

マーキングゾーン法を用いた
フローインジェクション分析による
グルコースの定量

友田 正子^{*}, 吉沢 大輔^{*}, 内田 和秀^{**}, 福島 和昭^{**}, 斉藤 真一^{*}

^{*}上智大学理工学部一般科学研究室 〒102千代田区紀尾井町7-1

^{**}防衛医科大学校麻酔学教室 〒359所沢市並木3-2

D e t e r m i n a t i o n o f G l u c o s e b y
F l o w I n j e c t i o n A n a l y s i s w i t h
M e r g i n g Z o n e M e t h o d

Masako Tomoda^{*}, Daisuke Yoshizawa^{*}, Kazuhide Uchida^{**},
Kazuaki Fukushima^{**} and Shin-ichi Saito^{*}

^{*}General Science Laboratory, Faculty of Science and Engineering,
Sophia University, 7-1 Kioicho chiyoda-ku, Tokyo 102

^{**}Department of Anesthesiology, National Defense Medical College,
3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama 359

The applicability to clinical test of the present method is higher than conventional methods. This is because the method never uses the immobilized enzyme method, which requires a large quantity of enzyme or special techniques or a long time for production of enzyme reactors, and which also requires the monitoring of the decline of the enzyme activity during successive assays. Moreover, the presented system is simpler than the multiple flow system which results in deterioration of reproducibility and is cheaper than conventional method using the automatic system (e.g. auto-sampler, auto-injector, computer, etc) which needs expensive initial and running costs. Consequently, the most simple

system and the merging zone method were used. (see reference 8 concerning the difinite results)

1 緒 言

ヒト血しょう中グルコース(Glu)の定量法が従来から種々開発されてきた。Glu定量が今日の臨床検査にとって、重要な検査項目であることは疑いのない事実である。フローインジェクション分析法(FIA)は、迅速、簡便であることから近年広く臨床化学の分野に応用されている^{1,2)}。酵素を用いたGlu定量については既にいくつかの報告があり³⁻⁷⁾、著者らもマーキングゾーン法を用いたFIAによるGlu定量について要約的にふれたが⁸⁾、その詳細について今回ここに報告する。

本法は従来法に比較し、臨床検査に応用性の高い定量法である。例えば酵素反応器を製作するために多量の酵素、専門技術及び長時間を必要とし、かつ分析毎に酵素活性の低下に注意を必要とする固定化酵素法や、再現性の悪化をまねくFIAに於ける多流路送液及び、initial costを上げる各機器(auto sampler, auto injector, computer,その他)は一切使用していない。分析システムと分析法はinitial costとrunning costを考慮し、最も簡単なシステムとマーキングゾーン法を用いた。

2 実 験

2. 1 試薬

試薬調製の迅速化のために、Glu測定用酵素キット(ヤトロン イアトロクロム GLU-Lq)を利用した。酵素キットは1.6 U/mlムタロターゼ、 17×10^4 U/mlグルコースオキシダーゼ、 5.6×10^3 U/ml ペルオキシダーゼ、1.0 mM 4-アミノアンチピリン、他を含む酵素溶液(300 ml)と1.7 mM 3,5-ジメトキシアニリノプロパンスルホン酸、他を含む発色溶液(300 ml)から構成されている。

Glu標準試料は光電用10.0 mg/ml Glu標準溶液(和光純薬工業)を、アスコルビン酸オキシダーゼ(AAO)はヤトロン製(160 U/vial)を用いた。

界面活性剤はTriton X-100に相当するOP-10(日本サーファクタント工業)を充当した。

他の試薬は総べて特級を用い、水はMilli-R0とMilli-Qシステム(日本ミリポア)で精製した超純水を用いた。

各種コントロール血清についてはTable 3に記す。

2. 2 装置

ポンプ：Gilson社製Minipuls-2型ペリスタ式ポンプ2台を用いた。ポンプチューブは専用の塩化ビニル製の物を用いた。

サンプルインジェクター⁹⁾：協和精密製KMM-6V-2型サンプルインジェクターを用いた¹⁰⁾。

検出器：応用分光機器製UVILOG-7V型分光光度計を使用した。

恒温槽：三陽理科機器製SYK-382-M型恒温槽を用いた。

記録計：東亜電波工業製FBR-251A型記録計を使用した。

2. 3 実験方法

種々の検討結果をもとに、組み立てたFIAシステムのフローダイアグラムをFig.1に示す。ポンプチューブ以外のチューブ及びコネクターは総べてテフロン製の物を用いた。流量は操作毎にポンプを微調整し、吸入量を各流路別に測定して正確に決めた。

