



Title	光検出法を用いたデンストメトリー装置の開発と展開 型分離分析への応用
Author(s)	山本, 裕志
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37642
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文につい てをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	山 本 裕 志
博士の専攻分野の名称	博士（工 学）
学位記番号	第 1 0 0 6 2 号
学位授与年月日	平成 4 年 2 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	光検出法を用いたデンシトメトリー装置の開発と展開型分離分析への応用
論文審査委員	(主査) 教授 南 茂夫 (副査) 教授 増原 宏 教授 中島 信一 教授 志水 隆一

論文内容の要旨

薄膜クロマトグラフィ（TLC）や二次元電気泳動法（2-DE）といった展開型分離分析法で分離された試料を光吸収分析法で直接定量あるいは同定する方法は、試料が空間的に不均一に分布していることやバックグラウンドの光散乱や吸収のために測定値と濃度の関係が直線にならないといった問題があり、特に測定精度の面で信頼性が乏しいとされていた。本論文ではこのような問題を解決するため、光検出法を用いたデンシトメトリー装置を研究すると共に、脂質や蛋白分析への応用を検討した。

第1章では本研究の目的と内容について概観した。

第2章では本研究の基礎となる拡散反射測定理論、およびTLCと2-DEにおける定量と同定の問題点について述べると共に、デンシトメトリー装置開発の意義について述べた。

第3章では紫外、可視イメージングデンシトメトリー装置の基本的な測光方式としてTLCプレート上における吸光度信号と物質濃度の非直線関係の補正にクベルカ・ムンクの理論を適用した場合の効果と分布誤差の除去にジグザグスキャンが有効であることを示した。また、画像処理のためにパーソナルコンピュータを接続したシステムとそのソフトウェアについて述べた。

第4章では上記のイメージングデンシトメトリー装置の紫外域における応用として、2-DEで分離された蛋白を染色することなく直接定量、同定するための基礎的な検討を行なった。相関係数0.999と直線性の良い検量線が得られる事、マッピングパターンから同定可能な事および生理活性を保ったまま蛋白を回収できる可能性のある事を示した。

第5章ではイメージングデンシトメトリー装置の可視域における応用として、リン脂質の二次元TLCプレート上での直接定量について述べた。従来、かきとって抽出した比色分析する方法が行なわれて

いるが本研究の直接定量の結果では再現性約2-5%と実用上十分な結果を得た。

第6章では紫外、可視域に吸収特性の無い物質を近赤外の吸収を利用してTLCプレート上で直接定量した結果について述べた。検量線の相関係数で約0.999以上、再現性は同一プレートで2.5%、プレート間で3.5% (いづれも $n = 10$) と従来の発色後の可視デンシトメトリーと同等以上の結果が得られた。

第7章はTLCプレート上で分離された物質を赤外スペクトルで同定する場合に妨害となるバックグラウンドの強い吸収の影響を除去するために試料を赤外透過材料へ転写する装置とFTIRで測定した結果について述べた。転写前のUVクロマトグラムと同等の赤外クロマトグラムが得られること、赤外スペクトルは短時間 (約2分) で得られ、通常の拡散反射法のスペクトルと良く一致することを確認した。

第8章は以上の結果を総括した。

論文審査の結果の要旨

試料中の複雑な構成成分物質を、簡便に分離できる薄膜クロマトグラフィ (TLC) や高分離機能を有する二次元電気泳動法 (2-DE) などの展開型分離分析法は、生化学分野で広く用いられているが、定量や同定の面では他の分離分析の方法に及ばないとみなされてきた。本論文では、TLCプレート上や2-DEゲル上で分離された物質を、定量または同定する場合の測定精度に影響を与える要因を解析すると共に、それらを除去するための新しい光検出方法を取り入れたデンシトメトリー装置を開発し、紫外、可視、近赤外、赤外の各波長領域における応用を検討した結果についてまとめたものであり、その主な成果を要約すると次の通りである。

- (1) TLCプレート上での拡散反射測定において、吸光度信号と物質量の間に現れる非直線性をケルカ・ムンクの理論式の適用により高い精度で補正しうることを示し、同理論式の導入の前提となる仮定がTLCプレート上で良く成立することを実証している。また、濃度分布の不均一さに起因する誤差を除去するために、微小光束による二次元走査が有効であることに着目し、その原理を用いたイメージングデンシトメトリー装置を開発して画像処理を中心にした基本性能を検討し、その有用性を確認している。
- (2) 紫外域におけるイメージングデンシトメトリー装置の応用として、2-DEゲル上で分離された蛋白を染色することなく280nmの紫外吸収を利用して吸光度マッピングを行ない、同一ゲル上に展開したマーカーの蛋白と比較測定することによって分子量と等電点の値をただちに算出可能なことを確認している。これによって、従来困難とされた2-DEゲル上の未染色蛋白を生理活性を保ったまま回収できる可能性を示唆している。
- (3) 試作した可視域イメージングデンシトメトリー装置を、二次元TLCプレート上におけるリン脂質成分の定量に応用し、大豆レシチンの主要な4成分比について2-5%の再現性を得ている。その結果、従来一次元TLCに対してだけ行なわれていた脂質の直接定量がそれと同等以上の精度で二次元

的に達成しうることを確認している。

- (4) フーリエ変換型の近赤外分光光度計と赤外顕微鏡を組み合わせた近赤外デンストメトリー装置を開発してリン脂質の定量に応用し、二次微分スペクトル定量法により、同一プレート上で2.5%、プレート間で3.5%と従来の発色後の可視デンストメトリーよりも高い再現性が得られることを実証している。
- (5) TLCで分離された物質を赤外透過材料(KBr粉末)に転写した後FTIR拡散反射法で測定する方法を考案し、転写前のUVクロマトグラムと同程度の赤外クロマトグラムが得られること、また、クロマトグラム上の各ピークの赤外スペクトルが通常の拡散反射法で測定した標準品のスペクトルと良く一致することを確認している。

以上のように、本論文は、現在広く用いられているTLCや2-DEなど展開型分離分析の定量や同定の精度を大きく向上させるための光学的検出方法を提案すると共に、装置の検討と応用面について論じたもので計測工学、分析科学の分野に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士論文として価値あるものとして認める。