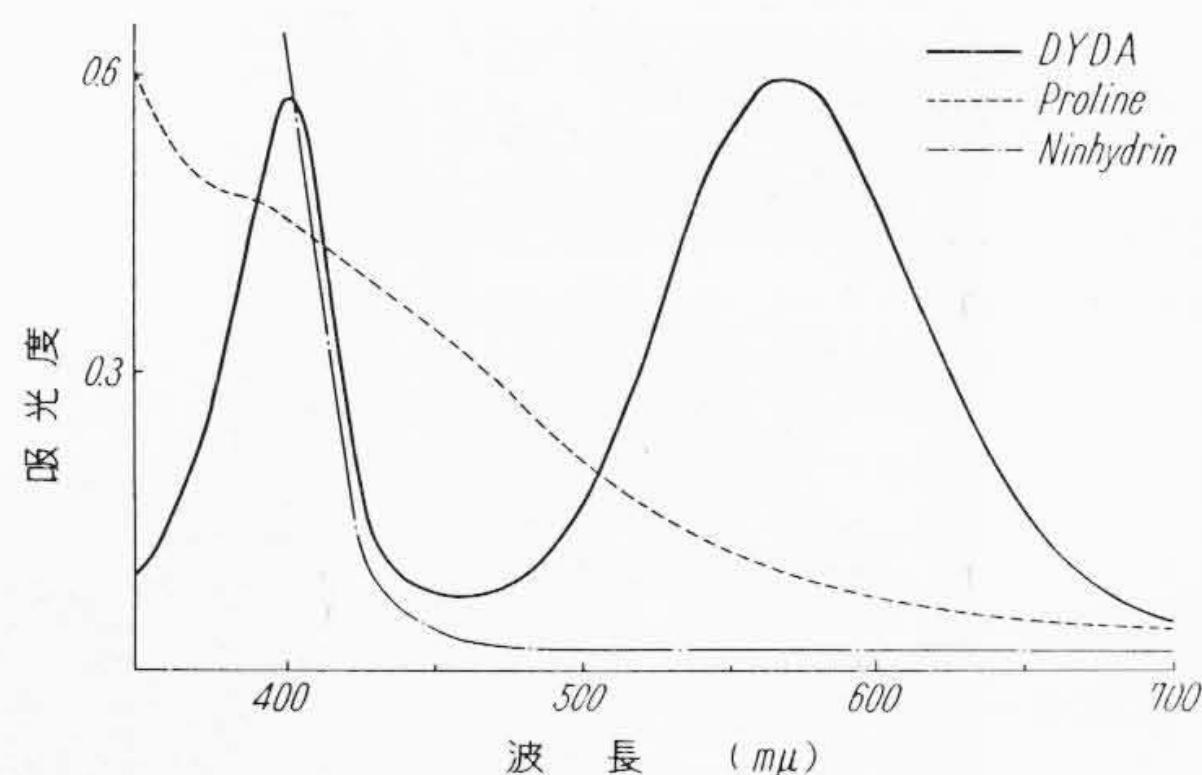
従来、行なわれてきたアミノ酸のクロマトグラフィは、アミノ酸をエステル化して、澱粉(でんぷん)柱でクロマトグラフを行なうものとか、Dowex を用いる比較的めんどうな緩衝液や、温度の切り換えを必要とするものであった。本分析計においては、カチオン交換樹脂 Amberlite CG-120 の 15cm および 150cm のカラムを用いており、15 cm カラムによって塩基性アミノ酸を分析するときには1種類の緩衝液を、150 cm カラムによって酸性および中性アミノ酸を分析するときには、2種類の緩衝液を必要とするのみで、温度切り換えは全く必要としないという簡単な方法を標準法とするものであって、プログラム装置としても複雑なものを必要としない。また分析前後の樹脂の体積変化が小さいので、カラムのつめかえは、特別な事情がないかぎり長期にわたって必要としない。

このカラムの上部に吸着されたアミノ酸の混合物は、30 ml/h で添加するクエン酸緩衝液によって順次溶離され、カラムの下端より溶出してくる。15 cm カラムによる塩基性アミノ酸のクロマトグラフィは、最後に溶出するアルギニンまで約5時間、150 cm カラムに

