

「硫化熱分解や化学発光反応などに 基づく分析法の開発」

原 正 *



同志社大学工学部教授原正先生は、1989年分析化学学会賞を受賞されました、それを記念いたしまして平成2年4月28日に開催されました第10回石橋雅義先生記念講演会にて御講演頂きました。ここにその内容を元に、御寄稿頂きましたので掲載致します。

ここで紹介する仕事は、すべて著者の研究室でいっしょに研究された人達によってなされたものである。ここでは前半で硫化熱分解ガスクロマトグラフィー (PSGC) 法の開発を、後半で化学発光反応に基づく分析法の開発を述べる。

1. 硫化熱分解ガスクロマトグラフィー (PSGC) 法の開発

有機元素分析の進歩を歴史的に見ると、1830年にLiebigによって始められた酸素燃焼 (マクロC/H分析) 法、1916年にPreglによって開発された微量化学天びんとそれを用いる元素分析の微量化、その後の装置の改良、測定法の進歩、精度の向上を経て今日に至っている。このような歴史的経過の中で基本原理ともいうべき反応を見直すこともなく使われてきたため、150年後の今日にあっても主成分の酸素をC、H、Nと同時に直接定量することができない。

このような観点から著者らは、酸素燃焼法に代わってイオウ燃焼法という全く新しい構想に基づ

く元素分析法すなわちPSGC法を考案し、それを多角的に検討した。このPSGC法によれば、たとえば(1)試料をひょう量することなく (実際には、ある質量範囲内の試料を見かけ体積として採取する)、1回の分析操作でC、H、O、N比を同時に決定でき、(2)通常の有機化合物をはじめ高分子化合物、含金属有機化合物、ハロゲン化合物、リン化合物など各種試料に適用できるなど、いくつかの優れた特徴を明らかにできた。以下にその概要を述べる。

1. 1 PSGC法の原理

たとえば、C、H、O、Nで構成される有機化合物の約0.5mgを5mgのイオウとヘリウム置換した石英封管中、950°Cで30分間反応させると、生成物は、試料の種類に関係なく8種以内であった。表1には成分元素と生成物の関係を示した。H₂OとSO₂は、試料中のC/O原子組成比が1以下の場合にのみ生成し、通常の有機化合物では生成しなかった。またCO生成量は小さく、通常無視できた。これらの事実は、生成物のピーク面積比

* 同志社大学工学部教授

Table 1. Relationship between elements and their products.

Elements	Products
C	CO ₂ , COS, CS ₂ , (CO)
H	H ₂ S, (H ₂ O)
O	CO ₂ , COS, (CO), (H ₂ O), (SO ₂)
N	N ₂

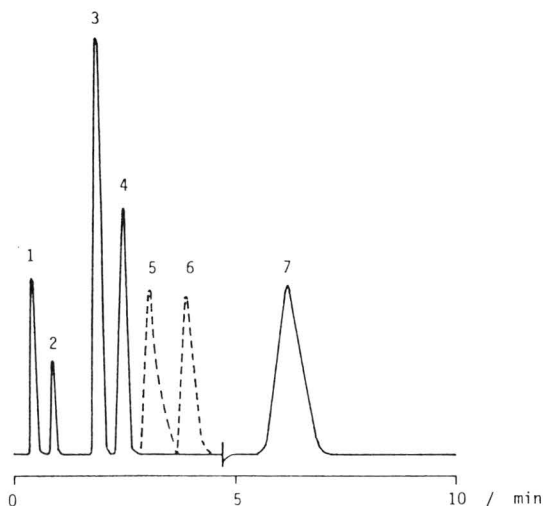


Fig.1 Typical chromatograms of the products. 1: N₂, 2: CO₂, 3: H₂S, 4: COS, 5: H₂O, 6: SO₂, and 7: CS₂. GC conditions: Column packings Porapak QS (45cm, 105cm) and Chromosorb 104 (50cm), column temperature 85°C, and flow rate of carrier gas 50cm³/min.

から試料中のC、H、O、N原子組成比を決定できる可能性を示唆した。生成物の代表的なクロマトグラムをFig. 1に示した。

ここでは、試料をひょう量することなしに各元素間の比を求めるため、理論的に誘導される式(1)を使った。

$$\alpha(\text{wt}\%) = \frac{\sum M(\gamma)K(\gamma)A(\gamma)}{\sum M'(\beta)K(\beta)A(\beta)} \times 100 \quad (1)$$

式中で α は目的元素を、 β は本法による生成物を、

γ は α を含有する生成物を、 $M'(\beta)$ は β の分子量からイオウの式量を差し引いた値を、 $M(\gamma)$ は γ 中の α の式量を、 $K(\gamma)$ は γ の計算係数を、 $A(\gamma)$ は γ のピーク面積値を、それぞれ示している。

式(1)中の計算係数は、4種の標準試料を本法で分析した結果を使い $K(\text{H}_2\text{S})=1$ として $K(\text{N}_2)$ 、 $K(\text{CS}_2)$ 、 $K(\text{COS})$ 、 $K(\text{CO}_2)$ を各算出した。これら計算係数を使い、式(1)からC、H、O、N原子組成を百分率%で表すことができた。また1回の分析に採取される試料量は0.2~1.0mgの範囲内であればよかった。

1. 2 PSGC法の改良

PSGC法の精度向上や分析時間の短縮を目標として各種の改良がなされた。市販特級のイオウといえども不純物が多く不適當であったので独自の方法で精製し、使用した。反応終了後の多数石英封管試料の分析には3個の破碎装置を並列に配置する連続分析装置を試作し、使用した。また反応時間の短縮のため、Fig. 2に示すような高周波加熱炉を試作した。それを用いることにより反応時間を30分から約40秒に短縮できた。またヘリウム置換装置の開発も行った。

1. 3 PSGC法の応用

PSGC法によれば、大部分の通常有機化合物のほか、含金属有機化合物、ハロゲン化合物、含リン化合物などのうちの多くを分析することができた。若干の通常有機化合物の分析例をTable 2に、また若干含金属有機化合物の分析例をTable 3にそれぞれ示した。

フッ素含有試料では、石英(SiO₂)との反応で酸素を発生したので、PSGC法を適用できなかった。その他のハロゲン元素(Cl:Br:I)を含有する化合物試料では、生成するハロゲン化物のためGC分析が不可能であった。そのような問題点を克服するため、一端を閉じた石英管内で高純度

Table 2 Analytical results of normal organic compounds.

