Fig. 4 Diffraction pattern of the powdered sample obtained by μ -XRD (after preconcentration)

① α -Al, ② δ - Al_3Ni_2 , ③ Mg_2Si , ④ ϵ - Al_3Ni

晶系の Mg_2Si 相の存在を明らかに確認することができた。

4 考 察

以上のように母相の溶解分離を伴う μ -XRD 測定により本 Al 合金中の析出相は前記 3 相の金属間化合物で構成され、その量的関係は回折ピーク強度から、 δ - $\text{Al}_3\text{Ni}_2 \gg \text{Mg}_2\text{Si} > \epsilon$ - Al_3Ni の順となっていることが分かった。

又、3・5 と反射電子像観察結果 (3・2) との対応から、反射電子像における析出相 [2] は δ - Al_3Ni_2 、[3] は Mg_2Si 、[4] は ϵ - Al_3Ni に相当することが判明し、反射電子像として観察された微小析出相をすべて μ -XRD 法で同定できたことが確認された。

5 結 語

Al 合金中の微小析出物を同定分析するために析出物のみを分離濃縮して μ -XRD 法を適用する方法について検討し、下記の点が明らかになった。

(1) 析出物のみを分離濃縮する溶液として水酸化ナトリウム 1M、塩酸 1M 及びフッ化水素酸 0.5M の各水溶液につき溶解時間を含め検討した。この結果水酸化ナトリウム溶液 1M による 20~30 分間溶解が最適と判明した。

(2) 上記最適条件での前処理により 2~5 μm の微小析出物 3 種、 δ - Al_3Ni_2 、 Mg_2Si 、 ϵ - Al_3Ni が同定できた。

この結果は反射電子像観察による微小析出相 3 相すべてにそれぞれ対応していた。

既に述べたように粒径 10 μm 以下の微小物、数十 μg

の微量物の同定分析を行うに当たり本前処理技術は実用的であり、広範囲に応用し得ると思われる。

文 献

- 1) 三浦 仁：“X 線分析の進歩” XV, 日本分析化学会 X 線分析研究懇談会編, p. 135 (1983), (アグネ技術センター)。
- 2) 日本金属学会編：“金属組織写真集”, p. 34 (1972)。

☆

Identification of very small precipitates in aluminium alloy by micro focused X-ray diffraction technique. Isao SUZUKI and Tsutomu YAMASHITA (Materials Application Department, Toshiba R/D Center, Toshiba Corporation, 1, Komukai-Toshibacho, Saiwai-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 210)

New method for identification of very small precipitates in an extruded Al alloy bar is discussed in this paper. Precipitates are corrected using selectively etching of Al matrix phases by 1M NaOH solution at room temperature for 30 min. Micro focused X-ray diffractometer with curved position sensitive proportional counter was used to identify these very small precipitates. The precipitates usually remain on the specimen surface as granule shape about 2~5 μm in diameter, and then they are scraped up and held on a glass rod tip with liquid adhesive, subjected to X-Ray diffraction analysis.

(Received June 19, 1987)

Keyword phrases

micro focused X-ray diffractometer; identification of precipitates in Al alloy; etching of Al matrix phase by sodiumhydroxide solution.

ヨウ化物及びチオシアン酸の蛍光接触 定量のためのゲルクロマトグラフィー による除タンパク法

田中 明[®], 今坂 洋一,
林 加代, 出口 俊雄^{*}

(1987 年 5 月 25 日受理)

1 緒 言

最近、薬物分析のための試料の前処理方法が研究されているが^{1)~9)}、本研究ではゲル濾過法による、ヨウ化

^{*} 熊本大学理学部化学科：860 熊本県熊本市黒髪 2-39-1

物、チオシアン酸、リゾチームの分離法を検討した。ヨウ化物、チオシアン酸は離液性の強い、特徴あるイオンである¹⁰⁾。ゲル透過クロマトグラフ用充てん剤は除タンパク後の再生が不要で、限外透過法や沈殿法など他の除タンパク法に比べて、FIA, HPLC などのフロー系内への組み込みが容易である。ヨウ化物及びチオシアン酸は $\text{Ce(IV)}-\text{As(III)}$ の酸化還元系での接触反応を蛍光法により検知・定量した¹¹⁾¹²⁾。タンパク質試料にはタンパク質のなかでは分子量の最も小さなリゾチームを用いた。

2 実験

2.1 充てん剤・試薬

充てん剤：膨潤後のデキストラン系ゲル（ファルマシア, Sephadex G-10, G-15, G-25 Superfine, G-50 Superfine, LH-20）の懸濁液を充てん器に入れ、内径8 mm, 長さ 25 cm のガラスカラムに内径 0.1 mm, 長さ 5 m の背圧用のチューブを接続し、0.3 M 塩化ナトリウム溶液を 2.5 ml/min (26 kg/cm^2) で送液して充てんした。

