

# 多機能型液クロ用ポンプを用いた

## グルコースの F I A 分析

桐 柴 純 一      馬 場 信 行

東洋曹達工業株式会社      科学計測開発部

〒252 神奈川県綾瀬市早川2743-1

---

Flow Injection Analysis for Glucose

Using Multi-Function Pump for HPLC

---

酵素を用いたグルコースの定量はバッチ法、或いはテクニコン式流れ分析法を用いて広く臨床分析に応用され数種類の分析キットも市販されるようになってきている。このグルコース分析法は酵素と基質の酵素反応を利用するもので反応に時間がかかりなかなか F I A に応用できないという欠点を持っていた。そこで送液ポンプとして筆者等が開発した多機能型液クロ用ポンプ C C P M を使い、また今回試作したバルブをも同時に使用して、試薬と試料を分割して直列に同時に注入する方法を採用し、検出器セル内に試料／試薬を滞在させるタイプのストップフロー法により 0 ~ 5 g / l の濃度範囲のグルコースを精度よく分析する事ができた。

### 1 .      緒      言

酵素を用いた分析法は高選択性で高感度な分析法として知られ、特に臨床分析の分野を中心に数多く行なわれている。従来酵素を活用する分析手法は分析条件の設定が難しく分析者自身の負担が大きくなることが指摘され、市販の簡易分析キットが大量に出回るようになり分析者の身近に採用される事となった。しかし今度は新たに通常の市販キットを使用する際には指定量の試薬、試料を使用しないと精度ある分析が出来ず、指定範囲外の試料濃度の分析あるいは試薬を節約して独自の分析条件を設定しようとした際、キットの指定した条件以外の分析の設定が極めて難しいという欠点も徐々に明らかとなってきている。特にこれら市販キットは従来の分析法に準じて作成されているため、最近の F I A のよ

うに試薬の節約を努力を払っている分析法に応用するにはやや融通性に欠ける面があった。

また最近の F I A の展開を見てみると、ルヂッカらによってグルコース 1) や二酸化硫黄 2) のストップフロー F I A が紹介され、酵素を用いた分析法が徐々に F I A に応用されるようになってきている。Mindegaardらはマージングゾーン系において試料と試薬に合流のズレを起こして両者を適当な濃度比で反応させるストップフロー F I A でアルブミンの定量を実現している 3) 。しかし、これらストップフロー F I A においては主にポンプの性能によってストップとフローの状態を実現してストップフロー法を行なうものが圧倒的であり、通常の F I A 用ポンプでは必ずしも正確なフローあるいはストップの状態を実現出来なく、更に試薬と試料の合流の再現性が悪かったり、キャリアーを 2 つ使用しなければならない等ハード上の欠点を抱えていた。

そこで筆者等が最近開発した多機能型高精度ポンプ C C P M (樹脂) を用いて簡易な操作で任意のストップ状態を正確に実現し、新規に試作した多機能型変則 2 重六方試料注入バルブ 4) を用いて試薬の無駄を極度に省いた試薬/試料注入方法を実現可能にするとともに、検出器セルないに試薬/試料をストップさせるストップフロー反応完結型 F I A により、高精度で信頼性のある新規 F I A 分析法を開発したので、ここに報告する。

## 2. 実 験

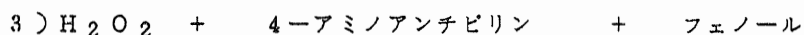
### 2-1. 試薬

標準試料のグルコースおよび試薬は和光純薬製のグルコース C テストワコーをそのまま使用した。また溶離液は 1 / 2 0 N のリン酸緩衝液 ( p H 7 . 4 ) を使用した。このキットの酵素反応の内容は