Sample	C wt%			H wt%			O wt%			N wt%		
	Calcd	Found	Error	Calcd	Found	Error	Calcd	Found	Error	Calcd	Found	Error
2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6-, Nonamethyldi-phenyl methane	89.73	89.84	+0.11	10.27	10.16	-0.11						
Suberic acid	55.16	55.00	-0.16	8.10	8.23	+0.13	36.74	36.77	+0.03			
Lauric acid	71.95	72.17	+0.22	12.08	12.07	-0.01	15.97	15.76	-0.21			
2, 6-Dimethylphenol	78.65	78.69	+0.04	8.25	8.30	+0.05	13.10	13.01	-0.09			
L-Glutamine	41.09	41.05	-0.04	6.90	7.04	+0.14	32.84	32.78	-0.06	19.17	19.13	-0.04
Dimethylglyoxime	41.37	41.38	+0.01	6.94	6.82	-0.12	27.56	27.58	+0.02	24.13	24.22	0.09
m-Nitroaniline	52.17	52.09	-0.08	4.38	4.42	+0.04	23.17	22.92	-0.25	20.28	20.57	+0.29
L-Tryptophan	64.69	64.43	-0.26	5.92	6.12	+0.20	15.67	15.47	-0.20	13.72	13.98	+0.26
8-Quinolinol	74.47	74.40	-0.07	4.86	4.88	+0.02	11.02	10.94	-0.08	9.65	9.78	+0.13
2, 2'-Bipyridine	76.90	76.98	+0.08	5.16	5.15	-0.01				17.94	17.87	-0.07

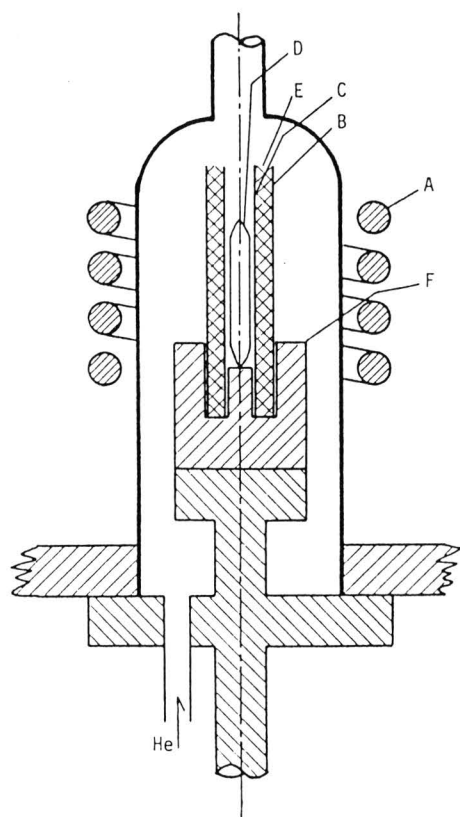


Fig.2 High-frequency induction furnace.
A:Work coil, B:outer quartz tube (10.5-mm.i.d., 12.5mm o.d., and 50mm long), C:inner quartz tube (5.5mm id., 6.5mm o.d., and 50mm long), D:ampule containing sample and S, E:granulated tungsten (10~20mesh), and F:ceramic support.

イオウ S_x とアジ化ナトリウムを反応させて ($S_x + Na_2S$) を得、これを使って常法のPSGC法を適用した。封管内の気体の分析でC、H、O、N原子組成比を、また固体中のハロゲン化物を溶解後イオンクロマトグラフ分析によりCl、Br、I原子組成比を、決定できた。また両分析をリンクさせることにより、一つの試料からC、H、O、N、Cl、Br、I原子組成比を決定できた。含金属ハロゲン化合物試料の場合につき、その概要をTable 4に示した。

なおPSGC法を30 μ gまでの試料へ適用可能なこと、およびC、H、O、Nの同時絶対定量の可能なことも実験結果をもって示した。これまでに検討した50種の共存元素のうち、37元素が無害、3元素が試料組成により無害、10元素が妨害した。その概要をFig. 3に示した。

1. 4 大気圧下の硫化熱分解とその応用

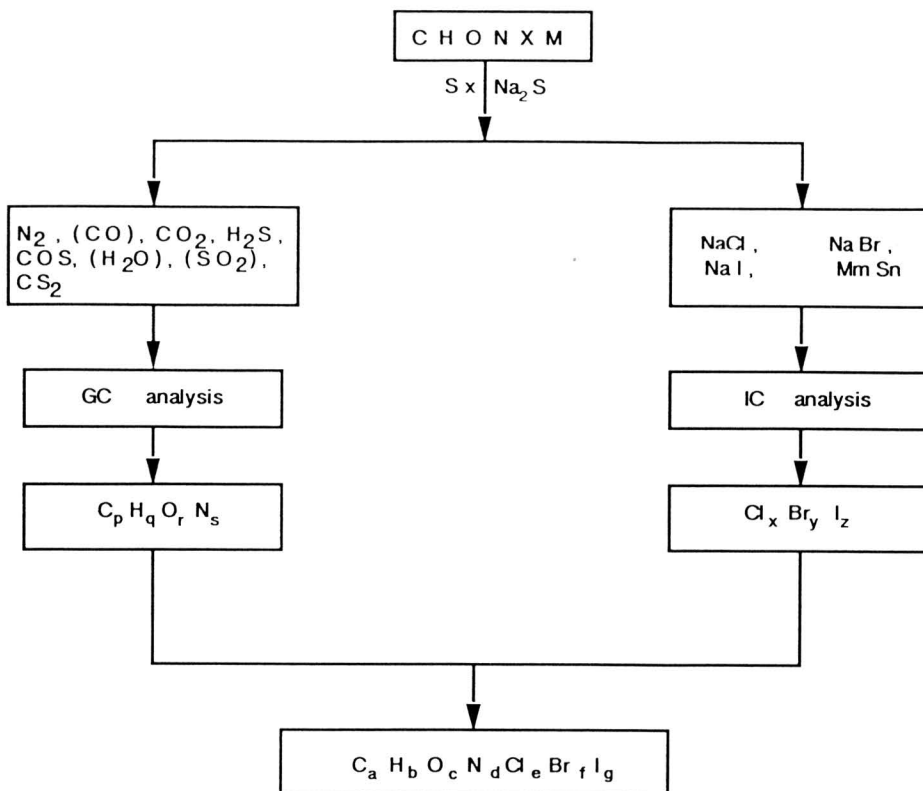
大気圧下で連続的に硫化熱分解させるための独特な装置(金石英製)を開発した (Fig. 4)。本装置によれば、GC-Iからの流出成分 (Heキャリア) はイオウ蒸気と高温炉内で反応し、生成物がGC-IIで検出される。このときの全装置図を

Table 3 Analytical results of metallo-organic compounds.