リゾチーム溶液：リゾチーム（和光純薬工業、卵白製）をイオン交換蒸留水に溶解、調製し、冷蔵保存した。

セリウム溶液：硫酸 Ce(IV) アンモニウム・4水和物（関東化学）を 2 M 硫酸に溶解、2 mM 溶液とした。

ヒ素溶液：三酸化二ヒ素（亜ヒ酸）（キンダ化学）に水酸化ナトリウムを同重量加えて、少量のイオン交換蒸留水に溶解し、希釈水冷後、濃硫酸を加えて、20 mM As(III) -2 M 硫酸溶液を調製した。

Ce 溶液, As 溶液, 溶離液はすべて特級試薬を用いて調製した。

Fig. 1 Schematic diagram for deproteinization-catalytic fluorometry

(A) 0.3 M NaCl , 1.3 ml/min; (B) 2 mM Ce(IV) -2 M H_2SO_4 , 0.5 ml/min; (C) 20 mM As(III) -2 M H_2SO_4 , 0.5 ml/min; (D) injector, 200 μl ; (E) gel filtration column, 25 cm $\times$ 8 mm i. d.; (F) reagent mixing tubing of "string beads" type, 0.5 mm i. d., 1 m; (G) heating tubing, 60 $^\circ\text{C}$, 0.5 mm i. d., 10 m; (H) cooling tubing, 5 $^\circ\text{C}$, 0.5 mm i. d., 50 cm; (I) spectrofluorometer and integrator

2.2 装置

FIA 流路系を Fig. 1 に示す。送液には四連型全溶媒定量ポンプ（サスキ工業, 4P3M-4036）を用いた。インジェクターにはループ付きの切り換えバルブを用いた。検出器は分光蛍光光度計（日本分光, FP-110）又は、分光光度計（協和精密, KLC-2290）を用い、記録にはインテグレーター（日本分光, DP-L220）又は記録計（理化電機工業, R-22）を用いた。UV で検出する場合の流路系では、ポンプ、インジェクター、カラム、検出器の順に接続した。溶離液には 0.3 M 塩化ナトリウム溶液を用い、流量 1.0 ml/min で送液し、220 nm での吸光度を測定した。

2.3 除タンパク・接触蛍光定量操作法

Fig. 1 に示した装置に 0.3 M 塩化ナトリウム溶離液, Ce 溶液及び As 溶液を送液し、約 30 分間ウォームアップする。ベースラインが安定した後、ヨウ化物 (4 μM 以下) 及びチオシアン酸 (20 μM 以下) を含むタンパク質溶液, 200 μl を Fig. 1 のインジェクターより注入する。続いてヨウ化物及びチオシアン酸を検量線法又は標準添加法により定量する。

3 結果と考察

3.1 カラム充てん剤

G-10, G-15, G-25, G-50 及び LH-20 を用いてリゾチーム、ヨウ化物、チオシアン酸の分離条件を検討した。クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。又、リゾチームとヨウ化物の分離度及びヨウ化物とチオシアン酸の分離度を Table 1 に示したが、G-10, G-15, G-25 及び LH-20 ではヨウ化物・チオシアン酸とリゾチーム

Fig. 2 Typical chromatograms

Sample : 100 ppm lysozyme, 0.2 μM I^- , 20 μM SCN^- , 200 μl ; Column : 25 cm $\times$ 8 mm i. d.; Eluent : 0.3 M NaCl , 1.3 ml/min

Table 1 Resolution

G-10	G-15	G-25	G-50	LH-20	LH-20†
Lysozyme-I-					
2.47	2.78	1.64	0.72	2.00	1.84
I-SCN-					
1.03	0.60	0.26	0.08	0.83	0.87

Column: 20 cm×8 mm i.d.; Eluent: 0.3 M NaCl, 1.0 ml/min; Sample: 20 ppm lysozyme, 0.4 mM KI, 1 mM KSCN, 100 µl; Detection: UV, 220 nm. † Column: 20 cm×8 mm i.d.; Eluent: 2 mM potassium hydrogen phthalate, pH 6.0, 1.0 ml/min; Sample: 500 ppm lysozyme, 1 µM KI, 0.2 mM KSCN, 100 µl; Detection: fluorome-try, 254 nm (excitation), 350 nm (emission).