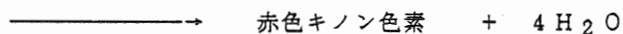
ムタローゼ



グルコースオキシダーゼ



パーオキシダーゼ



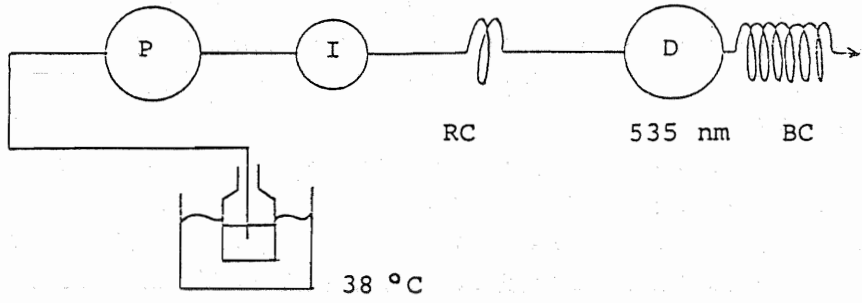


Fig. 1 Flow system for the determination of glucose

P:CCPM pump; I:12 port injector; D:Detector;  
 RC:Reaction tubing; BC:Back pressure tubing;

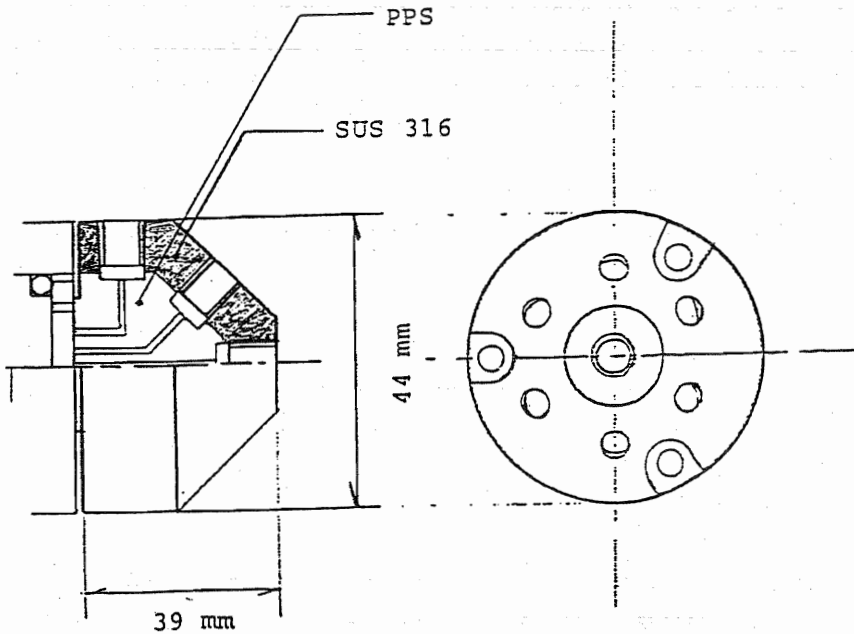


Fig. 2 12 port injection valvae

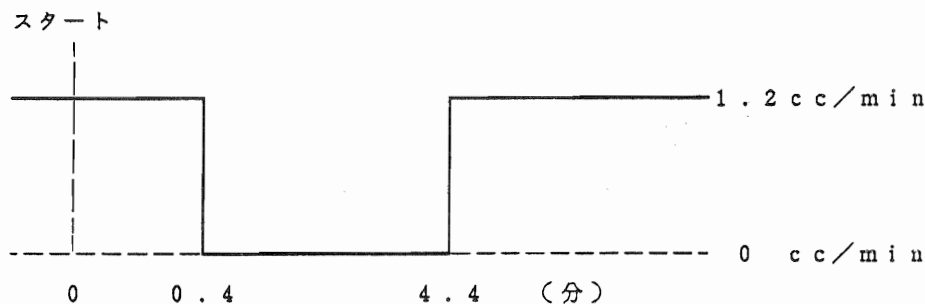
であり、最終のキノン色素の吸光度を測定することにより試料中のグルコースの濃度を求める分析方法である。なお通常の分析においては試料／試薬比は20／5000に設定されている。分析グルコースの量は通常の臨床分析を行なう0～5g／1の範囲とした。