Sample a)		C wt%	H wt%	O wt%	N wt%
Bis(anthranilato)- copper (II) $\text{Cu}(\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2\text{N})_2$	Theor	61.76	4.44	23.51	10.29
	Exptl	62.04	4.55	23.28	10.11
	Error	+0.28	+0.11	-0.23	-0.18
(Benzoin oximato)- copper (II) $\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N})$	Theor	74.65	4.91	14.21	6.23
	Exptl	74.60	4.65	14.55	6.20
	Error	-0.05	-0.26	+0.34	-0.03
Tris(8-quinolinolato)- chromium (III) $\text{Cr}(\text{C}_9\text{H}_6\text{ON})_3$	Theor	74.98	4.20	11.10	9.72
	Exptl	74.95	4.18	11.26	9.61
	Error	-0.03	-0.02	+0.16	-0.11
Dioxobis(8-quinolinolato)- tungsten(VI) $\text{WO}_2(\text{C}_9\text{H}_6\text{ON})_2$	Theor	67.50	3.78	19.98	8.75
	Exptl	67.35	3.58	20.19	8.88
	Error	-0.15	-0.20	+0.21	0.13

a) Metal atoms were neglected in the composition of metallo-organic compounds.

Table 4 The modified PSGC method for a halogen-containing sample.



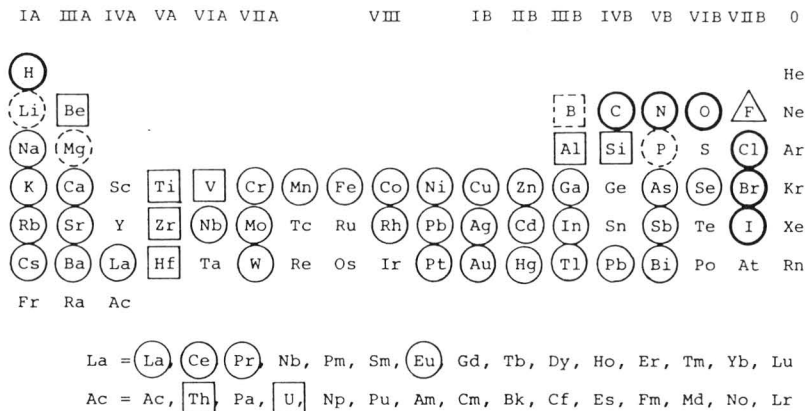


Fig.3 Effect of the coexistent elements on the determination of the atomic ratio.
 ○:Harmless, □:form oxide and harmful, ◻:form both oxide and nitride and harmful, △:react with reaction tube and also harmful, ○:can be determined by PSGC.

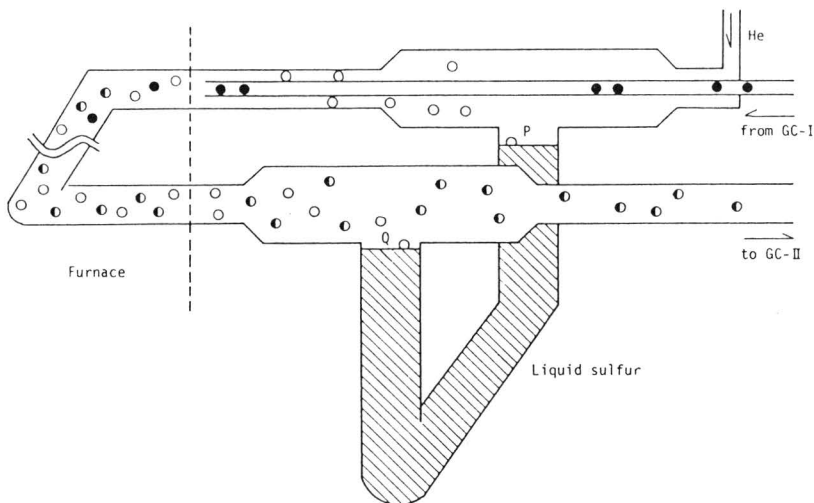


Fig.4 The system of the pyrolytic sulfurization reaction.
 ○:Sulfur, ●:sample, and ◐:products.

Fig. 5 に、代表的なクロマトグラムをFig. 6 に、さらに化合物の判定結果をTable 5 にそれぞれ示した。

大気圧下での硫化熱分解反応の生成物は、封管

内のそれと異なった。これまでの検討結果によれば、定性的には十分満足できる結果を与えたが、定量的には不十分であった。

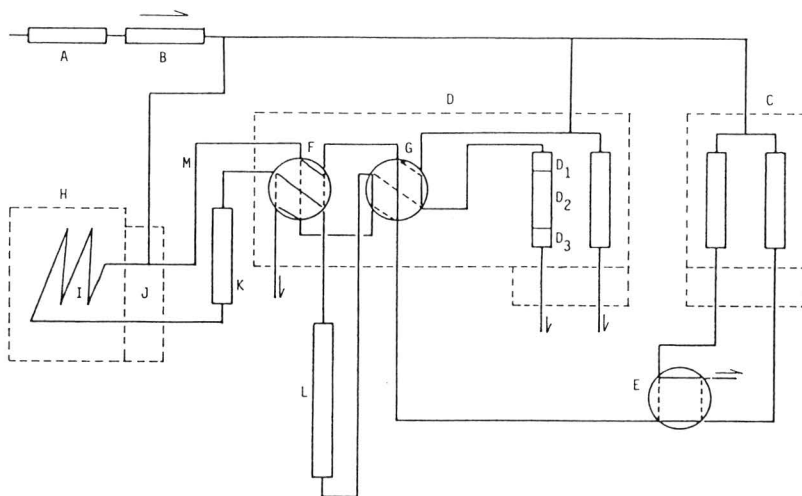


Fig.5 Schematic flow diagram of system. A:Molecular Sieve 5 A column, B:copper column, C:gas chromatograph-I, D:gas chromatograph-II, D₁:Chromosorb 104 column, D₂:Porapak QS column, D₃:Deactiigle column, E:four-way cock, F and G:six-way cocks, H:electric furnace, I:reaction tube, J:quartz-made apparatus, K:sulfur trap, L:trap column, and M:stainless steel tube.

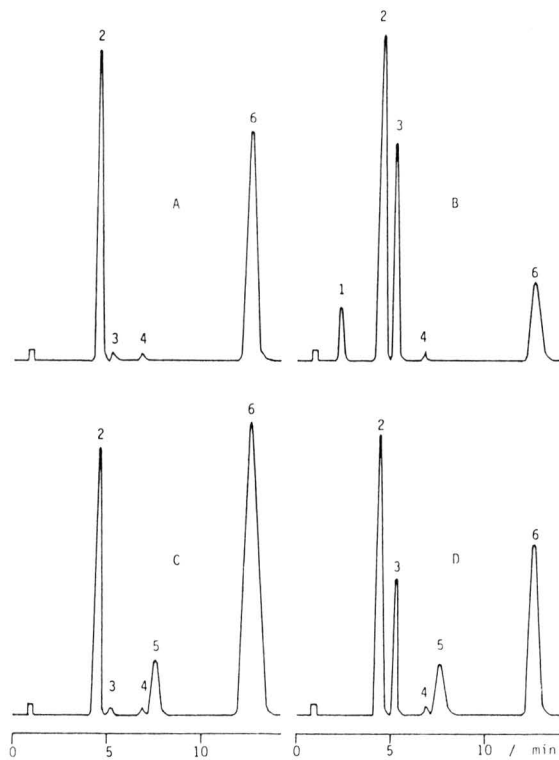


Fig.6 Chromatograms of samples (A:cyclohexene, B:methyl alcohol, C:pyridine, and D:morpholine).
1 : CO₂, 2 : H₂S, 3 : COS, 4 : SO₂, 5 : HCN, and 6 : CS₂.