とが良好に分離され、特に G-10 では、リゾチームとヨウ化物、ヨウ化物とチオシアン酸が共に良好に分離された。

LH-20 及び G-10 はどちらもリゾチーム、ヨウ化物、チオシアン酸を良好に分離した (Fig. 2)。G-10 は LH-20 より試料成分をより良好に分離したが、分離時間は LH-20 よりもやや長かった。ただし、新たに充てんした G-10 カラムは、繰り返し使用するうちにピークが徐々に大きくなった。充てん直後の G-10 カラムではヨウ化物の定量性がやや劣るようであった。一方、LH-20 では充てん直後からヨウ化物とチオシアン酸のピークは両方とも安定していた。LH-20 のほうが、ヨウ化物のピーク高さが安定し、分離が迅速であったために、G-10 より利用しやすかった。

3.2 イオンクロマトグラフカラムとの連結

イオンクロマトグラフ (IC) カラムとの併用を考慮して、2 mM フタル酸水素カリウムを LH-20 カラムの溶離液に用いたところ、ヨウ化物・チオシアン酸とリゾチームとが良好に分離した。そこで LH-20 カラムの後に IC カラム (TSKgel IC-Anion-SW, 東洋曹達) を接続したところ、LH-20 カラムでは部分的にピークが重なっていたヨウ化物とチオシアン酸も良好に分離された。なお、タンパク質は IC カラムに不可逆的に吸着し、IC カラムを劣化させるので、LH-20 カラムにより分離されたリゾチームを、IC カラムの直前に取り付け流路切り換えバルブから FIA 系外に排出した。

IC カラム併用法では操作がやや煩雑になった。又、フタル酸溶液による溶離ではヨウ化物が塩化ナトリウム溶離液のときに比べ低めにでたことから、LH-20 へのヨウ化物の吸着が起きているようである。

なお、フタル酸溶離液を G-10 カラムに用いたところ、リゾチームのテイリングが著しく、ヨウ化物・チオ

シアン酸からリゾチームを分離除去できなかった。

3.3 溶離条件

充てん剤に G-10 を用いて各種溶離液を検討した。その結果、過塩素酸塩、塩化物塩、フッ化物塩、硫酸塩の順に、ヨウ化物及びチオシアン酸の溶出時間が大きくなったが、陽イオンによる差異はほとんどなかった。塩化物塩の溶離液を用いると 3 成分が良好に分離された。塩化ナトリウム溶離液の濃度が 0.1~0.5 M の範囲では試料成分の K_{av} 値¹³⁾に 10% 以上の変動は見られなかった $\{K_{av} \equiv (V_e - V_o) / (V_t - V_o)\}$ 。 V_e は試料成分の溶出体積、 V_o はゲル間げき体積 (又はゲル排除体積)、 V_t はゲル床の全体積である。しかし、塩化ナトリウム溶離液が 0.2 M 以下ではリゾチームのテイリングが起これ、ヨウ化物とリゾチームとの分離が悪くなった。従って G-10 カラムによる分離には 0.3 M 塩化ナトリウム溶離液を用いた。

3.4 検量線

Fig. 1 の装置を用いて、ゲル透過カラムからの流出液中のヨウ化物及びチオシアン酸を接触蛍光法により測定し、検量線を作成した。検量線は原点を通り、相関係数は 0.999、各測定相対標準偏差は 2% 以下であった。本研究における、蛍光法及び UV 検出法による定量範囲を Table 2 に示した。

Table 2 Determination range

	Fluorometry	UV
I-	30 nM†~4 µM	10 µM†~2 mM
SCN-	3 µM†~20 µM	50 µM†~3 mM

† Minimum detection limit at $S/N=2$

検量線が原点を通る直線であることは、LH-20 及び G-10 カラムからヨウ化物及びチオシアン酸が定量的に回収されたことを示している。LH-20 及び G-10 カラムからのヨウ化物及びチオシアン酸の回収率は 92~99% の範囲にあった。

3.5 共存化学種の影響

ヨウ素酸、亜硝酸、チオ硫酸、オキサル酢酸、シュウ酸、馬尿酸、ピルビン酸、リゾチームなどは Ce(IV)-As(III) 反応系で触媒作用を示さないが、Ce(IV) による酸化蛍光法¹⁴⁾により検知された。本検出系ではヨウ素酸の感度はチオシアン酸と同程度であったが、オキサル酢酸、シュウ酸、馬尿酸、亜硝酸、チオ硫酸の感度はチ

オシアン酸の 1/10 以下であった。これらの化学種は、ゲル透過カラムから、ヨウ化物やチオシアン酸より早く溶出し、定量を妨害しなかった。又、塩化物、Na, Ca, Mg, ケイ酸、グルコース、グルクロン酸、イミダゾール、ヒスタミン、グリシン、タウリン、ヒスチジン、乳酸、アルブミンは、ヒト尿中に含まれる程度共存しても、ヨウ化物及びチオシアン酸の定量を妨害しなかった。