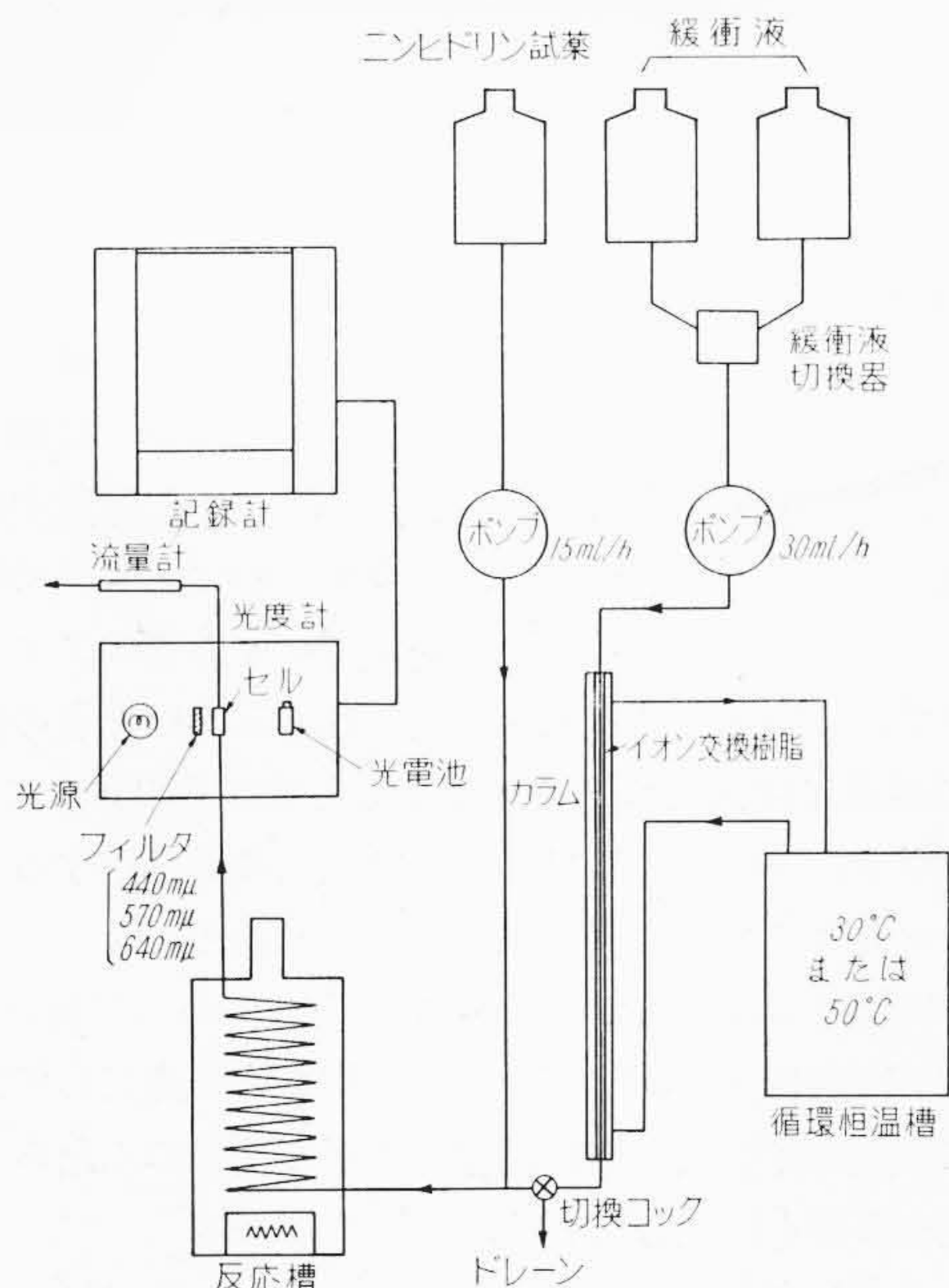
* 京都大学理学部化学教室 理博

** 京都大学理学部化学教室

***日立製作所那珂工場



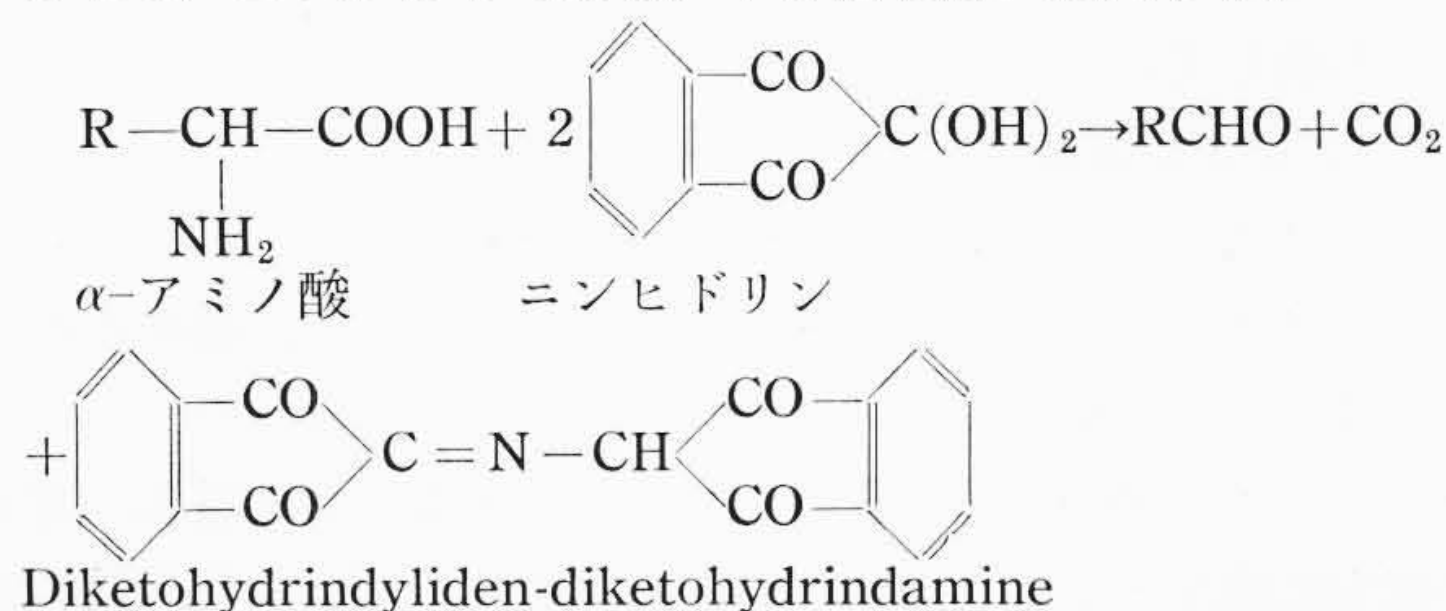
第3図 DYDAの吸収スペクトル



第4図 アミノ酸分析計、ブロックダイアグラム

よる酸性および中性アミノ酸のクロマトグラフィは、フェニルアラニンまで約17時間で終了する。

アミノ酸を分離溶出した緩衝液は、カラムを出た後、15 ml/h で送られてくるニンヒドリン試薬と混合し、反応槽（蒸留水を常時沸とうさせて、100°C としてある）中を通る間に発色する。



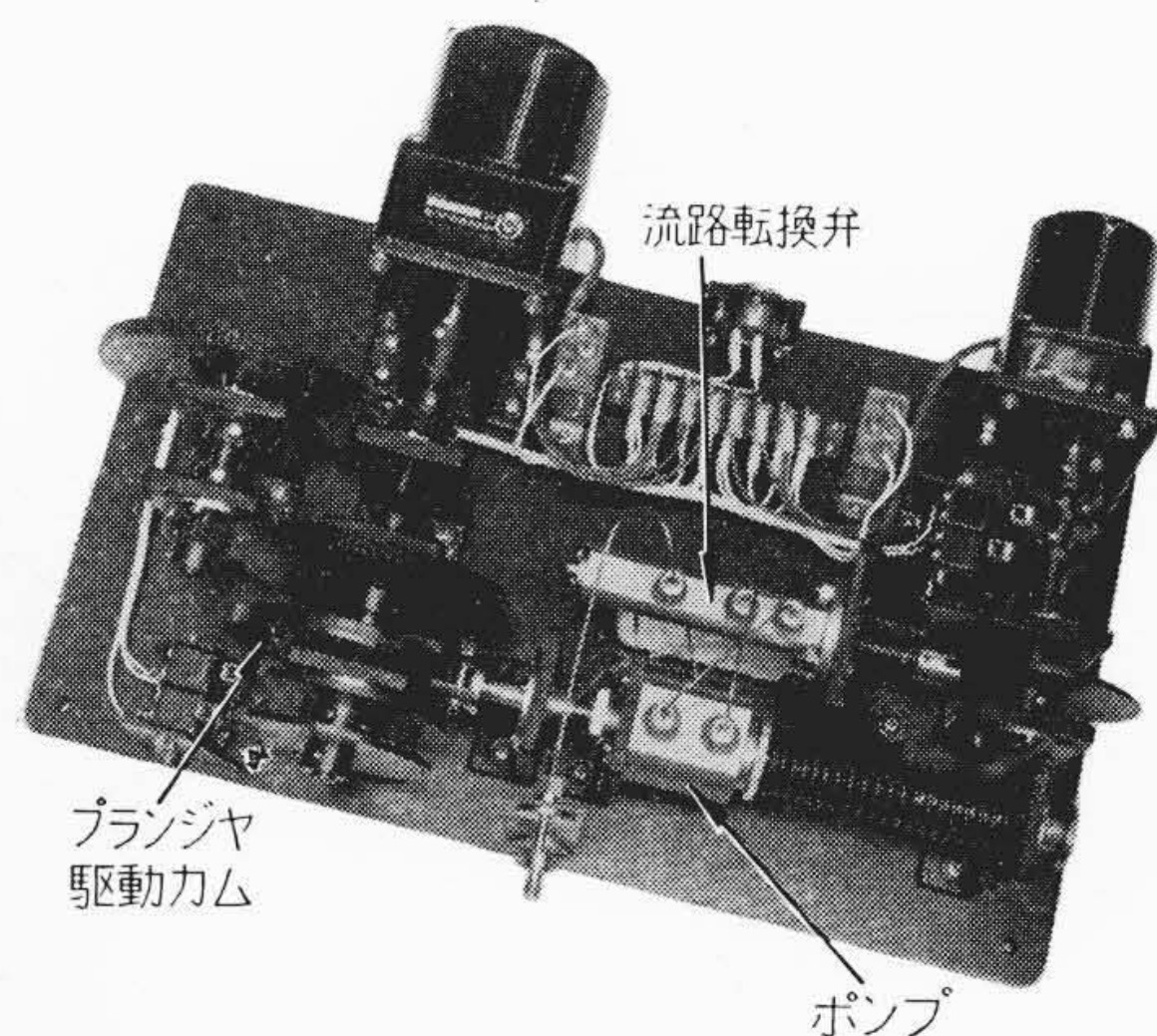
α -アミノ酸は上式に従って反応し、紫色の Diketohydrindyliden-diketohydrindamine (DYDA) を与える。このものの吸収曲線は第3図に示すとおりであるが、アミノ酸によっては少し異なった曲線を与える。発色した液は、光度計の吸収セル中を流れ、その吸光度が測定記録される。

