

1. 緒言

温和な条件下で効率よく選択性の高い触媒作用を示す酵素を、安定にかつ繰返し利用するために、酵素を固定化した反応管を使った空気分節方式の連続流れ分析法は臨床分析の分野でますます広く使われつつある。この方式では反応管中での試料および生成物の分布帯の広がりを抑制するために気泡が導入されるわけであるが、そのために流路構成が複雑になり、流れが脈動する可能性があるうえに分析系の設計がむずかしいなどの欠点がある。そこで、我々はフローインジェクション分析法 (FIA) の反応管として毛細管の内壁に酵素を固定化したものを使う方法を提案した。¹⁾ 丁度同じ時期に Iob²⁾ からも同じ方法を提案したが、彼らは wide-bore glass capillary を使っている点が異なっている。我々の方法によれば、流路は簡単になり、また単位時間当り多くの試料の分析を行なうことができる点に特徴がある。

今回は、この方法を応用する場合の反応管の設計法と、乳酸脱水素酵素 (LDH) を固定化した反応管を使って L-乳酸の FIA 分析を行なった結果について述べる。

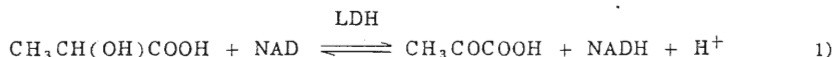
1. 実験

図 1 に装置の概略図を示した。2mM の NAD を含む 0.1 M ピロリン酸緩衝液 (pH 9.0) をキャリアー溶液として用いた。反応管としては内径 0.015 - 0.025 cm、長さ 1 - 4 m、コイル径 11 cm のガラス毛細管を用いた。

2-クロロ-1, 1, 2-トリフルオロエチルエーテルを毛細管中に吸引し、400℃で9時間反応させるとホイスカが内壁上に生成する。この毛細管に3-アミノプロピルトリエトキシシランの2%アセトン溶液を

満たしガラス表面のシラノール基と45℃で24時間反応させることによってアミノ基を導入し、ついで5%グルタルアルデヒド溶液を満たし、室温で3時間反応させた後、10mg/CCのLDH溶液を満たし、4℃で18時間反応させて毛細管内壁に酵素を固定化させた。

以下に示すような反応によってピルビン酸とともに生成するNADHのけい光(励起波長



340nm、測定波長470nm)をけい光検出器でモニターすることによって応答曲線を描いた。

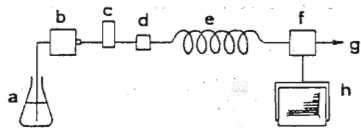


図1 FIA系の流路図
a: キャリヤ溶液, b: マイクロポンプ
c: パルスダンパー, d: インジェクター
e: 反応管(固定化LDH), f: けい光検出器
g: 排出液, h: 記録計

3. 結果と考察

3-1 反応管の設計

反応管中での試料バンドの拡散ひろがりは Aris-Taylor の式によって次のように表わされる。

$$\sigma_l^2 = \frac{\kappa d^2 u L}{96D} \quad (2)$$

$$\sigma_t^2 = \frac{\kappa d^2 t}{96D} \quad (3)$$

$$\sigma_v^2 = \frac{\kappa d^2 V_r F}{96D} \quad (4)$$

σ_l^2 は試料バンドの分布幅を管の軸方向の長さ単位で表わした分散 (cm^2) であり、 σ_t^2 、 σ_v^2 は同様にそれぞれ時間単位 (sec^2)、体積単位 (cc^2) で表わした分散である。また、 κ は 2 次流れ係数、 d は反応管の内径 (cm)、 L は長さ (cm)、 t は試料の反応管中における滞留時間 (sec)、 u はキャリアー溶液の速度 (cm/sec)、 F は流速 (cc/sec)、 D は試料の拡散係数 (cm^2/sec) である。