Table 5 Analytical results of organic compounds.

Sample	Products							Components	
	CO ₂	H ₂ S	COS	SO ₂	HCN	H ₂ O	CS ₂	Theoretical	Found
Benzene	-	+	-	-	-	-	+	C, H	C, H
n-Hexane	-	+	-	-	-	-	+	C, H	C, H
Methanol	+	+	+	-	-	-	+	C, H, O	C, H, O
Ethanol	-	+	+	-	-	-	+	C, H, O	C, H, O
Acetone	-	+	+	-	-	-	+	C, H, O	C, H, O
Methyl acrylate	+	+	+	-	-	-	+	C, H, O	C, H, O
Triethylamine	-	+	-	-	+	-	+	C, H, N	C, H, N
Pyridine	-	+	-	-	+	-	+	C, H, N	C, H, N
Nitromethane	+	+	+	+	+	+	+	C, H, O, N	C, H, O, N
Morpholine	-	+	+	-	+	-	+	C, H, O, N	C, H, O, N

2. 化学発光反応に基づく分析法の開発

生体試料中の微量成分、とくにタンパク質とその誘導体を分析するたを目的として、化学発光反応に基づく分析法の開発を行ってきた。この場合、金属錯体が触媒として働く化学発光反応の利用に重点が置かれた。すなわちFig. 7で示す化学発光反応の機構のうち、触媒に金属錯体を用いることを特色とした。なおタンパク質の分析法は次に挙げる両面から検討した。(1)試料中の各成分の分離とそれに続く個々の検出(たとえばクロマトグラフ分離や電気泳動分離に続く検出)、(2)各種成分の共存する試料中の特定成分(タンパク質)の直接かつ特異的検出(免疫分析など)。

著者らは、化学発光系にタンパク質が共存すると金属錯体触媒の活性が著しく低下することを見

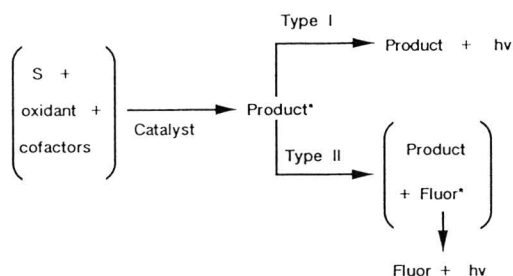


Fig.7 Mechanism of chemiluminescence reaction.

い出し、これを用いる各種タンパク質定量法(化学発光触媒活性抑制法; MALCLC)を確立した。他方、従来のRIAやEIAにおける標識剤(放射性同位体や酵素)の代わりに化学発光系の錯体触媒を用いる免疫分析法も確立した。以下にそれらの概要を述べる。

2. 1 化学発光錯体触媒免疫分析 (CLCCIA)

複雑な試料マトリックス中の特定微量タンパク質を定量する目的で、化学発光錯体触媒免疫分析(CLCCIAと呼ぶことにする)法につき検討した。酵素免疫分析(EIA)法は放射免疫分析(RIA)法に代わり得る高感度の優れた方法であるが、なお(1)標識剤酵素分子の立体障害に基づく不均質免疫反応、(2)不安定性、(3)高価などの問題点をもつ。これまで合成金属錯体触媒を標識剤として用いる免疫分析の報告が見当たらないので、それについて検討した。金属錯体触媒としてはFig. 8に示す配位子を使った。検討錯体触媒中、Fig. 8-dの鉄(III)錯体(TCP-Fe(III))が最も有望であったので、それを標識剤とし、ヒト血清アルブミン(モデルタンパク質; HSA)を競合法(免疫分析)で定量した。免疫分析はFig. 9に示すような簡単な装置で行った。この場合の免疫分析法をFig. 10に、また検量線をFig. 11に示した。

ルミノール-過酸化水素化学発光系に対し最高

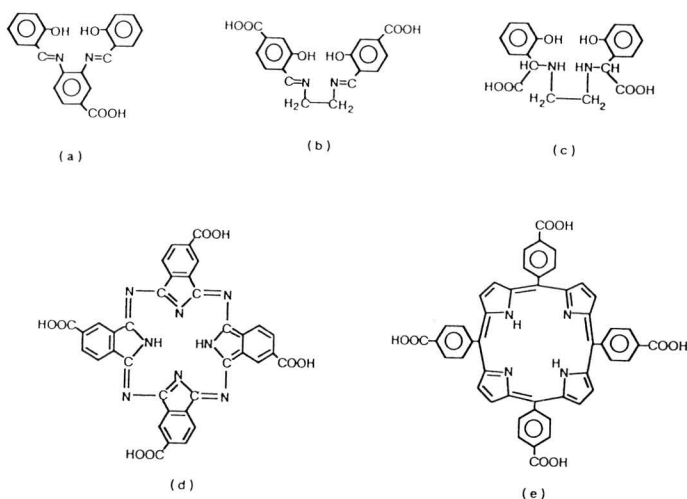


Fig.8 The structure of ligands.

- a : 3, 4-Bis (salicylideneamino)benzoic acid,
 b : N, N-bis(4-carboxysalicylidene)ethylenediamine,
 c : N, N-bis[2-(o-hydroxyphenyl)acetic acid] ethylenediamine,
 d : 4, 11, 18, 25-tetracarboxyphthalocyanine, and
 e : 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphine.

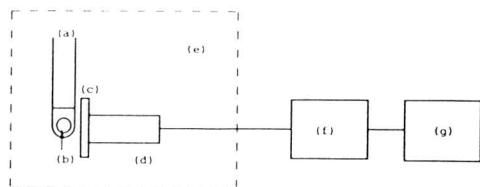


Fig.9 The apparatus for CLCCIA.
 a : Test tube, b : glass bead, c : shutter,
 d : photomultiplier, e : dark box,
 f : photon counter, and g : recorder.

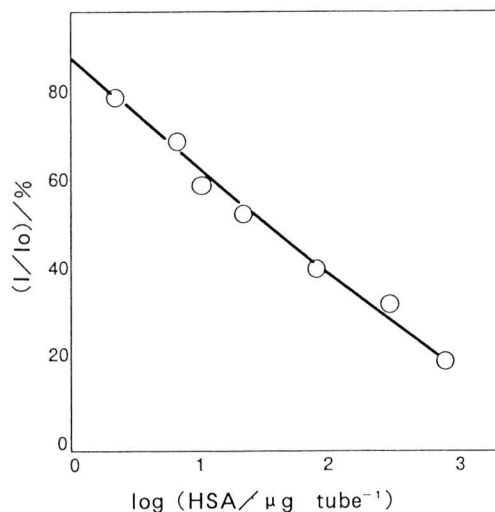


Fig.11 Calibration curve.
 I, I₀ : CL intensity of the sample in the presence or absence of HSA.