この分析計は、この原理に基づいて設計製作されたもので、第4図に示すように、溶媒および試薬を送液する微量定量ポンプ、クロマトグラフカラム、反応槽、光度計、記録計、循環恒温槽、電動弁、プログラムドラムなどからなっている。これらの各部分について以下に詳述する。

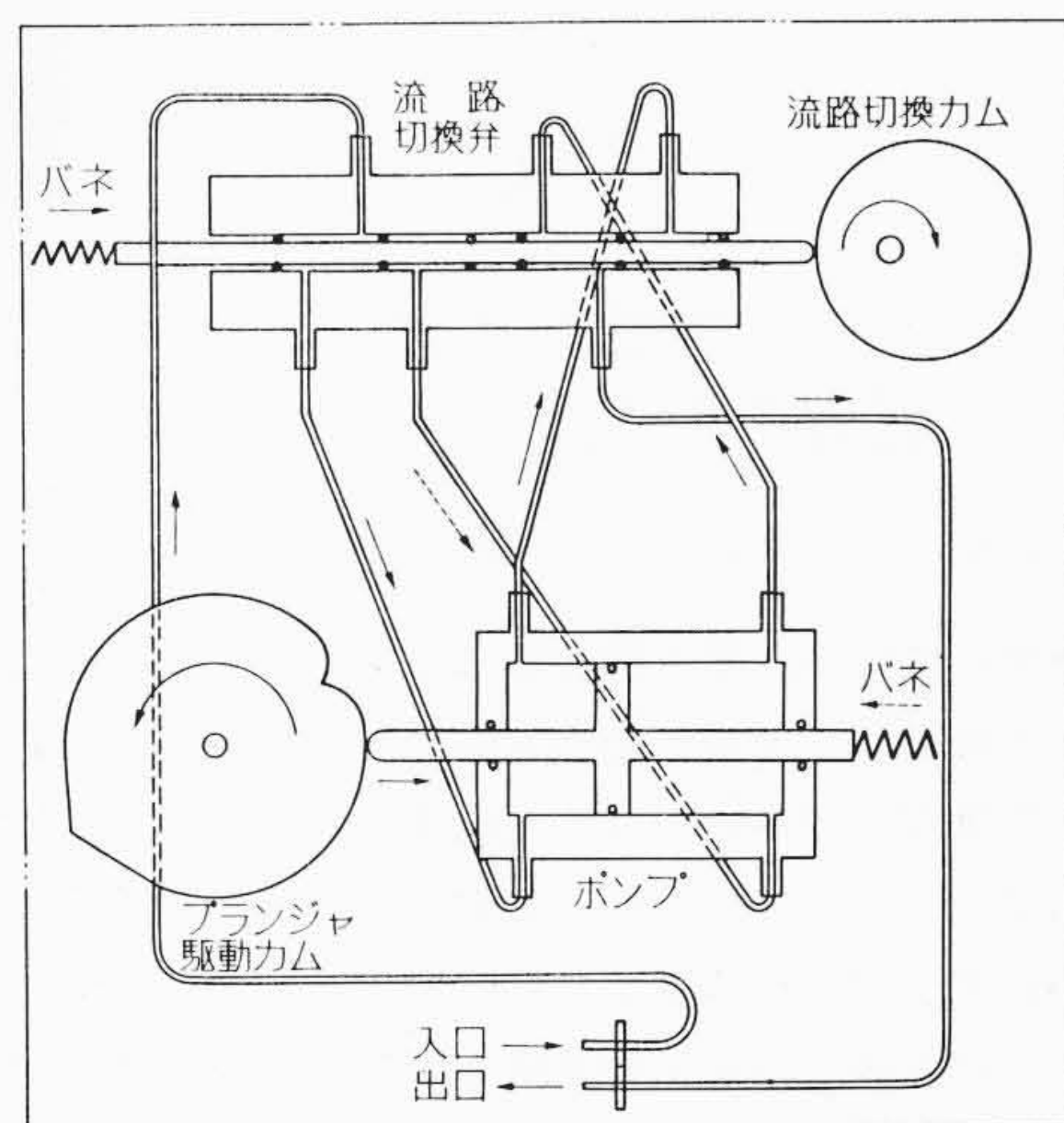
3. 構造および機能

3.1 微量定量ポンプ

クロマトグラフィを自動化する方式として Simmonds 氏⁽¹⁾および



第5図 微量定量ポンプの外観



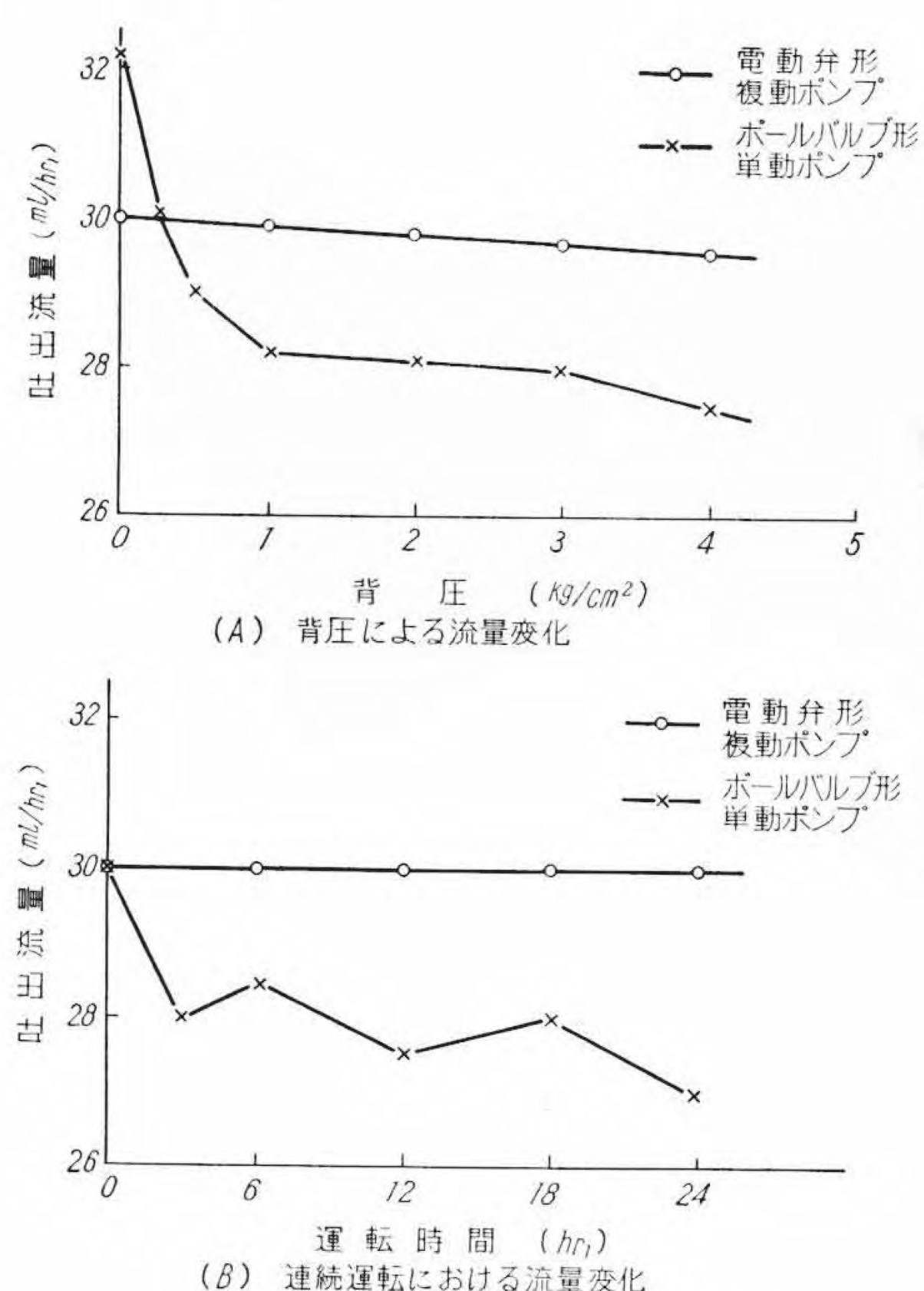
第6図 微量定量ポンプ原理機構

江頭⁽²⁾の容量分割方式と Spackman 氏⁽³⁾らの連続流動方式とが考えられるが、前者は連続溶出液を一定量に分割して発色定量するため分析精度は高いが、分割数を十分多くすれば分析に時間を要する。後者は一定流速の溶出液に対し一定流速の発色剤溶液を混合し連続的に比色定量するため分析の所要時間は最小限に短縮される。後者の分析精度は溶出液および発色剤溶液を一定流速で送り出すポンプの流量の安定性に依存するが、従来このような用途に適するきわめて微量な定量ポンプは作られていなかったため、連続流動方式は一般に分析精度が劣るものと考えられていた。