σ_l^2 を反応管の長さ L で割った値を H とし、

$$H = \frac{\sigma_l^2}{L} = \frac{\kappa d^2 u}{96D} \quad (5)$$

u を変えながら H を測定し、 u と H の関係をプロットすると図 2 のような曲線が得られる。曲線の傾きが u のある値から減少しているのは低流速の領域では $\kappa=1.0$ であるが、ある流速に達すると κ が 1.0 以下になり流速が増すほど κ が減少するためである。

$H-u$ 曲線は実験的に求めることもできるが次に示すように Deelder の式を用いて κ の計算値を求め $H-u$ 曲線を描くこともできる。

Dn を Dean 数、 Sc を Schmidt 数とすれば、

$$Dn = \frac{d^{3/2} u \rho}{d_c^{1/2} \mu} \quad (6)$$

$$Sc = \frac{\eta \rho}{D} \quad (7)$$

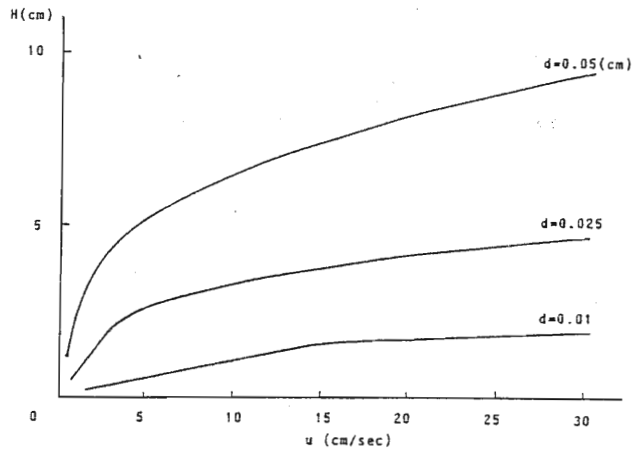


図 2 H-u 曲線

$\eta: 0.01 \text{ poise}$, $d_c: 11 \text{ cm}$, $D: 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$

であり、

$$\begin{aligned}
 & DnSc^{1/2} \leq 12.5 \quad \text{ならば} \\
 & \kappa = 1.0 \\
 & DnSc^{1/2} > 12.5 \quad \text{ならば} \\
 & \kappa = 5.6 \frac{(nd_c D)^{1/3}}{d\rho u^{2/3}} \quad \text{8)}
 \end{aligned}$$

である。ここで n は粘度、 ρ は密度、 d_c は反応管をコイル状に巻いて使用するときのコイル径である。H のほかにもう一つの変数 h を導入すると $H-u$ のプロットは大変簡単になり、また k も容易に求められるようになる。

$$h = \frac{H}{d} = \frac{\kappa du}{96D} \quad \text{9)}$$

$\kappa = 1.0$ のときには

$$\log h = \log d + \log u - \log 96D \quad \text{10)}$$

となり、図 3 に示すように、 $\log h$ と $\log u$ のプロットは傾き 1、切片 $\log d - \log D$ の直線となる。

一方 $\kappa < 1.0$ のときには

$$5.6 \frac{(nd_c)^{1/3}}{96\rho D^{2/3}} = A \quad \text{11)}$$

とおけば

$$\log h = \log A + \frac{1}{3} \log u \quad \text{12)}$$

となる。キャリアー溶液が水溶液の場合には近似的に $n=0.01$ poise、 $\rho=1.0$ 、 $D=1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ とおくことができるので、コイル径を一定とすれば A は定数とみなせる。 $d_c=11 \text{ cm}$ の場合 $A=60.2$ となる。したがって、図 3 に示すように、 $\kappa < 1.0$ の領域では反応管の内径とは無関係に $\log h$ と $\log u$ のプロットは傾き 0.33、切片 $1.78 (\log 60.2)$ の一本の直線で表わされる。 $h-u$ プロットは n 、 ρ 、 D 、 d_c が一定であれば、一定の内径の反応管に対して傾きの異なる 2 本の直線を描くだけでよいわけであり、 k の計算を必要とせず、 $H-u$ プロットに比