感度を示した合成TCP-Fe(III) (天然のヘマチンより高感度)を標識剤とする免疫分析を、はじめて行った。2~1000 $\mu\text{g}/\text{tube}$ のHSAを変動係数6~16% (n=5)で定量できた。この方法を実用的なものとするため、改良(特にカルボン酸形TCPの酸塩化物形TCCPへの転換による標識操作

の簡易化と分析時間の短縮)と諸条件の最適化を行った。その結果50ng~50 $\mu\text{gHSA}/\text{tube}$ を、ガラスビーズを用いる競合法で定量できた。

前述の免疫分析(競合法)はすべて回分(バッチ)式に行われたので、化学発光強度を連続的に測定できる流通式装置(Fig.12)を試作し、そ

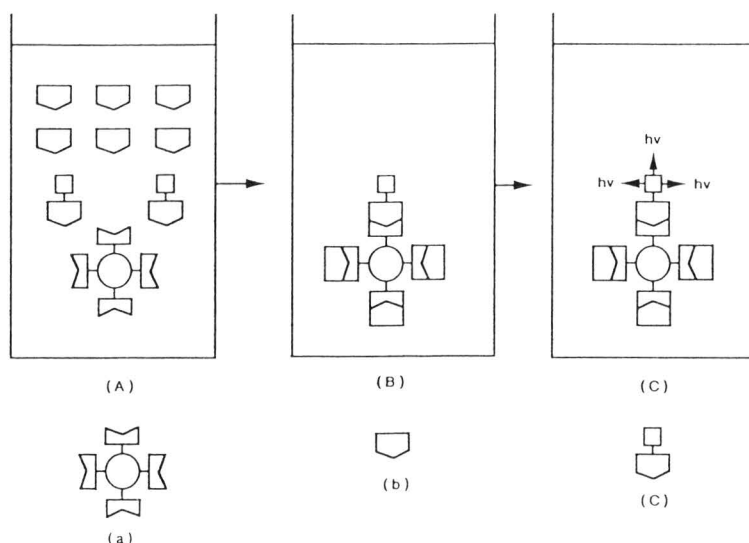


Fig.10 The procedure for immunoassay.
 A : Immune reaction, B : separation of bound and free fractions, and
 C : measurement of CL intensity. a : Glass bead immobilized with
 antibody, b : HSA, and c : labeled HSA.

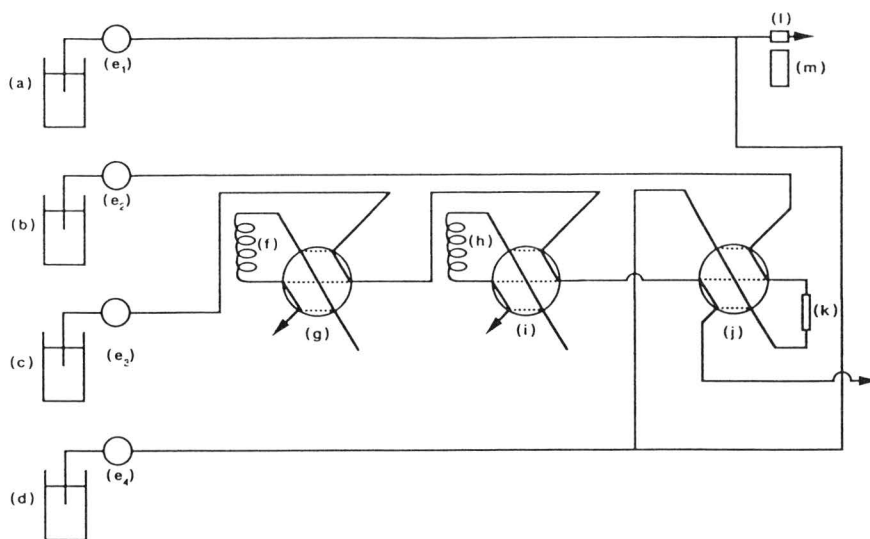


Fig.12 Schematic flow diagram.
 a : Luminol solution, b : liberating solution, c : buffer solution,
 d : H₂O₂ solution, e₁, e₂, e₃, e₄ : pump, f, h : sampling loop,
 g, i, j : six-way cock, k : immobilized antibody column, l : flow-cell,
 and m : photomultiplier.

の性能を調べた。その結果、CLCCIAの感度と精度が向上し、化学発光強度測定時間も次のように改良できた：20ng~50 μgHSA/tube測定の変動係数は5.8~7.2% (n=9) で、測定時間は4分。

連続CLCCIAのための操作法をFig. 13に、そのときの標準曲線をFig. 14に、それぞれ示した。

このようなCLCCIAによって一層微量のタンパク質を定量する試みとして、光学ファイバを用い

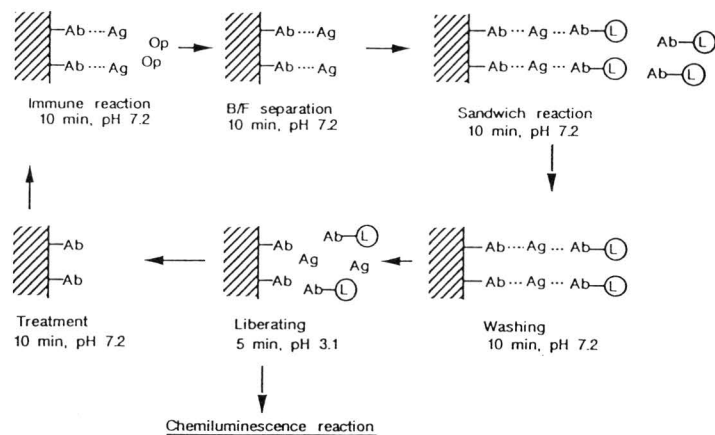


Fig.13 Operating procedure for continuous CLCCIA.
 Ab : Antibody, Ag : antigen, Op : other protein, and L : [1, 8, 15, 22-tetrakis(chloroformyl)phthalocyaninato] iron(III).

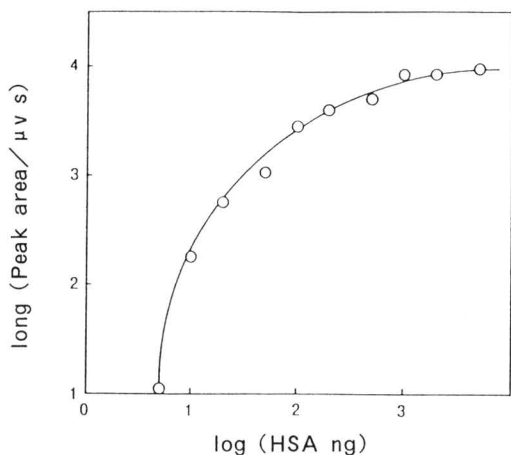


Fig.14 Standard curve of HSA.

