

手動二連六方バルブ型サンプル インジェクターの応用性

友田 正子¹, 内田 和秀², 福島 和昭², 斉藤 真一¹

¹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

²防衛医科大学校麻酔学教室

〒359 所沢市並木 3-2

The application of a manually
operated sample injector employing
a pair of six-way valve systems

Masako Tomoda¹, Kazuhide Uchida², Kazuaki Fukushima² and
Shin-ichi Saito¹

¹Department of Natural Sciences, Faculty of Science and Technology,
Sophia University, 7-1 Kioicho, Chiyoda-ku, Tokyo 102

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

A pair of six-way valve systems, model KMM-6V-2, has been previously developed as a sample injector by the authors. Here new uses of the system as switching valves and as sample injectors are presented. In some studies using merging zone technique, the valve system has improved usefulness with its ease and reproducibility of operation. Moreover, simultaneous injection of sample and reagent is also possible with KMM-6V-2, besides being possible with the merging zone technique. Several uses of KMM-6V-2 as switching valve are proposed: for instance, it can be used for making one or two closing systems, and for modifying the carrier stream. The use of KMM-6V-2 in various roles will allow the

1 緒 言

著者らは既にフローインジェクション分析に於けるサンプルインジェクターの比較を行い¹⁾, 得られたいくつかの知見により, 手動二連六方バルブ型サンプルインジェクターの企画開発を行った²⁾. 今回その応用面に着目し, 手動二連六方バルブ型サンプルインジェクター (協和精密製, KMM-6V-2型) の種々の使用法について検討したのでここに報告する.

2 使用法

KMM-6V-2型サンプルインジェクターは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用の切換えバルブを, FIA に於けるサンプルインジェクター用に改造したものであるから, インジェクションポートのパーツを接続パーツへ交換することのみで, 切換えバルブとして使用可能である. 従ってKMM-6V-2の使用法はflow system への試料の導入とflow line のswitching に大別出来る.

2. 1 KMM-6V-2を試料導入に使用する場合

最も単純な例は2つある六方バルブの片側のみを用いて, 試料を単独で導入する方法である. KMM-6V-2を組織中ヒドロキシプロリンの定量に使用した時のflow diagramをFig.1に示す³⁾. 他のサンプルインジェクターを用いた場合⁴⁾と比較し, dead volume が減少した分, 必要とする試料の導入体積及び過剰流出体積を減量出来た. また導入体積の減量によりピーク巾がせばまり, 測定時間も短縮された.

次にKMM-6V-2の連動する2つの六方バルブを用いて, 試料と試薬を同時に別々のラインに導入するマーキングゾーン法がある. KMM-6V-2を血漿中グルコースの定量に使用した時のflow diagramをFig.2 に示す^{5,6)}. マーキングゾーン法により高価な酵素試薬の消費を必要最少限にし, 良好な結果が得られた. 著者らは以前にKMM-6V型サンプルインジェクター¹⁾二台を用い, マーキングゾーン法による硝酸性窒素と亜硝酸性窒素の逐次定量について報告したが⁷⁾, KMM-6V-2は操作性, 信頼性の面でそれをうわまわるものである.

その他Fig.3Aに示すチューブの接続法により, 試料と試薬を同時に単一流路に導入可能である. これは試料と試薬が接するサンドイッチ法とは異なり, separate series injection と呼ばれている注入法である⁸⁾. 試料と試薬をキャ