KLA-2 形アミノ酸分析計に用いられている微量定量ポンプはこの目的に特に設計されたポンプであって、安定した流量を得ることができるため、この装置で記録された記録値（すなわちクロマトグラム）はきわめてよい再現性を示している（第5図はその外観を示す）。

第6図は本装置に用いられている微量定量ポンプの動作説明図である。プランジャの往復とも送液する複動式のポンプを用い、プランジャはカージオイド形カムによって等速往復運動を与えられ、往復の終点においてポンプの流路を急速に切り換えることにより、一定流速を維持させている。流路の切り換えはプランジャ駆動カムと同軸にある別のカム（図に示していない）によってマイクロスイッチを動作させ、流路切換カムを回転するモータを駆動させる。流路切換カムは切り換えのつど 180 度回転して自動的に停止する。ポンプのプランジャおよび流路切換弁のプランジャはいずれもフッ素ゴムの O リングをもち、液漏れを防止している。

第7図はこの複動ポンプと従来の形式の単動ポンプとの流量の安定性の比較を示す。単動ポンプはプランジャ径 6.4 mm、毎分 14 ストロークの可変ストロークポンプで、出入口の弁にはそれぞれボー



第 7 図 微量定量ポンプ性能比較

ルバルブを用いている。第 7 図(A)に見られるとおり、このポンプは背圧の変化に従って流量が相当大幅に変動するが、これはボールバルブの動作状態が背圧によって変化することが最大の原因と考えられる。本装置に用いられている複動ポンプは背圧変化 0~5 kg/cm² に対しわずか 0.3% の流量変化を生ずるにすぎない。両者のポンプをほぼ一定の背圧のもとで連続運転した結果は第 7 図(B)のように、安定性においてはなほだしい相異を生じることがわかった。単動ポンプが不安定な理由はポンプ自体によるものではなく、やはりボールバルブの動作状態が変化するためと思われる。本装置に用いた複動ポンプはきわめて安定な流量をもち、クロマトグラフィ溶出液ポンプとして適していることがわかる。

3.2 クロマトグラフカラム

クロマトグラフカラムは 4 本あり、そのうち 2 本は 150 cm カラムで、ほかは 50 cm と 15 cm カラムで、内径はいずれも 0.9 cm である。150 cm カラムは酸性および中性アミノ酸用で 2 本を交互に使用する。15 cm カラムは塩基性アミノ酸用、50 cm カラムは、生体成分のように、通常のアミノ酸以外の多種類の塩基性物質が存在する場合のためのものである。第 2 図のブロックダイアグラムに示したようにカラムの外側には外套管を設け、循環恒温槽から送られる恒温水により一定温度が保たれるようになっている。イオン交換樹脂として Amberlite CG-120 Type III を用い、特にこの目的のために精製ふるいわけしたものをを用いる。

3.3 反 応 槽

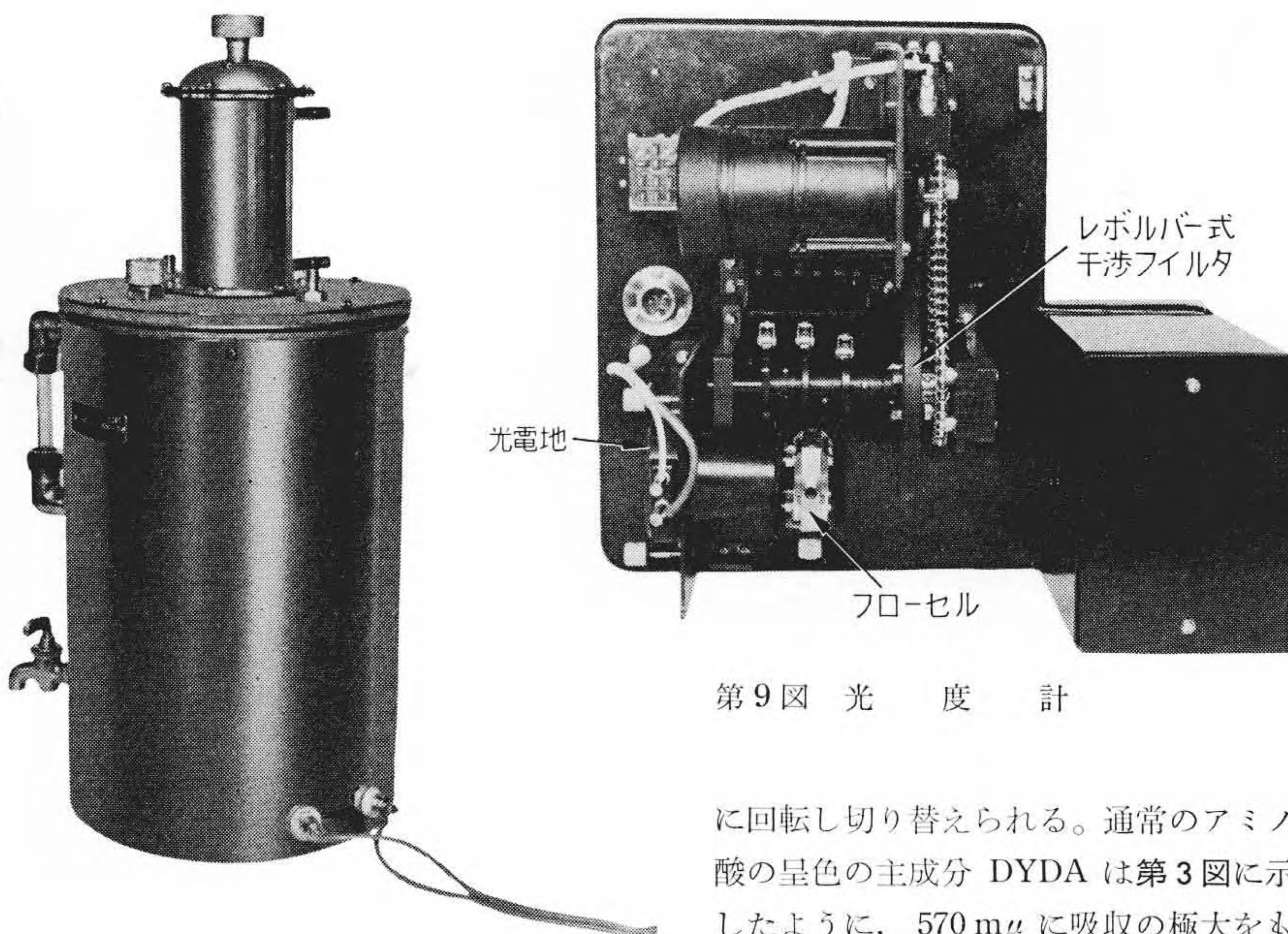
内径 1 mm、長さ 14.5 m のフッ素樹脂管を沸騰水浴中に浸したものである。ニンヒドリン試薬と混合された溶出液は 15 分かかって、この管中を通過する。