る方法を検討した。この方法では、ファイバ先端の平面上に抗体を固定化し、競合法かサンドイッチ法で免疫反応させた後、ルミノール-過酸化水素流路内での化学発光を検出した。その様子をFig.15に示した。この場合、競合法とサンドイッチ法の検量線をFig.16とFig.17に示した。競合法では $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-1} \text{ gdm}^{-3}$ HSAを検出下限400pgで、またサンドイッチ法では $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1} \text{ gdm}^{-3}$ HSAを検出下限40pgでそれぞれ定量できた。

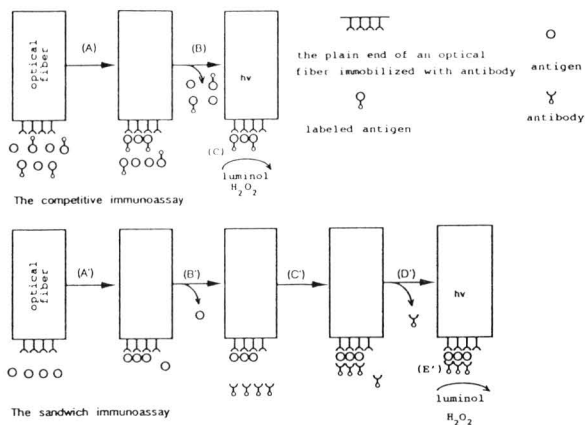


Fig.15 Schematic diagram of the immunoassay.
 (A), (A') : Antigen-antibody reaction,
 (B), (B') : separation of bound and free fractions, and
 (C), (E') : measurement of CL intensity.

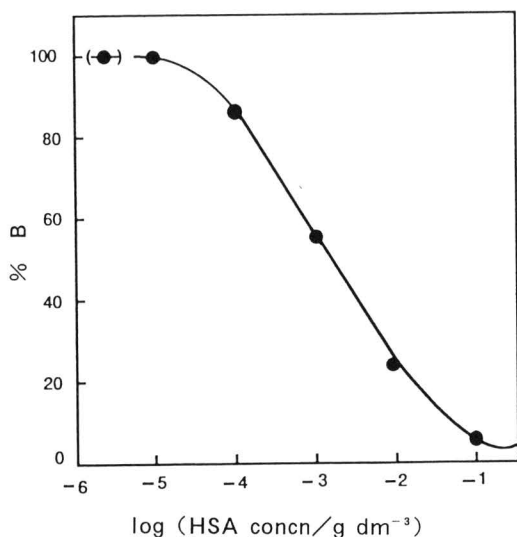


Fig.16 Calibration curve for HSA obtained by the competitive immunoassay.
 $\%B = \{(I_s - I_{b_0}) / (I_s - I_{b_a})\} \times 100$
 I_s, I_{b_1} : CL intensity of the sample in the presence or absence of HSA,
 I_{b_a} : CL intensity of background, and
 (●): Blank value.

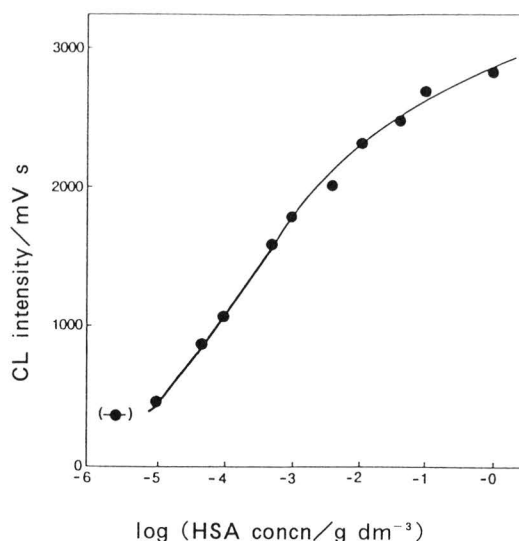


Fig.17 Calibration curve for HSA obtained by the sandwich immunoassay.
 (●): Blank value.

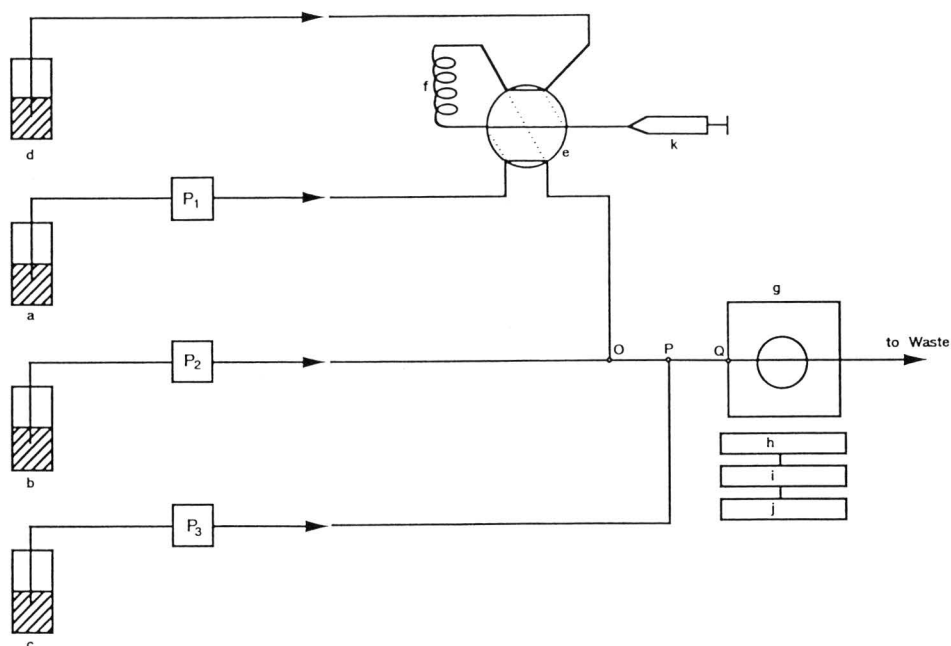


Fig.18 Schematic diagram of the apparatus for indirect FIA.
 a: Buffer solution, b: H₂O₂ solution, c: luminol solution, d: sample solution,
 e: six-way cock, f: flow-cell, h: photomultiplier, i: amplifier, j: recorder,
 k: syringe, and P₁, P₂, P₃: pump.

Table 6 Detection limit of protein by various indirect FIA.