## 2-2. 装置

Fig. 1に本実験における基本フローシステムを示す。チューブの内径0.6mmのテフロンチューブを用い、ポンプは液クロ用多機能型ポンプCCPM(樹脂仕様・東洋曹達製)、インジェクターは下記変則2重6方バルブ、検出器は紫外可視分光光度計UV-8000を用い、535nmの波長における吸光度変化を記録した。また反応コイルは75cm、フローセル後にはセル中での液の微妙な流動を防ぐために背圧コイルとして内径0.1mm長さ10mのテフロン管を設けた。検出器セル中の温度制御は難しいため溶離液を38度に一定に保った恒温槽に浸した。またポンプの吐出モードは2つのポンプを1つのポンプとして用いるデュアル機能とし、吐出最適化学習は設定流速で行なった。

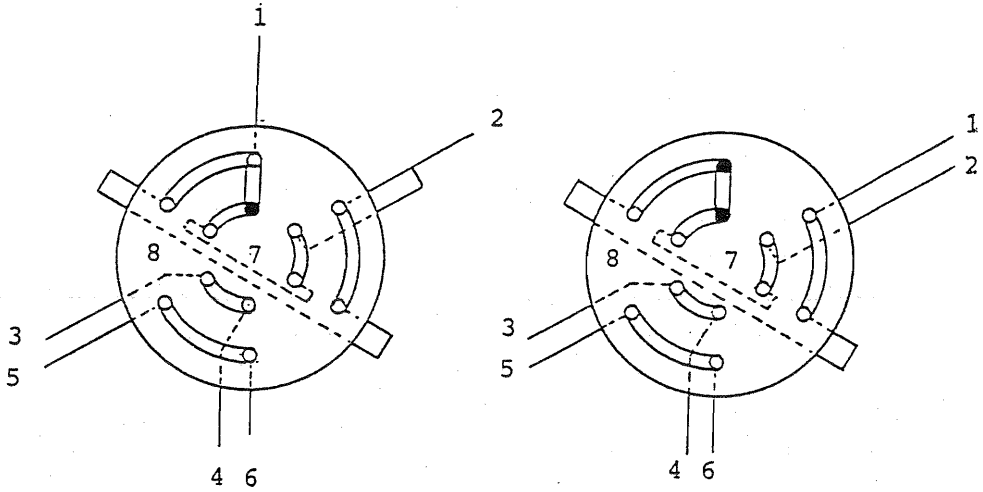
## 2-3. ストップフロー

CCPM(デュアル)を用いたストップフローを利用して希望の状態でセル中に試料をストップさせる方法としては、流速を固定してタイムプログラムを変化させる方法とタイムプログラムを固定して流速を変化させる2つの方法が考えられるが、前者においてはストップフローを行なうという特殊な条件下においては時間を変更する事はできないし、またCCPM(デュアル)は1～9999 $\mu$ lのあいだで1 $\mu$ lステップで流速設定ができ極めて高い分解能で条件設定が出来るため後者の方法を採用した。その際のフローグラジエントプログラムは下記のような内容とした。分割体積が20.40.60.100 $\mu$ lの時の流速はそれぞれ1.20、1.25、1.35、1.50ml/minであった。



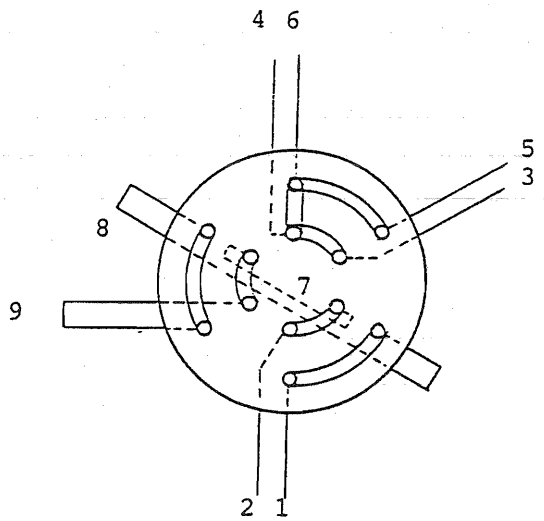
## 2-4. バルブ

今回の実験では新たにFig. 2のような断面図の変則2重6方バルブを試作した。穴径は0.8mm、接液部の材質はPPS(ポリフェニレンサルファイト)樹脂、外壁はSUS316とし回転動作はモータによる制御とした。今回検討した3種類の注入方法はFig. 3に示す配管方法で全て該バルブにて行なった。なおこのバルブには多機能な注入方法を効率よく実現するために中心に1つ配管用の穴が開いているが今回の実験では使用しなかった。またFig. 3はバルブの”注入”位置の液連絡略図のみ示した。