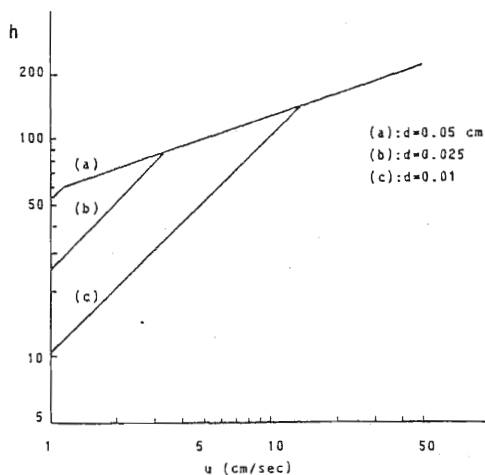


図 3 $h-u$ 曲線

$\eta: 0.01 \text{ poise}$, $d_c: 11 \text{ cm}$, $D: 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$

べると大変簡単に作図ができる。また一旦 $h-u$ 曲線を描いておけば、任意の u に対する k の値を図から容易に求めることができるという利点もある。

3-2 反応管の設計と最適操作条件の選定

3-1 では反応管中における試料バンドのひろがりだけを考えたが、実際には反応管以外に検出器のフローセル、試料注入部、連結管などが F I A システムに含まれるので、これらの全ての要素中でおこる試料バンドの拡散ひろがりを考慮しないと F I A 系の正しい設計はできない。

各構成要素中で生ずるひろがり独立に寄与しているとする、記録紙上で観察される応答曲線の各ピークのひろがりの分散 σ_T^2 は分散の加性を仮定すると次のような式で表わされる。

$$\sigma_T^2 = \sigma_r^2 + \sigma_s^2 + \sigma_d^2 + \sigma_c^2 \quad (13)$$

ここで σ_r^2 、 σ_s^2 、 σ_d^2 、 σ_c^2 はそれぞれ反応管中で生ずるひろがり、注入された直後の試料溶液自身が持っているひろがり、検出器中で生ずるひろがり、連結管中で生ずるひろがりを表わしており、これらを分散単位で表わしたものである。 σ_c^2 はわずかであるので無視することにし、その他の影響のみを考慮することにする。各分散を時間単位で表わして上式を書き直すと次の式が得られる。

$$\sigma_T^2 = \frac{\kappa d^2 t}{96D} + \frac{V_s^2}{12F^2} + \frac{V_d^2}{F^2} \quad (14)$$

いま記録紙上で1時間当たり S 本のピークを描き、1時間に S 個の試料の分析を行いたいと考えたとしよう。このようなことを可能にするためにはどのようにすればよいだろうか。応答曲線のピーク高さの測定によって正しい分析結果を得るためには、各ピークは完全に分離されていなければならない。そのために必要な条件は次の式によって表わされる。

$$6\sigma_T \leq \frac{60 \times 60}{S} \quad (15)$$

$$\sigma_T \leq \frac{600}{S} \quad (16)$$

16) 式を 14) 式に代入して書きなおすと、次のような関係が得られる。

$$\left(\frac{600}{S}\right)^2 \geq \frac{\kappa d^2 t}{96D} + \frac{1}{F^2} \left(\frac{V_s^2}{12} + V_d^2 \right) \quad (17)$$

$$\frac{H}{u} \leq \left(\frac{600}{S\sqrt{t}}\right)^2 - \frac{1}{tF^2} \left(\frac{V_s^2}{12} + V_d^2 \right) \quad (18)$$

$$\frac{H}{u} \leq \left(\frac{600}{S\sqrt{t}}\right)^2 - \frac{1}{\pi^2 d^4 t u^2} \left(\frac{4}{3} V_s^2 + 16V_d^2 \right) \quad (19)$$