文 献

- 1) J. Blanchard : *J. Chromatogr.*, **226**, 455 (1981).
- 2) H. Yoshida, I. Morita, T. Masujima, H. Imai : *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3827 (1982).
- 3) B. Olsson, H. Lundback, G. Johansson : *Anal. Chim. Acta*, **167**, 123 (1985).
- 4) 飯沼丈夫, 田原正義, 八代和子, 渡辺光夫 : 分析化学, **34**, 483 (1985).
- 5) 橋本 豊, 中井由実, 石橋正元, 宮崎 浩, 加藤肇, 内藤文雄, 服部 晃 : 分析化学, **35**, 225 (1986).
- 6) 林 奉権, 田村敦史, 吉田久信 : 分析化学, **35**, 230 (1986).
- 7) 村北宏之, 林 守正, 三上博久, 石田泰夫 : 分析化学, **35**, 236 (1986).
- 8) 玉井 元, 吉田久信, 今井日出夫 : 分析化学, **35**, 335 (1986).
- 9) 高橋裕明, 森山弘之, 松原健一, 深町 充, 海野益郎 : 分析化学, **35**, T22 (1986).
- 10) T. Deguchi, A. Hisanaga, H. Nagai : *J. Chromatogr.*, **133**, 173 (1977).
- 11) A. Tanaka, K. Obata, T. Deguchi : *Anal. Sci.*, **2**, 197 (1986).
- 12) 田中 明, 出口俊雄 : 日本化学会中国四国支部・九州支部合同大会講演予稿集, p. 253 (1986).
- 13) 武内次夫, 森 定雄 : “ゲルクロマトグラフィー基礎編”, p. 31 (1972), (講談社).
- 14) S. H. Lee, L. R. Field : *Anal. Chem.*, **56**, 2647 (1984).

☆

Gel chromatographic deproteinization for fluorometric catalytic determination of iodide and thiocyanate. Akira TANAKA, You-ichi IMASAKA, Kayo HAYASHI and Toshio DEGUCHI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto 860)

Separation of iodide and thiocyanate from lysozyme by gel filtration chromatography is described. Mutual separation of iodide and thiocyanate is also described. The mixed sample (100 ppm lysozyme, 0.2 μM I^- , 20 μM SCN^- , 200 μl) has been eluted from gel filtration column (Sephadex LH-20 or G-20, 25 cm $\times$ 8 mm i.d.) with 0.3 M sodium chloride, 1.3 ml/min. Eluted species have been fluorometrically determined by catalytic reaction based on redox reaction between Ce (IV) and As(III) in FIA system. Iodide and thiocyanate were eluted at 13 min and 17 min, respectively. Calibration graphs are straight lines through origin. The determination ranges were 30 nM $\sim$ 4 μM I^- and 3 μM $\sim$ 20 μM SCN^- . Component species of human

urine did not interfere. Combination of LH-20 column and ion chromatographic column is also described. (Received May 25, 1987)

Keyword phrases

flow-through deproteinization of lysozyme solution using dextran gel; catalytic fluorometry of iodide and thiocyanate; combination of gel chromatography and ion chromatography; catalytic redox reaction between Ce(IV) and As(III) in FIA system; mutual separation of iodide and thiocyanate.

液体クロマトグラフィーによるカテコールアミン定量用の血しょう及び心筋サンプルの前処理法

若林広行*, 渡辺賢一, 柴田 昭**, 大和 進, 中島正晴, 嶋田健次®*

(1987 年 6 月 13 日受理)

1 緒 言

電気化学検出器を用いる HPLC によって生体試料中のカテコールアミン(CA)を測定することは、高感度分析が可能である反面、試料の前処理法の良否が測定値に大きな影響を及ぼす。従来アルミナを用いる吸着法¹⁻⁴⁾は繁用されているが、極微量の CA の抽出には、回収率が低く (50~70%), 再現性に乏しい。この点に着目し種々検討し、ほぼ満足し得る結果を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び試液

ノルエビネフリン (NE), エビネフリン (E), ドーパミン (DA), 3,4-ジヒドロキシベンジルアミン (DHBA) は Sigma 製 (米国) を, オクタンスルホン酸ナトリウムは Aldrich 製 (米国) を購入した。EDTA は関東化学製を, アルミナは CA 測定用活性アルミナ (和光純

* 新潟薬科大学薬品分析化学教室 : 950-21 新潟県新潟市上新米町 5-13-2

** 新潟大学医学部第一内科 : 951 新潟県新潟市旭町通 1-754