(a) Merging zone

(b) Series



(c) Separate series

Fig. 3 Valve connection diagram

1;flow in 2;flow out 3;sample in 4;sample out  
 5;reagent in 6;reagent out 7;sample loop  
 8;reagent loop 9;separate loop ● close

### 3. 結果と考察

#### 3-1. "Separate Series Injection"

試料/試薬の注入方法としては

1. マージングゾーン注入法
2. 直列2液注入法
3. 分割直列2液注入法

の3つを検討したが(Fig. 4)、通常のマージングゾーン注入法ではMindegaardらが既に指摘しているように試料濃度が高すぎて検量性のある分析ができなかった。また2.の直列2液注入法でもマージングゾーン分析法ほどではないが、該キットの仕様のような20/5000あるいはその値に近い分析条件を実現することはできなかった。そこで、試料と試薬を溶離液で分割して注入する"Separate Series Injection"法を採用し、その注入方法を12ポートバルブで行なった。

#### 3-2. 試料/試薬体積比

該キットの試料/試薬指定体積比が20/5000で設計しており、試薬量節約の意味からも試料量をできるだけ低く押さえることが必要だが、バルブの構造上の問題から試料量は20 $\mu$ lとした。そこで試料量20 $\mu$ lで、試薬体積を20、50、100、200と変えて実験を行なったが、試薬体積が少なすぎると検量線が高濃度域(特に5g/lにおいて)で寝てくる現象が見られ、また試薬節約の意味から無暗に試薬量を増やせないため試薬量は100 $\mu$ lとした。

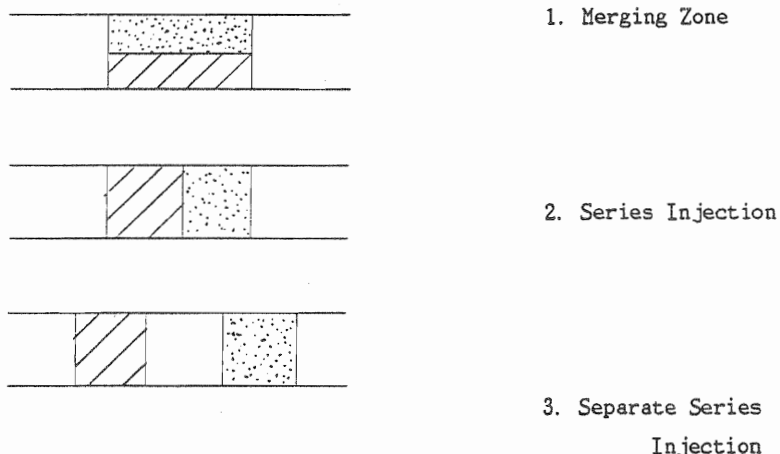


Fig. 4 Injection Method

#### 3-3. 分割体積の検討

試料20 $\mu$ l、試薬100 $\mu$ lの条件で分割体積を20、40、60、100と変化さ

せて分析条件の設定を行なった。分割体積が  $20 \mu\text{l}$  では直列 2 液注入法と同様検量線に直線性のある結果は得られなかった。また  $40 \mu\text{l}$  ではごく一部で検量線に直線性のあるデータが得られたもののそのセグメント領域は微小のものであった。そして  $60 \mu\text{l}$  になるとやや広い範囲でしかも再現性のあるデータが得られた。また分割体積が  $100 \mu\text{l}$  になると直線性のあるセグメント領域は増えるものの感度が極端に減少するため通常の分析ができないという欠点を生じた。そこで、最終的な "Separate Series Injection" 注入の条件は試料・分割・試薬体積としてそれぞれ  $20 \cdot 60 \cdot 100 \mu\text{l}$  とした。