第 8 図は反応槽を示す。水浴には蒸留水を用い、500 W のヒータで沸騰させている。上部には凝結器を有し、水の蒸発減少を防いでいる。凝結器は水道水を通じ冷却させるようになっているが、水道水が断水した場合に自動的にヒータ電源が切れ、同時に警報ブザーが鳴るようになっている。

3.4 光 度 計

セレン光電池と干渉フィルタを用いた流動式の光度計である。

干渉フィルタは 440, 570, 640 mμ の 3 枚がレボルバーに 120 度の間隔で取り付けられていて、記録計から送られる信号により周期的



第 8 図 反 応 槽

第 9 図 光 度 計

に回転し切り替えられる。通常のアミノ酸の呈色の主成分 DYDA は第 3 図に示したように、570 mμ に吸収の極大をもつので、570 mμ のフィルタで測定される。640 mμ のフィルタはアミノ酸の含

量が多過ぎて、570 mμ のピークが定量に適しないときの補助に用いる。この波長では通常のアミノ酸の呈色物は 570 mμ の約 0.4 倍の吸光度を示す。440 mμ のフィルタは黄色の発色をするプロリンおよびオキシプロリンの定量のためのものである。

吸収セルは厚さ 2 mm で、液は下から上へ向かって流れる。

光源ランプは定格 6V5A であるが、約 5V で点灯している。また、点灯には定電流装置を用い、電源電圧の変動のみならず、回路の接触抵抗の影響も防止している。

3.5 記 録 計

記録計には VKP₃₂ 形日立電子管式記録計を用いている。チャート幅は 150 mm で、吸光度目盛をもち光度計の 440, 570, 640 mμ のおのおのによる試料の吸光度を波長ごとに打点記録する。また一つの波長について 4 点ごとに×印を打点するようになっており、定量の際、打点の数を数えるのに便利にしてある。打点間隔は 7.5 秒で、これと同期して光度計のフィルタを切り替えるための信号を発する装置を内蔵している。

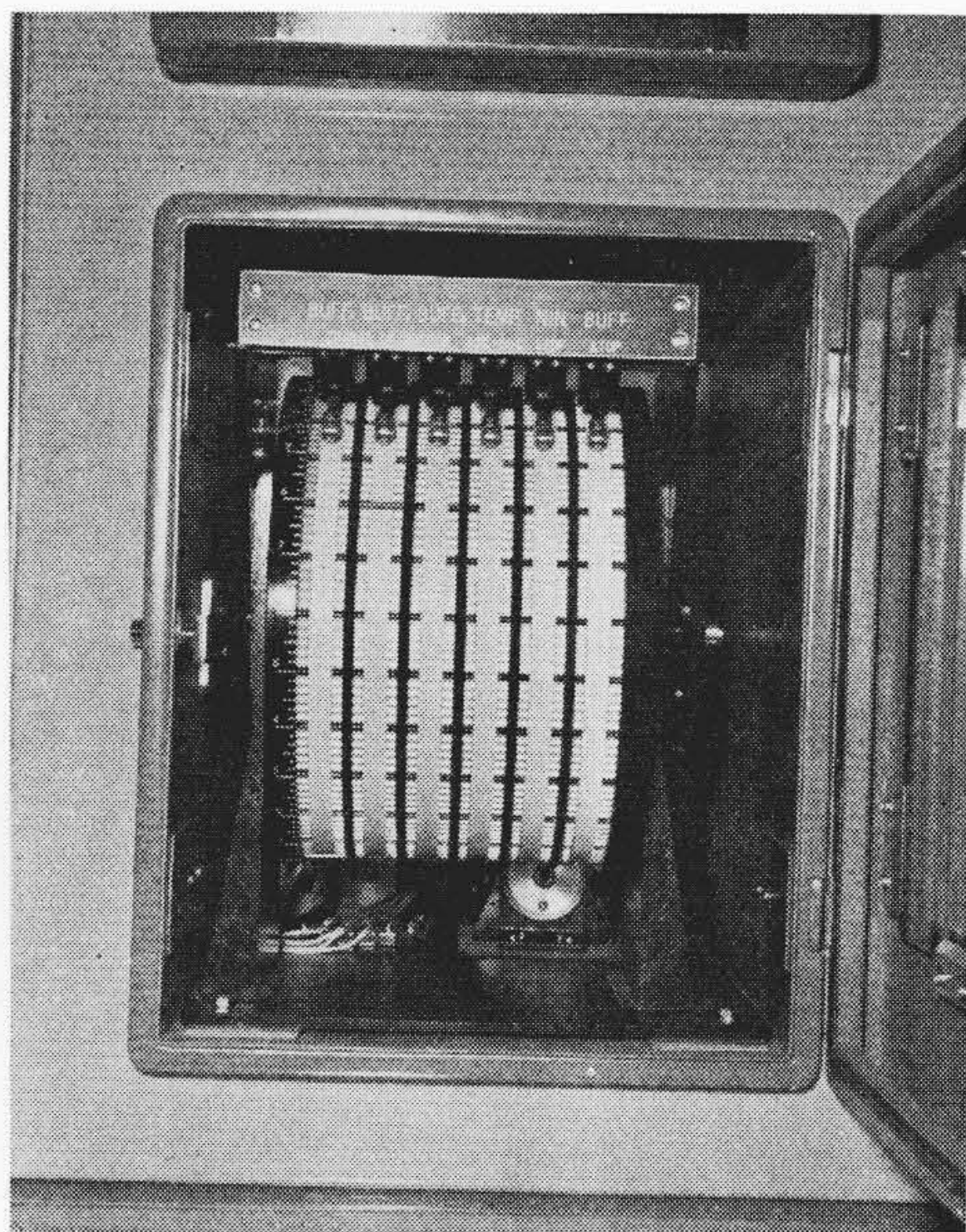
3.6 プログラム装置

本分析計による全アミノ酸の分析は、約 22 時間を要するが、その間、サンプリングを除いてニンヒドリンの送液停止、緩衝液の切り換え、温度の切り換えおよび全操作の停止などを所定のプログラミングに従って自動的に行なうのが本装置である。本装置は、簡易、かつ確実に動作することを主眼に、プログラムドラムと継電器回路から構成されている。プログラムドラムは時計機構により 24 時間で 1 回転する。