このような不等式を満足するように F I A 系の条件 (u, d, V_s, V_d, t) を定めてやれば 1 時間当り S 個の試料の分析は可能になる。しかし試料注入は通常サンプリングバルブを用いて行われるので V_s を自由に調節することはできないし、検出器のフローセルの内容積 V_d も自由に調節することはできない。また反応時間 t は用いる反応によって定まるので、これも自由に選ぶことはできない。したがって、上記の実験条件の中でわれわれが自由に調節することができるのは、結局、反応管の長さ L 、内径 d とキャリヤー溶液の速度 u である。そこで、 t, V_s および V_d が与えられた時の F I A 系の設計について考えることにしよう。

適当な内径の反応管を選び、 u をいろいろに変えた場合の H/u の比を図 2 から読みとり、不等式 (19) を満足する u の最小値を求める。式 (19) は次のように書き換えられるので、図 3 の $h-u$ カーブを使って h/u の比を読みとり、不等式 (20) を満足するような u の最小値を探すようにしても同じである。

$$\frac{h}{u} \leq \left(\frac{600}{S\sqrt{dL}} \right)^2 - \frac{1}{\pi^2 d^5 t u^2} \left(\frac{4}{3} V_s^2 + 16 V_d^2 \right) \quad (20)$$

このようにして u の値が定まれば、反応管の長さおよび必要な操作圧力は次のようにして計算できる。

$$L = ut \quad (21)$$

$$\Delta P = \frac{32\eta L}{d^2} \times 0.9869 \times 10^{-6} \quad (\text{atm}) \quad (22)$$

たとえば、 $n=0.01$ poise, $d_c=11$ cm, $D=1 \times 10^{-5}$ cm²/sec, $d=0.025$ cm, $V_s=0.01$ cc, $V_d=0.01$ cc であるとき、 $t=30$ sec で $S=150$ を達成するためには、 $u=11$ cm/sec に設定しなければならない。必要な反応管の長さは $L=330$ cm であり、操作圧力は 1.83 atm を必要とする。

先きに $H-u$ カーブを実験的に求めることができると述べたが、上記のように反応管の設計にこれを用いる場合には、反応管における Taylor 拡散のみを反映している $H-u$ カーブを画いておかなければならない。厳密に言えばそのようなカーブを画くことは不可能であるが、次に示すように、反応管以外の要素における試料バンドのひろがりの影響が反応管における Taylor 拡散によるひろがりの 10% 以下であるとみなせる場合には、近似的に $H-u$ カーブは Taylor 拡散のみを反映していると考えることができる。(14) 式を体積単位の分散で書きなおすと次のようになる。

$$\sigma_T^2 = \sigma_{v,r}^2 + \frac{V_s^2}{12} + V_d^2 \quad (23)$$

ここで σ_T^2 は応答曲線のピークのひろがり分散であり、 $\sigma_{v,r}^2$ は反応管中で生ずる試料バンドのひろがり分散である。もし試料溶液自身ひろがり検出器中で生ずる試料バンドのひろがりが合せて $\sigma_{v,r}$ の 10% 以下ならば、

$$\sigma_T \leq 1.10 \sigma_{v,r} \quad (24)$$

$$\sigma_T^2 \leq 1.21\sigma_{V,r}^2 \quad (25)$$

であるから、次の関係が成立する。

$$\sigma_{V,r}^2 \geq 4.76 \left(\frac{V_s^2}{12} + V_d^2 \right) \quad (26)$$

たとえば、 $V_s = 0.01 \text{ cc}$ 、 $V_d = 0.008 \text{ cc}$ のときには

$$\sigma_{V,r}^2 \geq 0.000344 \text{ cc}^2 \quad (27)$$

でなければならないので、次式を用いて計算を行うと

$$\sigma_{V,r}^2 = \frac{\kappa d^2 V_r F}{96D} = \frac{\kappa \pi^2 d^6 L u}{96D} \quad (28)$$