Glu定量の最適条件を検討する以前に、(C₁)と(C₂)の合流点にあたる連結器（高速液体クロマトグラフィーの分野に於いて、mixerやmixing deviceと呼ばれ、用いられているものがある¹¹⁻¹³⁾。）をメチルオレンジによる予備実験¹⁰⁾を行うことにより、T字型、Y字型及びうず流れ式^{14,15)}（協和精密 K3P-U, KYU-1及びKZU-1）の3つのmixing jointから選択した。ライン接続方法は2つのキャリアーが挟む角度を各々180, 90, 及び180°のみとしたが、KZU-1は入路の内径が異なるために、ラインの接続を相互に換え、二種類の実験を行った。同様の実験にて、ダンパーコイル(DC₁, DC₂)の使用を検討した。

(C₁)と(C₂)の流量比(FR₂/FR₁)、混合コイル長(M₁, M₂)反応コイル長(RC)、恒温槽(T)の温度および試料中のアスコルビン酸の影響について各々検討した。

2. 4 測定原理

KMM-6V-2の2つの六方バルブに、試料と試薬を樹脂製注射筒1及び10 ml（例えばテルモ製ディスポーザブルシリンジ）で、各々250及び1000 μlを別々に、ループ内残存キャリアーに希釈されぬように過剰充填する。KMM-6V-2は1本のレバーの切り換え操作により、試料と試薬を同時にflow system内に注入（体積はFig.1参照）できる。各々(M₁)(M₂)中をキャリアー(C₁)(C₂)で送液され、mixing jointで合流し、恒温槽(T)内のRC中でFig.2に示す反応経路をたどる。検出器(D)にて波長580 nmの吸光度変化を測定記録する。チャート上のピーク高をデジタル表示のノギス

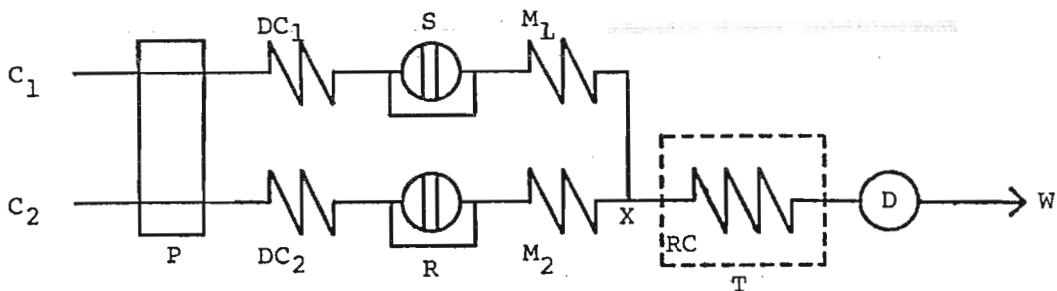


Fig. 1 A flow diagram for the determination of glucose
 The optimum conditions were C_1 and C_2 : Carrier
 (phosphate buffer, pH 6.95 containing 0.15 mol dm^{-3}
 NaCl and 0.6% (v/v) Triton X-100); P: Peristaltic
 pump (Gilson Minipuls 2); DC_1 and DC_2 : Damper coil
 (silicone rubber tube, 1 mm id x 60 cm); S and R:
 Prepared sample (100 mm^3) and reagent (790 mm^3)
 injector, (Kyowaseimitsu KMM-6V-2); M_1 and M_2 ;
 Mixing coil (0.5 mm id x 10 cm); RC: Reaction coil
 (0.5 mm id x 15 m); T: Thermostatic water bath
 (Sanyo Rikagakukikai SYK-382-M), at 45°C ; D: Detector,
 spectrophotometer (Oyo Bunko Kiki UVILOG-7V), $\lambda = 580 \text{ nm}$;
 W: Waste.
 Flow rate: $C_1 = 0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $C_2 = 2.0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