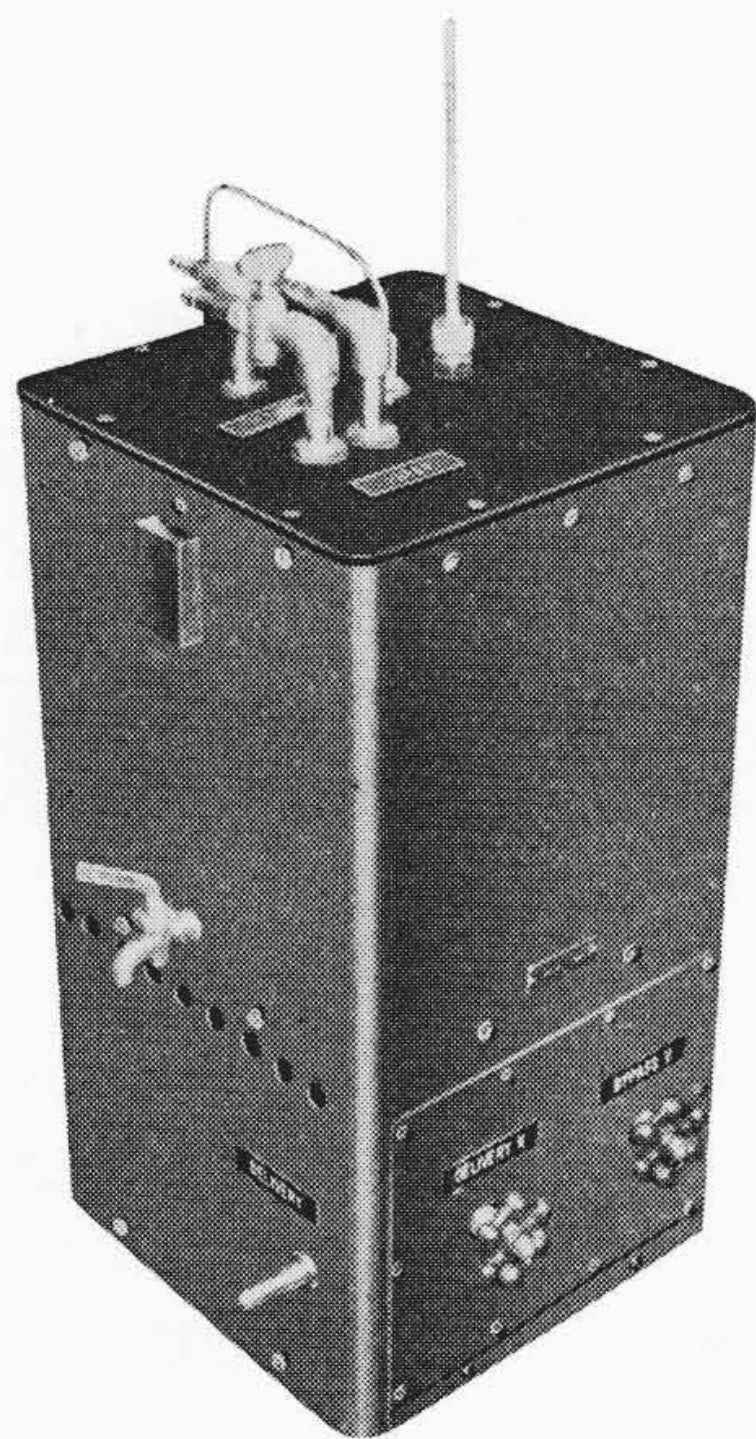
プログラムドラムの表面は、第 10 図に示したように 10 分ごとに刻まれたみぞがあり、このみぞにマグネット棒を付着させて、動作時刻の設定が行なわれるようになっている。みぞは 6 列あり、第 1 列~第 3 列までは緩衝液の切り換え、第 4 列はカラム温度の切り換え、第 5 列はニンヒドリンの送液停止、第 6 列は全動作の停止に充てられている。

第 11 図は、これらの動作機構の系統を示したものである。その動作の一例を緩衝液の切り換えについて説明する。

今、図ではプログラムドラム第 1 列のマグネット棒が、マイクロスイッチ 1 を ON にして弁切換カムを駆動させ、同軸上にあるカムによりマイクロスイッチ 1' を切り、カム駆動モータを停止させたところである。



第 10 図 プ ロ グ ラ ム ド ラ ム



第 12 図 循 環 恒 温 槽

この状態では、マイクロスイッチ 2' および 3' は ON になっているので、次にマイクロスイッチ 2, あるいはマイクロスイッチ 3 のいずれかが ON になればモータが駆動し、弁の切換動作が行なわれる。ほかの 4, 5, 6 のマイクロスイッチは、いずれもそれぞれに接続するキープリレーを動作させて、所定のプログラミングを行なうようになっている。

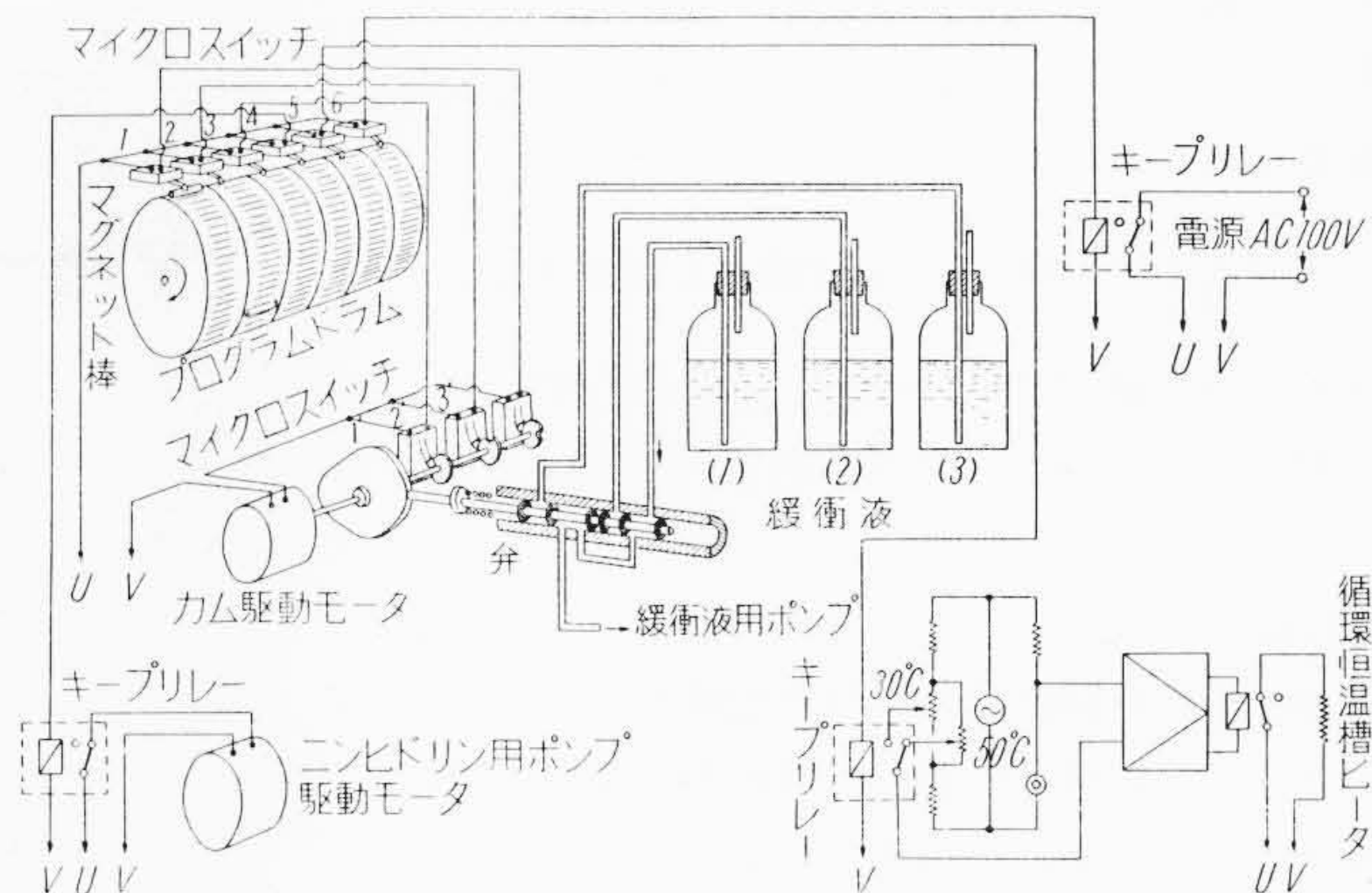
3.7 循環恒温槽

イオン交換クロマトグラフにおいては、カラムの温度を一定に保持することが特に肝要なので、サーミスタ式の自動温度制御装置を持った恒温槽の水を、ポンプでクロマトグラフカラムの外套管中に循環させるようになっている。ヒータは 500 W である。温度は、30°C と 50°C の二種に切り替えることができ、30°C から 50°C に切り替えてから約 40 分で恒温に達する。なお、この操作は上に述べたようにプログラム装置によって自動的にも行なわせることができる。第 12 図は循環恒温槽を示す。本装置の温度制御精度は $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 以内である。