$d = 0.025 \text{ cm}$ の反応管を用いて $u = 1.0 \text{ cm/sec}$ ($k = 1.0$) のキャリヤ流速で H を測定する場合には、次のような長さの反応管を必要とする。

同様の反応管を用いて $u = 5.0 \text{ cm/sec}$ ($k = 0.7896$)、 $u = 10.0 \text{ cm/sec}$ ($k = 0.4977$) のキャリヤ流速で H を測定する場合には、それぞれ次のようになる。

このような長さの反応管を用いて測定された $H-u$ カーブであれば、近似的に反応管中の Taylor 拡散のみが反映されているとみなせるので、反応管の設計に用いることができる。

3-3 固定化 LDH を用いる L-乳酸の分析

2. で述べたように LDH を固定化したホイスカ型反応管を用いて乳酸の定量を行った。けい光検出器によって得られるピーク高さの温度依存性と pH 依存性を調べたところ、最適温度は約 50°C 、最適 pH は 9.0 であった。しかし反応管の寿命を考慮して 40°C 前後の反応温度を採用することにした。反応時間は 20 秒が適当であり、反応管としては内径 0.03 cm のものを直径 11 cm のコイルに巻いて用いることにした。試料注入量は 0.01 cc とし、フローセルは内容積 0.008 cc のものを用いることにした。1 時間当たり 180 個の試料の分析を行うことにし、3-2 に述べた方法によって設計を行ったところ、長さ 300 cm の反応管を用い、キャリヤの速度は $u = 20 \text{ cm/sec}$ ($F = 0.85 \text{ cc/min}$) にすればよいことになった。そこで pH 9.0、 37°C において応答曲線を描いたところ、図 4 に示すような結果が得られた。設計上では $S = 180$ としたが、試料注入を自動化していないためこのようなサンプリング速度は実現できなかった。図 4 では $S = 120$ として応答曲線を描いた。この条件で乳酸の検出下限はほぼ 0.002 mM 程度であった。なお、反応管の耐久性を調べるために pH 7.5、温度 15°C の条件で 17 時間に 240 回試料注入を行なったが、ピーク高さに変化は見られなかった。

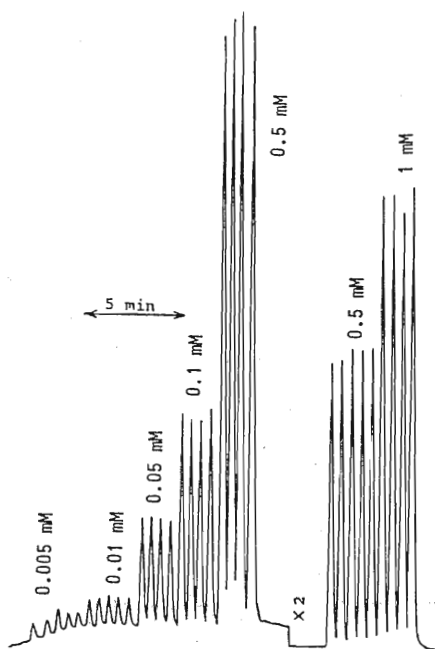


図4 lactate dehydrogenase による乳酸の定量
 反応管：ホイスカー型，内径 0.3 mm，長さ 300 cm
 反応時間：20 sec
 検出器：けい光光度計（励起 340 nm，測定 470 nm）

文献

- 1) 小島次雄、原 義明、森下富士夫、分析化学、32、E101 (1983)；日本分析化学会 30 年会で発表 (1980 年、10 月)
- 2) A. Iob, H. A. Mottola, Clin. Chem., 27, 195 (1981)；presented at the FACSS meeting in Philadelphia (October 1, 1980)

筆者連絡先：〒606 京都市左京区吉田本町
 京都大学工学部工業化学教室