(三豊製作所製CD-20S)にて計測し、吸光度に換算した検量線を用い、試料中のGluを定量する。

3 結果と考察

3. 1 mixing jointの選択とダンパー効果の有無

試薬側バルブに注入する塩酸溶液に、粘度を変化させる目的で、グリセリンを0, 5, 10v/v%添加したときのピーク半値巾をTable 1に示す。KYU-1及びKZU-1では試薬粘度が増加すると半値巾は減少した。これはジョイント部に於ける分散が減少していることを意味している。生体試料などの比較的粘度が高い試料を測定する場合に於いてもK3P-Uが一番粘度の影響が少ないと思われるが、酵素を用いた定量に於いて再現性は、最も重要な点の1つである。よってKYU-1及びKZU-1を用いて再検討を行った結果をTable 2に示す。表より両者間には、統計的に有意の差はなかった。そこで構造がシンプルで、低価格のKYU-1を用いることにした。

3. 2 キャリヤー(C_1)と(C_2)の流量比(FR_2/FR_1)及び総流量(FR_1+FR_2)の検討

FR_2/FR_1 の吸光度に対する影響をFig.3に示す。 $FR_2/FR_1=6$ に於ける傾きが最も小さくなった原因として、 FR_1+FR_2 が大きく、反応コイル中での試料及び試薬の滞在時間が短くなり、反応が抑制されたものと考察した。感度及び定量範囲を考慮し、 FR_2/FR_1 を4に決定した。また FR_1+FR_2 を $2.1-3.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ まで変化させた結果、感度、定量範囲及びサンプリング速度により $3.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ を選択した。

3. 3 混合コイル長(M_1)(M_2)の検討

M_1 を10 cmに固定したときの、 M_2 の長さの影響をFig.4に示す。 M_2 が短くなるとともに吸光度は増加し、10 cmの時に最大の吸光度を示した。 M_2 を固定し、 M_1 を変化させた場合、試料と試薬の混合が効果的に行われず、吸光度が比例しなかった。よって M_1 及び M_2 を共に10 cmとした。

3. 4 反応コイル長(RC)の検討

RCは反応時間とsampleの分散に直接関与し、特に酵素反応のような比較的遅い反応を用いる定量に於いては、その選択がflow systemの要となる。RCを5-20 m間で変化させた時の吸光度に対する効果をFig.5に示す。定量範囲及びサンプリング速度を考慮し、RCを15 mに決定した。

3. 5 恒温槽の温度を35-50℃間で変化させた結果をFig.6に示す。各温度の定量範囲(直線域)に於ける感度は、ほぼ等しい結果となった。35℃ではGlu濃度 15 mg dl^{-1} に於いて、急激な吸光度の低下が確認され、40-50℃では 25 mg dl^{-1} に

Table 1 Effect of connector and viscosity

Connector used		Concentration of glycerine(v/v)		
		0 %	5 %	10 %
K3P-U	\bar{x} /mm	145.64	144.31	143.07
	RSD/%	1.895	1.123	1.016
	V/mm	8.463	2.918	2.348
	n	10	10	10
KYU-1	\bar{x} /mm	151.91	152.80	151.89
	RSD/%	0.700	0.728	0.315
	V/mm	1.294	1.393	0.255
	n	8	9	10
KZU-1*	\bar{x} /mm	151.37	152.90	152.13
	RSD/%	1.037	0.321	0.373
	V/mm	2.379	0.268	0.358
	n	10	10	10
KZU-1**	\bar{x} /mm	151.52	153.41	154.14
	RSD/%	0.731	0.738	1.201
	V/mm	1.364	1.424	3.806
	n	10	10	10

Inlet i.d. for sample and reagent sides

* : 0.8 mm ; reagent 0.3 mm ; sample

** : 0.8 mm ; sample 0.3 mm ; reagent

Table 2 Effect of connector

Connector used		
KYU-1	\bar{x} /mm	160.03
	RSD/%	0.551
	V/mm	0.819
	n	20
KZU-1*	\bar{x} /mm	159.91
	RSD/%	0.464
	V/mm	0.580
	n	20
KZU-1**	\bar{x} /mm	158.36
	RSD/%	0.422
	V/mm	0.471
	n	20