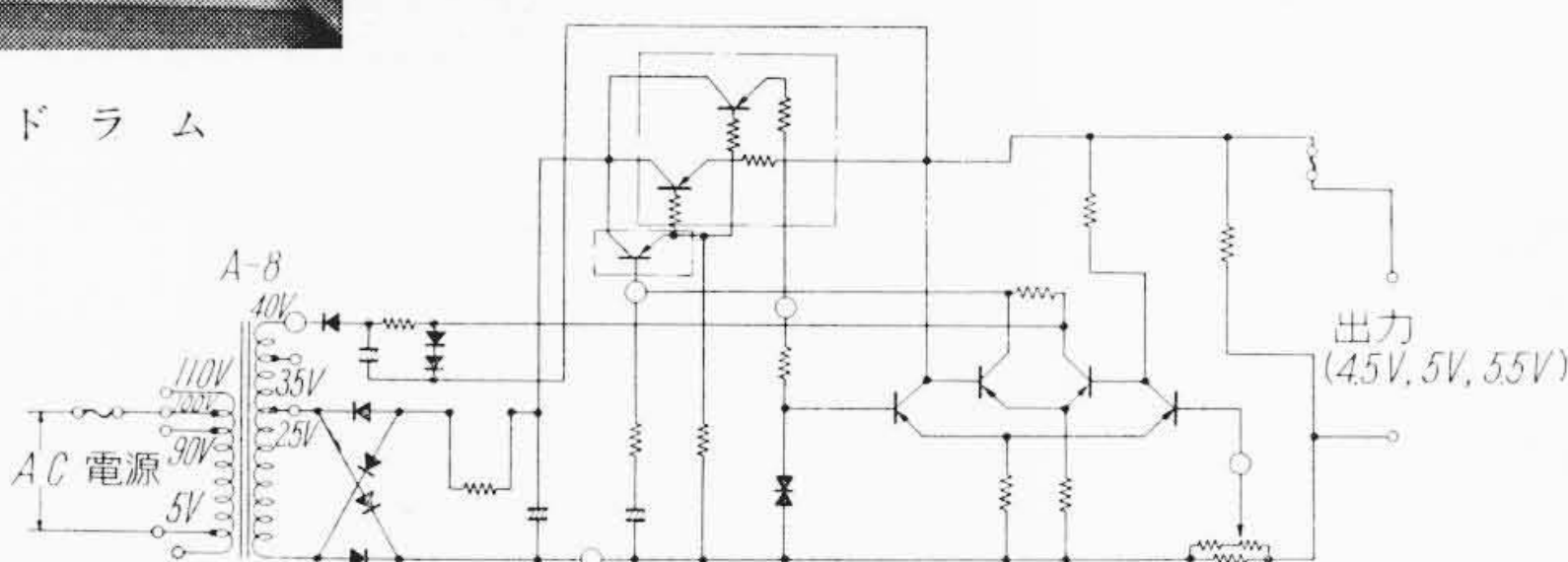
3.8 電 源 部

光度計の光源ランプの電源として、全トランジスタ式の直流定電流装置を用いた。結線を第 13 図に示す。

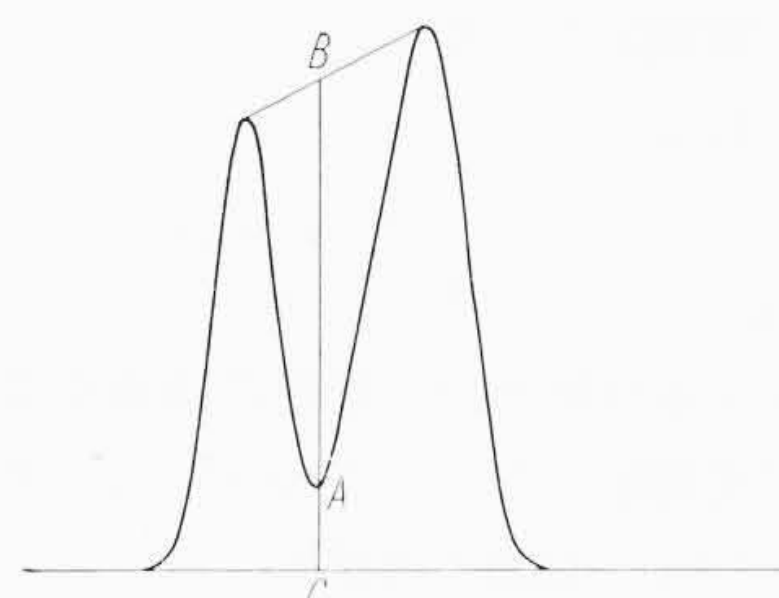
本装置は $100\text{V} \pm 10\%$ 、 $50 \sim (60) \pm 1\%$ の電源変動に対し出力