### 3-4. 停止時間

停止時間として 10 分を設定しその際のセルの吸光度変化を  $3 \text{ g} \cdot 5 \text{ g}$  のグルコース濃度を例にとり記録計に記録したものが Fig. 5 である。短時間の間に酵素反応により液の吸光度が大きく変化し通常の分析に適用できるほど十分な感度になっている事が明らかとなった。また 2.4.6 分の停止時間における液の吸光度とグルコースの濃度を比較したものが Fig. 6 である。停止時間 2 分の場合検量線に直線性がなく、直線性が得られる停止時間として少なくとも 4 分が必要なため停止時間は 4 分とした。停止時間が長くなるほど検量線は極めて直線性が高く傾斜の急なものとなっている。指定停止時間の 5 分より速く定量性が出たのは、最初の送液時の拡散・攪拌現象によるものと思われる。

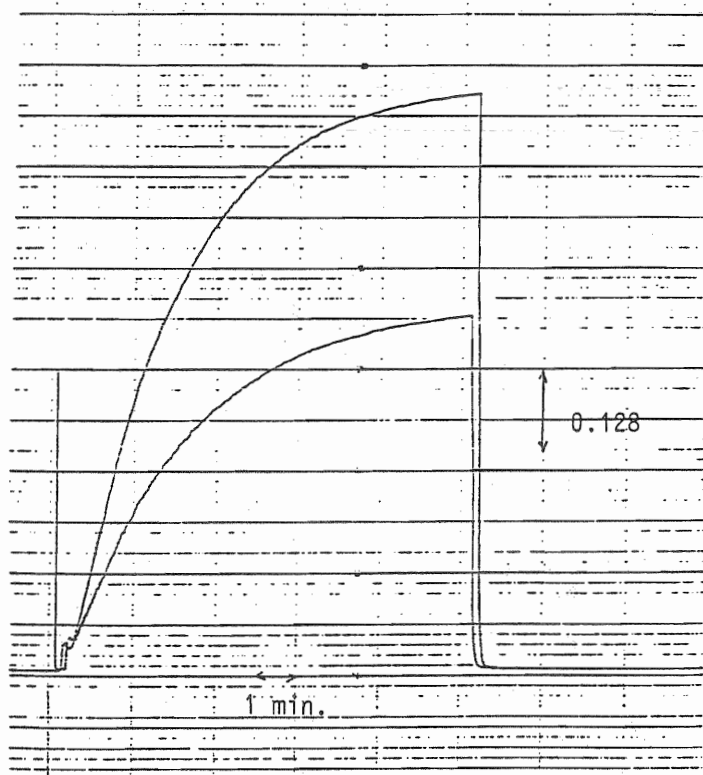


Fig. 5 Signals in flow cell

### 3-5 再現性

2 g/l のグルコースを使用し停止時間4分で5回のストップフロー分析を行なった結果がTable 1である。このようにストップフローFIAという不安定な条件下でも極めて高い再現性で分析ができたのは、