Inlet i.d. for sample and reagent sides

* : 0.8 mm ; reagent 0.3 mm ; sample

** : 0.8 mm ; sample 0.3 mm ; reagent

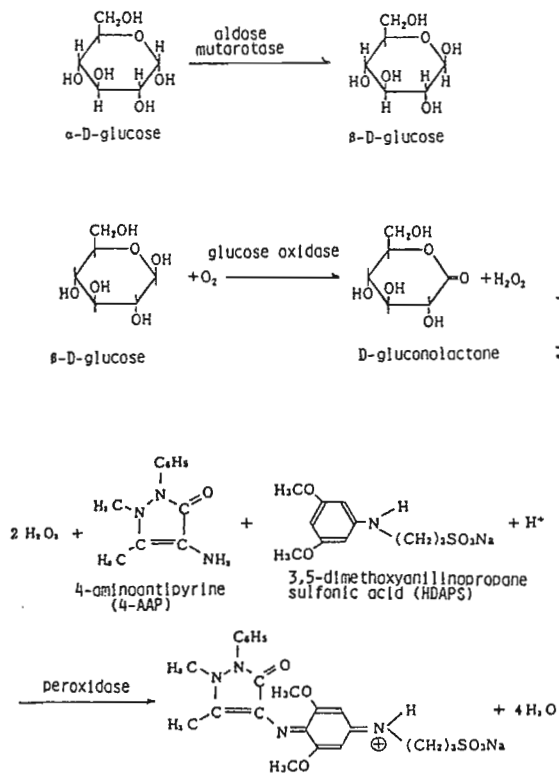
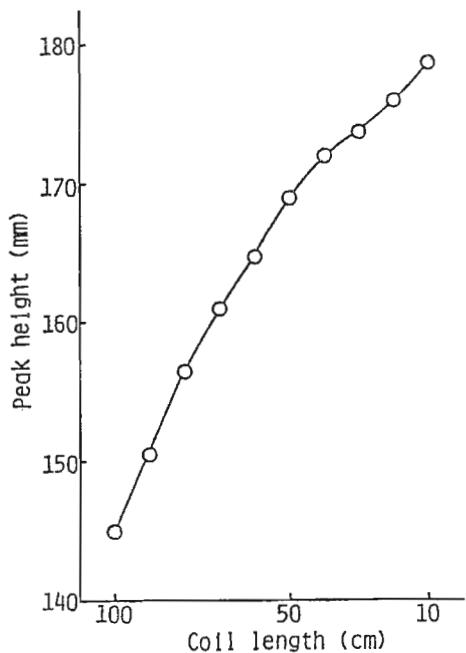


Fig. 2 Reaction systems



Effect of the mixing coil length (M_2)
 Fig. 4 M_1 length was constant (10 cm),

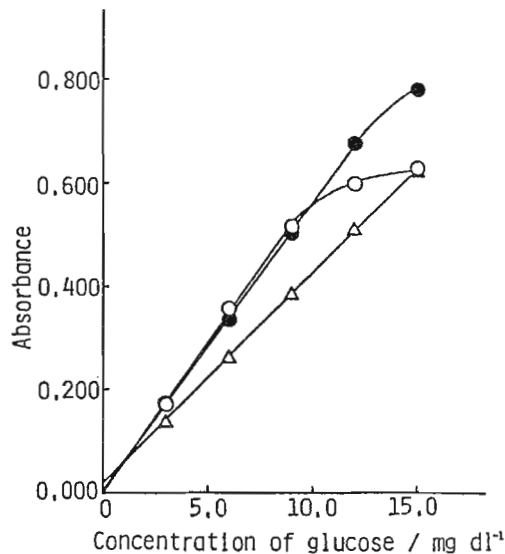


Fig. 3 Effect of the proportion of flow rates between C_1 and C_2

FR_1 (0.5 cm³min⁻¹) and M_1 (10 cm) were constant

- : $FR_2/FR_1 = 2$; $M_2 = 20$ cm
- : $FR_2/FR_1 = 4$; $M_2 = 40$ cm
- △ : $FR_2/FR_1 = 6$; $M_2 = 60$ cm

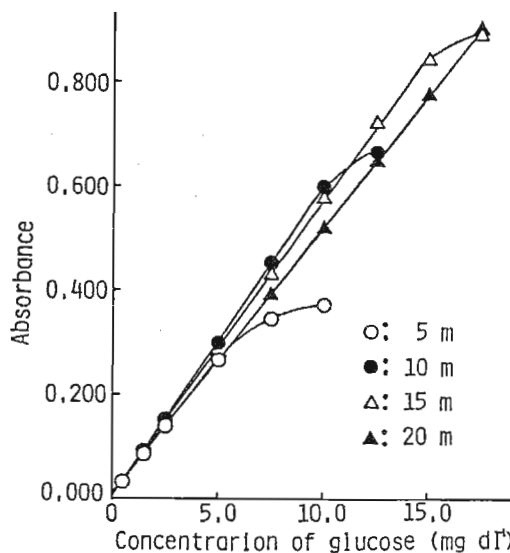


Fig. 5 Effect of the reaction coil length

於いて差が生じた。しかし0-15 mg dl⁻¹に於いて、45℃が僅かではあるものの、感度及び相関係数が良好であった。また50℃では15 mg dl⁻¹以下に於いて、酵素の活性低下によるものと思われる吸光度の低下が観察された。以上より恒温槽の温度を45℃に決定した。