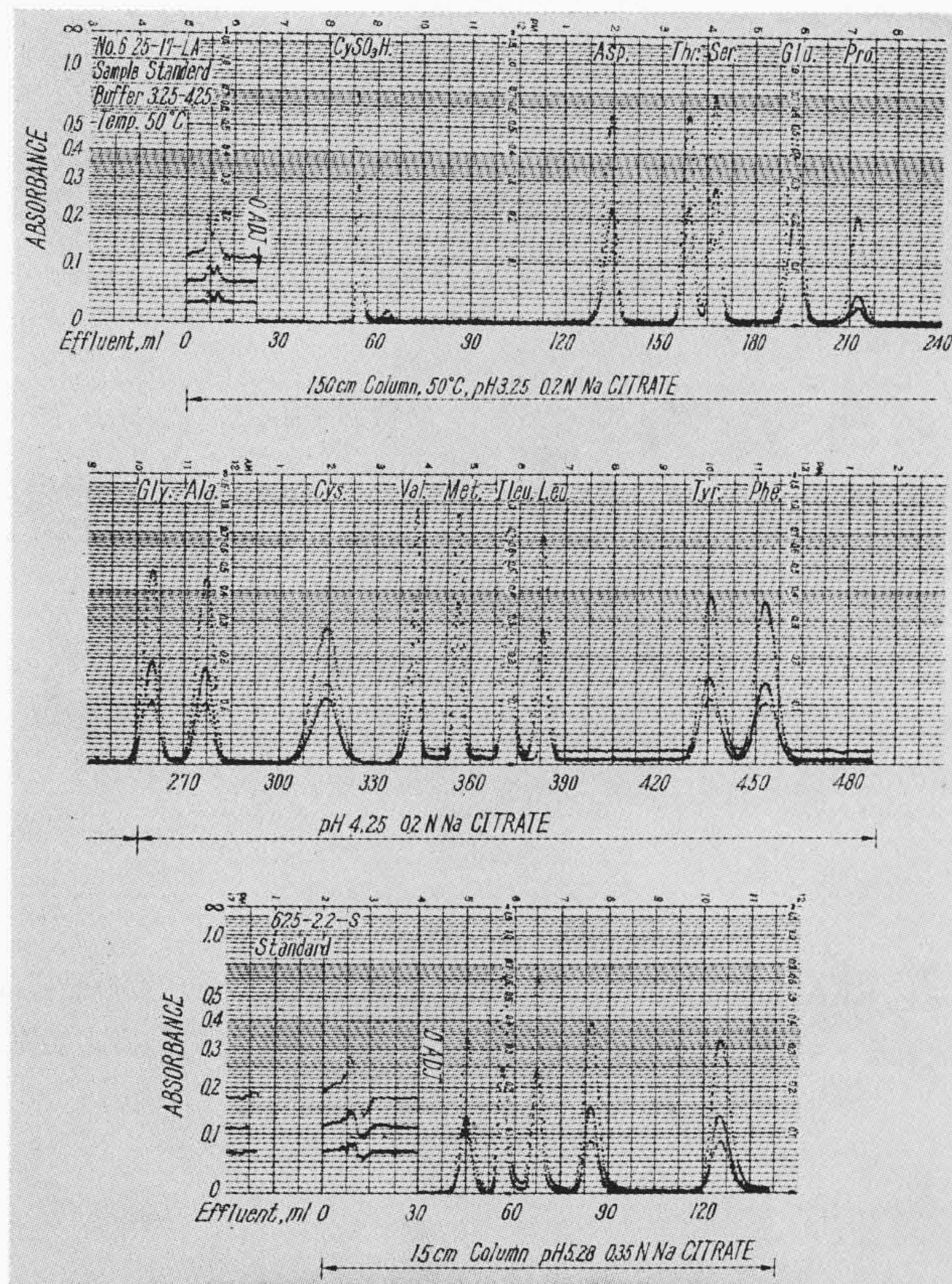
第 11 図 プログラム装置動作系統図



第 13 図 光度計電源部結線図



第 14 図 分離精度



第 15 図 標準アミノ酸混合物の分析

電流の安定度は 5×10^{-4} 以下である。

4. 総 合 特 性

本分析計の総合的精度を次のように表わす。

(1) 分離精度 分離精度は次のように定められている。

第 14 図において近接両ピークの谷の底点 A から両ピークの頂

点を結ぶ直線へ、両ピークの基線に垂直にたてた直線 AB と、その直線と基線との交点を C としたときの直線 BC との百分比

$$S = \frac{AB}{BC} \times 100 \quad S \text{ を分離率と定義する。}$$

本分析計の分離率 S は一般に分離がむずかしい Ser と Thr とのピークの間で測定し、95% 以上である。

(2) 位置の再現性

各成分の溶出時間はその成分の定性的尺度となるものである。その成分の溶出位置の再現精度 R は、同一カラム、同一条件で溶出した場合について次のようにあらわされる。

$$R = \frac{\sigma_r}{r_m} \times 100$$

ここで、 σ_r は溶出位置測定の標準偏差、 r_m は n 回測定の平均値であって σ_r は次式によって求められる。

$$\sigma_r = \sqrt{\frac{\sum (r_i - r_m)^2}{n}} \quad r_i = \text{測定値}$$

本分析計の位置の再現精度は Val のピークについて測定したところ 0.5% 以下であった。

(3) 面積の再現性

クロマトグラムの各ピーク的面積はその成分の量に比例する。同一の条件でその成分の示すピーク的面積の再現精度 A は次のようにあらわされる。

$$A = \frac{\sigma_a}{a_m} \times 100$$

ここで σ_a は面積測定の標準偏差、 a_m は n 回の測定における平均値であって、 σ_a は次式によって求められる。

$$\sigma_a = \sqrt{\frac{\sum (a_i - a_m)^2}{n}} \quad a_i: \text{面積測定値}$$

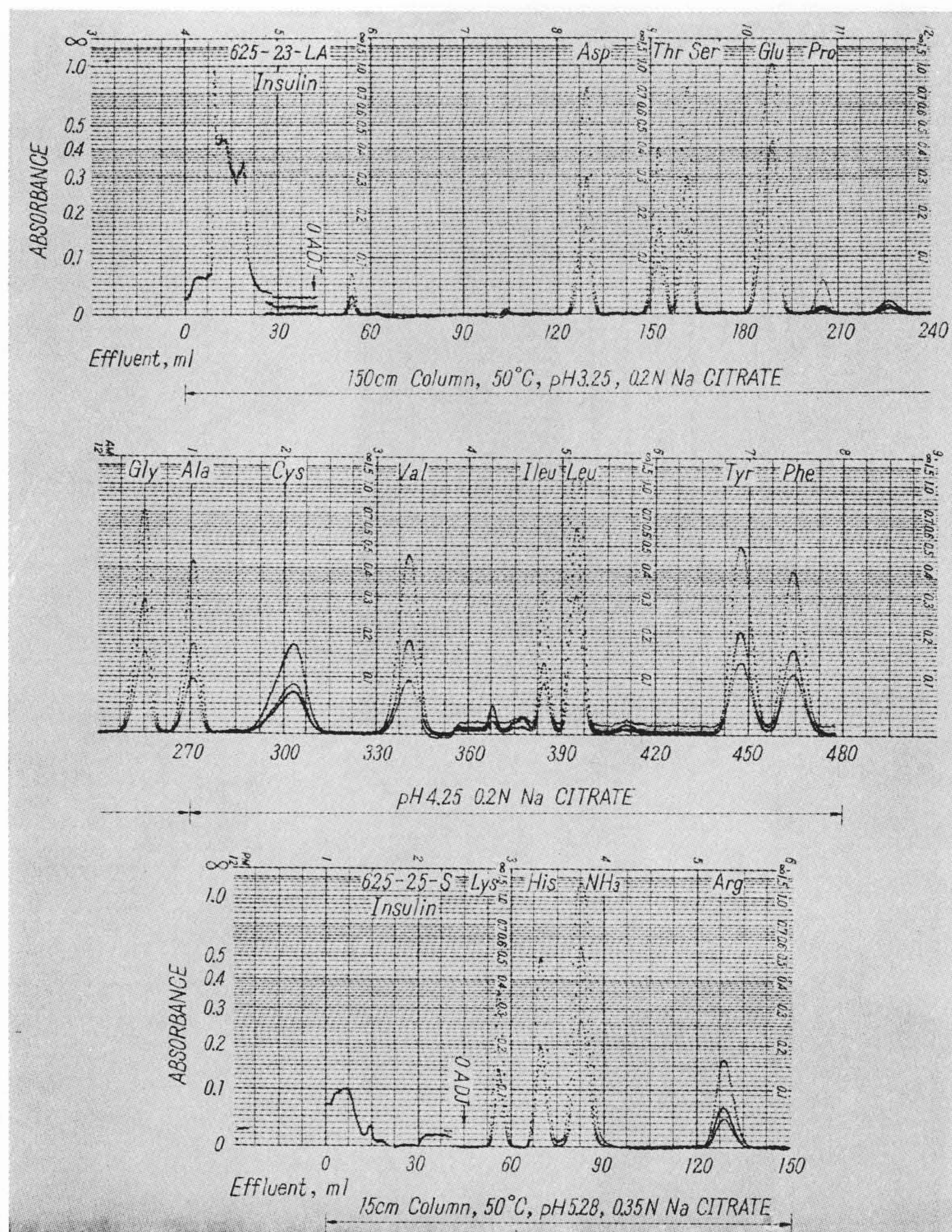
本分析計によるピーク面積の再現精度は Glu について測定し 1% を得た。

5. 分 析 例

第 15 図は標準アミノ酸混合物の分析結果である。第 16 図には、実際の応用例として、インシュリンの酸加水解物の分析結果を示す。

6. 結 言

以上、KLA-2 形日立アミノ酸分析計の概要を述べた。この装置は微量定量ポンプ、カラム、反応槽、光度計、記録計、電源安定装置、



第 16 図 インシュリンの分析例

およびプログラマーなどの単なる組み合わせとみることもできるがクロマトグラフィの厳密な再現性のほかに、発色操作による比色定量性を、あわせ要求されているので、液体クロマトグラフ装置のうちでも、最も自動化の困難な装置と目されていた。微量定量ポンプの完成によってその製品化に成功したが、今後、この装置を発展させて、アミノ酸分析計以外の各種液体クロマトグラフ装置を完成したい。

参 考 文 献

- (1) D. H. Simmonds: Anal. Chem., 30, 1043 (1958)
- (2) 江頭: 分析化学 10, 693 (1961)
- (3) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore: Anal. Chem., 30, 1191 (1958)