Method No.	CL system	Detection limit of protein (injection volume)	
The indirect FIA			
1	Luminol-H ₂ O ₂ -Cu(II)	200ng	(400 μl)
2	Luminol-H ₂ O ₂ -Co(III)	200ng	(400 μl)
3	Luminol-H ₂ O ₂ -Fe(III)	4ng	(400 μl) ^{a)}
4	Phen-H ₂ O ₂ -Cu (II)	5ng	(50 μl)
5	Phen-H ₂ O ₂ -Ru (III)	1ng	(50 μl)
6	Phen-H ₂ O ₂ -Os (VIII)	0.25ng	(50 μl)

a) Not detected for bovine serum γ -globulin and human serum γ -globulin.

Table 7 Comparison of the present FIA with the other FIA.

Method No.	Method	Detection limit/ng	Determination range/g dm ⁻³	Sampling volume/mm ³
Present				
7	Luminol-H ₂ O ₂ -Cu(II)	10	2.0×10^{-4} - 1.0×10^{-1}	400
8	Ultrasonic luminol-Co(III)	0.20	5.0×10^{-6} - 1.0×10^{-1}	40
9	Phen-H ₂ O ₂ -Cu (II)	0.25	5.0×10^{-6} - 1.0×10^{-1}	50
10	Dyestuff-binding	40	2.0×10^{-3} - 5.0×10^{-1}	20
11	Electrode	120	1.0×10^{-3} - 2.0×10^{-1}	40
12	Spectrophotometry	1000	1.0×10^{-1} - 1.0	10
13	Lowry	1000	5.0×10^{-3} - 2.0×10^{-2}	100

2. 2 化学発光触媒活性抑制法 (MALCLC)

著者らは、標記の方法をMALCLCと呼び、これについての検討を次の順序で行った：(A) 間接 FIA法、(B) 直接FIA法、(C) MALCLCの原理、(D) MALCLC検出器のHPLCへの応用。

(A) 間接FIA法

この方法では、試料溶液中のタンパク質をあらかじめ金属イオンと一定条件下で反応させた後、その一定量をフローインジェクション系に注入し、分析した。これに用いる装置の一例をFig. 18に示した。また各種間接FIA法によるタンパク質の検出限界をTable 6に示した。Table 6のMethod

6によれば、 $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ g dm⁻³ タンパク質を、検出限界250pg (注入量50mm³)、変動係数2.9% (n=10) で定量できた。Method 6は、従来の比色法や蛍光法に比べ約10²~10⁶倍高感度であった。

(B) 直接FIA法

この方法では、試料の一定量を流通系に直接加えることにより定量が行われた。本法と他法の比較をTable 7に示した。Method 7~9が本法に相当し、Method 9で使用した装置をFig. 19に、またその場合のフローチャートをFig. 20に示した。Method 8によれば、 $5 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$

$g\text{ dm}^{-3}$ タンパク質を、検出限界 200pg (注入量 40mm^3)、変動係数 2.9% ($n=8$)、 60 試料/時の速度で定量できた。Method 9 による 9 種タンパク質の検出感度は $0.84\sim 1.42$ ($\text{BSA}=1.00$)であった。なお直接FIA法は、ヒト血清中のアルブミン/グロブリン比の決定に応用できるほか、 250pg までの α -フェトプロテイン (ガンマーカ) を検出できた。

(C) MALCLCの原理

本法の原理は、次のように説明できる。 n モルの金属イオンと1モルのタンパク質が式(2)によって $\text{Mn} \cdot \text{Prot}$ を生成するとき、



CL強度の減少 ΔI_t は式(3)で与えられる。

$$\Delta I_t = \Phi k \cdot n \cdot [\text{Mn} \cdot \text{Prot}] \cdot \exp(-kt) \quad (3)$$

ここで n は結合比、 Prot はタンパク質、 $\text{Mn} \cdot \text{Prot}$ は金属-タンパク質錯体、 Φ は発光量子収率、 k はCL反応の速度定数をそれぞれ意味する。測定感度を高めるには式(3)の ΔI_t を大きくすればよく、そのための必要条件を明確にした。それら条件は、これまでに得られた実験結果と矛盾しないことを確認できた。加熱操作は、MALCLCを使う直接FIAでタンパク質を迅速、鋭敏かつ適確に検出するための最も重要な因子の一つであった。 $\Delta I_t (\%)$ は、見かけの速度定数と安定度定数を使い算出できた。

(D) CL検出器のHPLCへの応用

タンパク質混合物を分離、検出するための各種

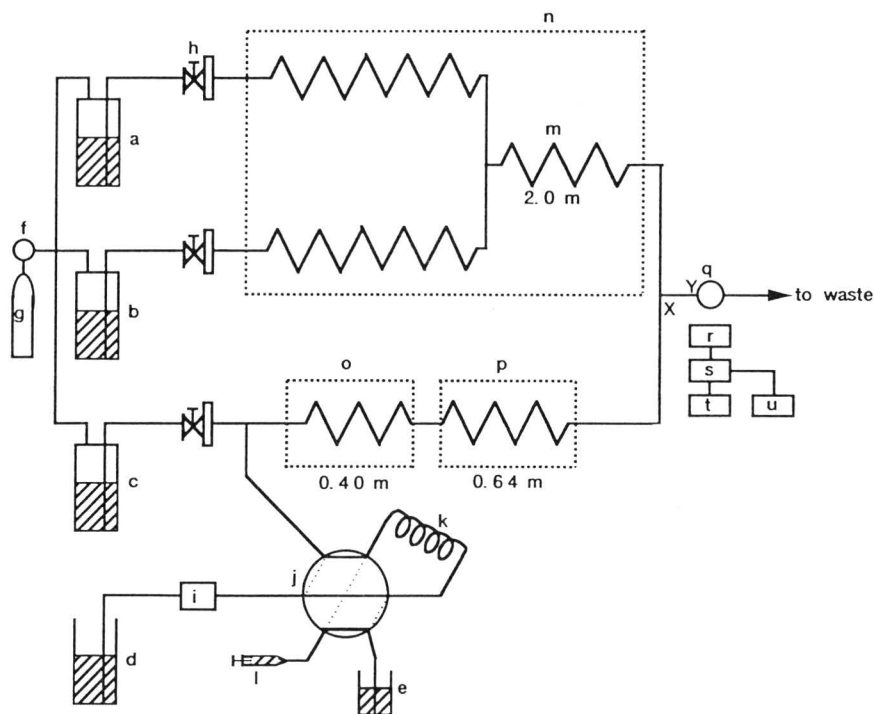


Fig.19 Schematic diagram of the apparatus for direct FIA.

a : Phen solution, b : H_2O_2 solution, c : copper (II) catalyst, d : buffer solution, e : sample solution, f : regulator, g : N_2 cylinder, h : flow-meter equipped with a needle valve, i : pump, j : six-way cock, k : sampling loop, l : syringe, m : mixing coil, n : thermostat, o : reaction tube, p : cooling tube, q : flow-cell, r : photomultiplier, s : amplifier, t : recorder, and u : Integrator.