3. 6 アスコルビン酸の妨害とその対策

アスコルビン酸はその強い還元力により反応を妨害するが、それにかかわらずしばしば医療機関では患者に対し、アスコルビン酸を投与することがある。よってアスコルビン酸の妨害とそれを防ぐため、AAOの添加について検討した。AAO添加（最終濃度 0.51 U/ml）及び未添加試料によるアスコルビン酸濃度に対する吸光度の変化をFig.7に示す。AAOは界面活性剤を含まないキャリアー溶液に溶解して用いた。50 mg dl⁻¹アスコルビン酸に於ける吸光度低下率は、AAO未添加試料で14.1 %となったが、添加試料では0.5 %にとどまった。従って50 mg dl⁻¹までのアスコルビン酸の影響は消去され、本法に於いて著しい妨害は示さない。

3. 7 検量線

以上、決定条件下での検量線をFig.8に示す。Glu定量範囲は0-18 mg dl⁻¹で、この範囲に於ける相関係数は $r=0.9998$ であった。また10 mg dl⁻¹ Glu標準試料に於ける相対標準偏差はRSD=0.242 % (n=20)であり、検体処理時間は約1.5分であった。

3. 8 添加回収試験

各種コントロール血清中Gluの測定値及び添加回収試験の結果をTable 3に示す。各種試料の測定結果は参考値と良く一致し、回収率も良好であった。またコントロール血清を試料に用いた同時再現性はRSD=0.407 % (n=20)であり、日間再現性は8試料に於いて0.8 %以下と満足の行く結果を得た。

4 結 語

酵素キットを用いる用手法と比較し、本法は試料体積を1/4に、酵素消費量を1/3にすることを可能にしたばかりではなく、測定時間も大幅に短縮出来た。同時再現性及び日間再現性も良好であり、ヒト血しょう中Glu定量に於いて分光光度法以外の測定法とも非常に良く一致した⁸⁾。更に本法は操作の簡便性、測定原理の信頼性及び経済性(initial and running costs)を兼ね備え、Glu定量に広く応用されることが望まれる。