回数	ピーク高さ
1	4.56
2	4.30
3	4.41
4	4.32
5	4.33
平均	4.38
R.S.D	2.18%

Table 1 再現性

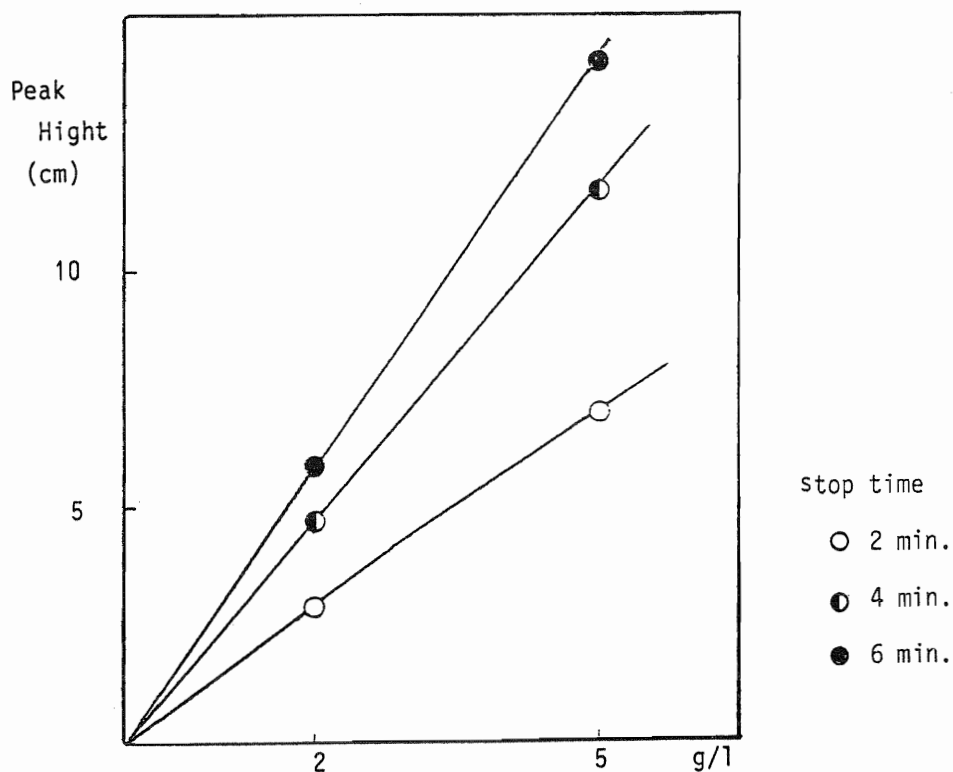


Fig. 6 Calibration curve for glucose



- (1) ポンプの自己学習機能により低圧系においても吐出最適モードの検索をポンプコンピュータが自動的にこなす
- (2) 学習した吐出状態を正確に再現する  
というポンプのコンピュータプログラムの持つ高い機能に加えて
- (3) バルスモータ及びそれに直結したカムをもちいた駆動系による瞬時のフローおよびストップ状態の実現  
というポンプのハード上の機能に起因するものである。5)

#### 4 結 語

従来のバッチ式の試薬キットをそのままFIA分析に応用し、充分使用できることを確認したと共に1/50の試薬量でちょうどバッチ式と同じ12検体/時間でグルコースを定量する事に成功した。市販の多機能型液クロ用ポンプを用いてストップフローFIAを行なったが、非常に低圧系においても学習機能を有するポンプが精度あるFIA分析に応用可能である事が分かった。また新規多機能型バルブを開発し新しいタイプの試薬/試料注入法を検討したが、簡易な操作で飛躍的に試薬量を減少させた分析法に該バルブが応用可能であることが分かった。これからストップフローFIAの研究課題としては更に具体的な分析目標を広げるとともに、分析時間を短縮するため反応速度分析プログラムを利用することが必要であろう。視野を広げて広くFIAの分野に目を向けると、技術的問題として残っていた数々の問題を今回使用した多機能型液クロ・FIA両用ポンプおよび多機能型液クロ・FIA両用バルブ等の装置をうまくコンビネーションして解決して行きたい。

#### 5 文 献

- 1) J. Ruzika, H. Hansen                      Anal. Chim. Acta 106, 207(1979)
- 2) J. Ruzika, H. Hansen                      Anal. Chim. Acta 114, 19(1980)
- 3) J. Mindegaard                              Anal. Chim. Acta 104, 185(1979)
- 4) 桐 栄 純 一                                  日本特許出願番号 59-239532
- 5) 馬場 信行    宝迫 敬一    松下 駿    多田 芳光

東洋曹達研究報告 27, 21(1983)

FLOW INJECTION ANALYSIS FOR GLUCOSE USING MULTI-FUNCTION  
PUMP FOR HPLC

Jun-ichi TOEI Nobuyuki BABA

Development department, Scientific instrument division

Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.

A new sensitive method has been developed for the determination of glucose by stopped-flow flow injection analysis (FIA). Sample and reagent were injected separately with new-type double-hexagonal injection valve in order to adjust the sample/reagent ratio to a suitable analytical condition. Sample/reagent were stopped in the flow cell by multi-function pump for HPLC (CCPM) and absorbance was monitored at 535 nm. Sample volume, reagent volume, separation volume and reaction time were examined by FIA. The sampling rate was 12 samples/h. and the consumption of reagent was 100 ul/sample.