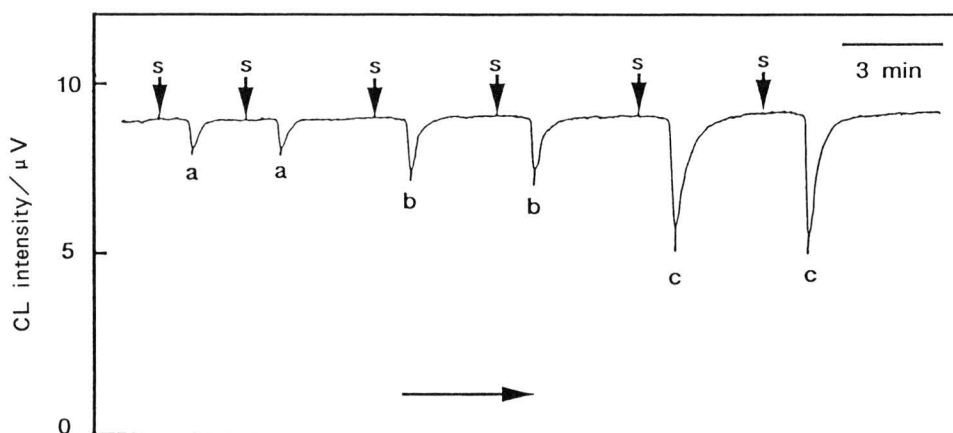


Fig.20 Flow chart of the direct injection method using a phen-H₂O₂-Cu(II) system. a : $5.0 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$, b : $1.0 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$, c : $1.0 \times 10^{-2} \text{ g dm}^{-3}$ BSA, and s : sample injection point. Conditions : $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ phen, 5.0wt % H₂O₂, and $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ Cu(II).

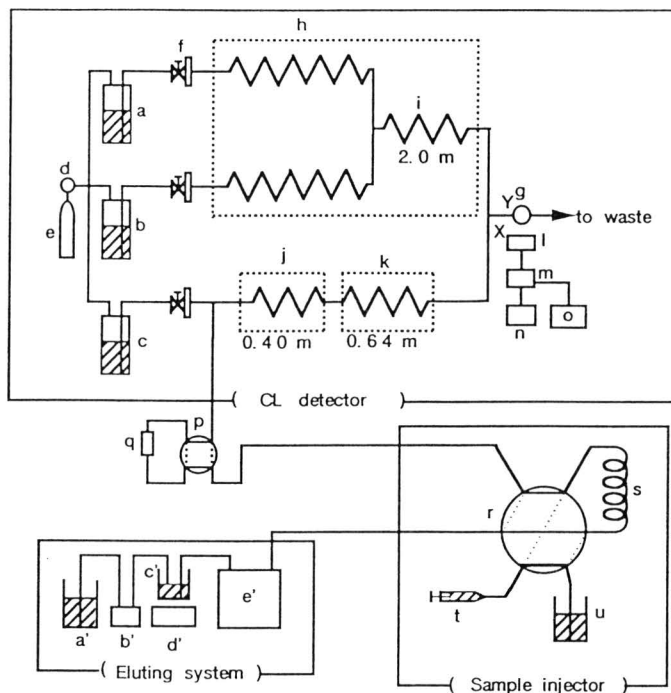


Fig.21 Schematic diagram of the ion-exchange chromatograph-CL detector system. [CL detector] a : Phen solution, b : H₂O₂ solution, c : Cu(II) solution, d : regulator, e : N₂ cylinder, f : flowmeter equipped with a needle valve, g : flow-cell, h : thermostat, i : mixing coil, j : reaction tube, k : colling tube, l : photomultiplier, m : amplifier, n : recorder, o : integrator, p : four-way cock, q : column, [Sample injector] r : six-way cock, s : sampling loop, t : syringe, u : sample solution, [Eluting system] a' : NaCl solution, b' : peristaltic pump, c' : gradient-mixer, d' : magnetic stirrer, and e' : pump.

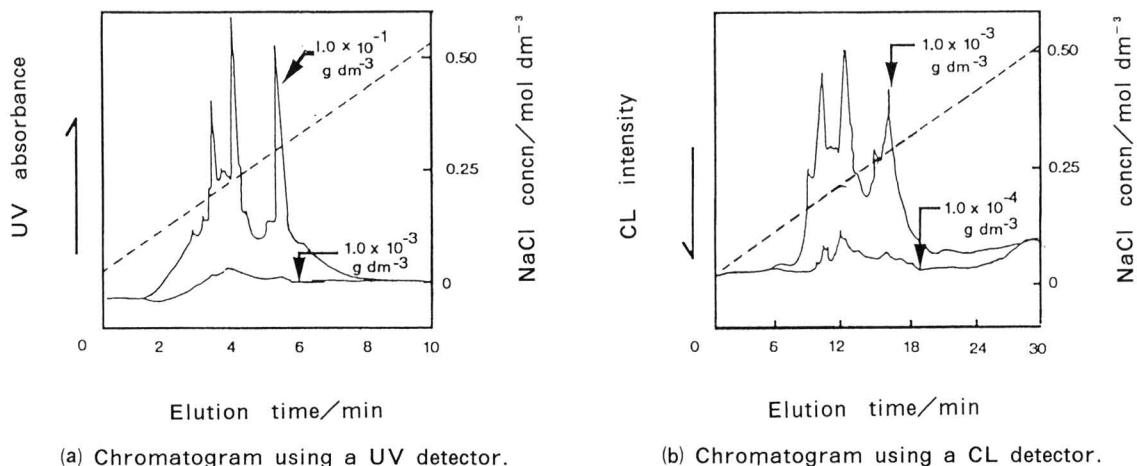


Fig.22 Comparison of both detectors for the separation of a model sample.
Sample : Ovalbumin and trypsin inhibitor from soybean.

HPLCが、ルミノール-過酸化水素-銅(Ⅱ)系か1,10-フェナントロリン(phen)-過酸化水素-銅(Ⅱ)系(Table 8)を用いるCL検出器と各種カラムを結合することにより、開発された。例としてイオン交換クロマトグラフ-CL検出器系の模式図をFig. 21に示した。その分析系で得られたタンパク質混合物のクロマトグラムを、UV検出系によるクロマトグラムといっしょにFig. 22に示した。Fig. 22から、CL検出系の有用性を確認できた。

2. 3 むすび

これらの結果を考えると、今後特に重要と思われる点は、(1)より有効な化学発光触媒の開発、(2)キャピラリーゾーン電気泳動/CL検出器のインタフェース、(3)非化学発光性成分(分析成分)の化学発光体への簡易誘導体化、(4)化学発光強度の増大など、多くの発展が期待される。