なお本報告の一部を日本化学会第54春季年会にて発表した。

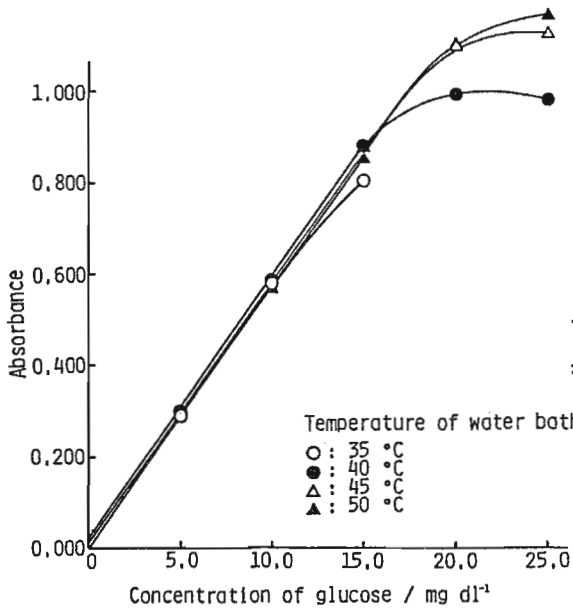


Fig. 6 Effect of temperature of water bath

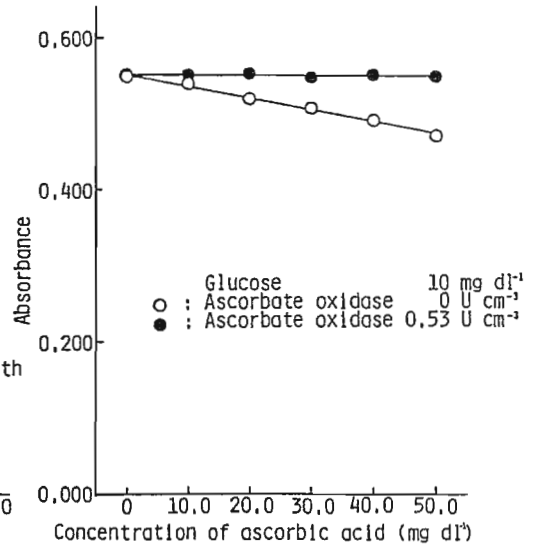


Fig. 7 Effect of ascorbate oxidase

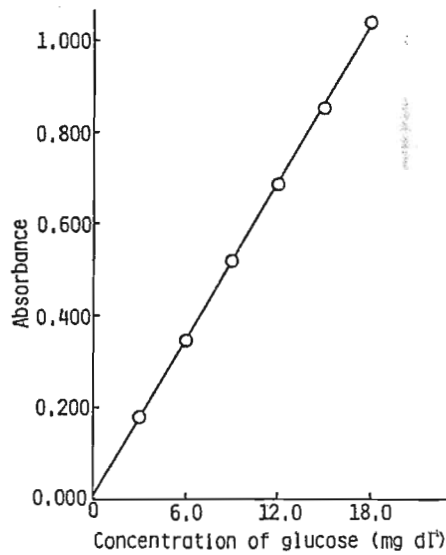


Fig. 8 Calibration curve for determination of glucose

Table 3 The recovery test of glucose in control sera

Sample	Added (mg dl ⁻¹)	Found (mg dl ⁻¹)	Recovered (mg dl ⁻¹)	Recovery (%)	Reference value* (mg dl ⁻¹)
Fisher Scientific					
Sera Chem level 1	0	77	-	-	79 ± 4
	60	135	58	97	
	120	193	116	97	
Sera Chem level 2	0	251	-	-	258 ± 12
	60	309	58	97	
	120	369	118	98	
Cooper Biomedical					
Hyland Diagnostics I	0	82	-	-	82 ± 5
	60	140	58	97	
	120	199	117	98	
Hyland Diagnostics II	0	243	-	-	249 ± 12
	60	303	60	100	
	120	362	119	99	
Sanko Junyaku					
EXA normal	0	89	-	-	92 ± 5
	60	146	57	95	
	120	206	117	98	
abnormal	0	320	-	-	322 ± 15
	60	383	63	105	
	120	441	121	101	
Pure Chemical					
Industries					
Control Serum I Wako	0	66	-	-	68 ± 8
	60	125	59	98	
	120	183	117	98	
Control Serum II Wako	0	246	-	-	257 ± 14
	60	305	59	98	
	120	365	119	99	

* from the operating manual of each kit

文 献

- 1) B. Rocks and C. Riley, Clin. Chem., 28, 409(1982).
- 2) C. Riley, Talanta, 31, 879(1984).
- 3) E. H. Hansen, J. Ruzicka and B. Rietz, Anal. Chim. Acta, 89, 241 (1977).
- 4) J. Ruzicka and E. H. Hansen, Anal. Chim. Acta, 106, 207(1979).
- 5) L. Gorton and L. Ogren, Anal. Chim. Acta, 130, 45(1981).
- 6) P. J. Worsfold, Anal. Chim. Acta, 145, 117(1983).
- 7) P. Roehrig, C. M. Wolff and J. P. Schwing, Anal. Chim. Acta, 153, 181(1983).
- 8) Kazuhide Uchida, Daisuke Yoshizawa, Masako Tomoda and Shi-ichi Saito, Anal. Sci., 3, 181(1987).
- 9) 内田和秀, 友田正子, 斉藤真一, J. Flow Injection Anal., 2, 143(1985).
- 10) 内田和秀, 友田正子, 斉藤真一, J. Flow Injection Anal., 3, 18(1986).
- 11) S. Kats, W. W. Pitt, Jr. and G. Jones, Jr., Clin. Chem., 19, 817 (1973).
- 12) R. W. Frei, L. Michel and W. Santi, J.Chromatogr., 126, 665(1976).
- 13) R. W. Frei, L. Michel and W. Santi, J.Chromatogr., 142, 261(1977).
- 14) Shin-ichiro Kobayakawa and Kazuhiro Imai, Anal. Chem., 52, 1548 (1980).
- 15) Shin-ichiro Kobayashi, Jun Sekino, Kazumasa H- Anal. Biochem., 112, 99(1981).

謝 辞

本論文提出にあたり英文要旨を御校閲いただいた, 上智大 F.S.Howell博士に感謝致します。

(1987年4月28日)