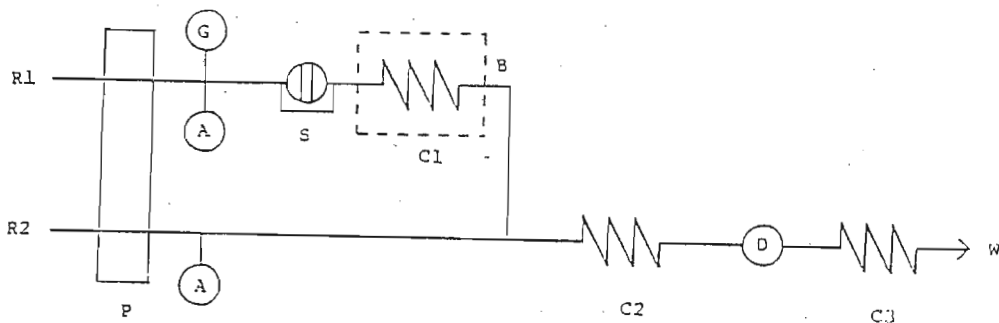


Fig. 1 A flow diagram for the determination of hydroxyproline

R1: Buffer and oxidant solution; R2: Ehrlich's reagent solution; P: Plunger pump (Kyowaseimitsu KHU-W-294); G: Pressure gauge (Kyowaseimitsu KPH-50L); A: Air damper (Kyowaseimitsu KU-AIR 2); S: Sample injector (Kyowaseimitsu KMM-6V-2); B: Boiling water bath at 100°C; C1: Mixing coil (1 mm id x 24 m); C2: Reaction coil (1 mm id x 10 m); C3: Back pressure coil (0.5 mm id x 6 m); D: Detector (1) Spectrophotometer, $\lambda = 560$ nm (Nihonbunko UVIDEC-340), (2) Flow cell, cell volume 20 μ l, light pass 10 mm (Nihonbunko FIC-361); W: Waste; Flow rate (both R1 and R2): 2.8 ml/min

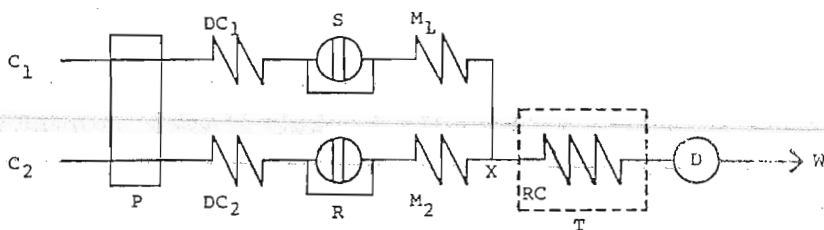


Fig. 2 A flow diagram for the determination of glucose

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), $\lambda = 580$ nm; W: Waste.

Flow rate: $C_1 = 0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $C_2 = 2.0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

リヤーではさみ、かつその試料と試薬の間にキャリアーがはさまれた形となり、マーキングゾーン法の特長の一部を兼ねそなえ、更にシステムの単純化を計れる。またFig.3Bの接続法に於いて、容量の違うsample loopを2つ用いて、傾きと直線範囲の異なった2つの検量線を、作成することが可能である。これは検出感度の異なる物質の逐次定量、または測定濃度が広範囲に分布すると予測される、未知試料の検出に好適である。

マーキングゾーン法に於けるサンプルインジェクターのチューブ接続法またはその一部の変更により、1つの試料を2つの六方バルブにて別のラインに定量的に導入出来る。混合コイル長の変化及び流路の分離などの方法で、同時定量が可能である。従来通常の六方バルブで試料を導入後、三方ジョイントなどにより流路を分割して、同時定量を行う試みがあったが、脈流のあるキャリアーに試料の分割をゆだねることを考慮すれば、再現性の点に於いて本法が優位である。

一方のバルブをインジェクターに、他方のバルブを切換え用に用いた例をFig.4に示す。これは固定化酵素カラム等を用いた系に於いて、検出器のフローセルやチューブを酸、塩基、界面活性剤等の蛋白変性物質で洗浄する場合や、キャリアーとの接触によりカラムの寿命が縮められている場合、ポンプ吐出側の三方バルブまたは吸引側の低圧グラジエント装置の増設で応用可能な方法である。

更に一方のバルブのサンプルループ内に、他方のバルブをFig.5に示すように設置する事により、サンドイッチ法と呼ばれている試料注入法⁹⁻¹¹⁾が行える。これにより新たな可能性を見いだせるが、pH勾配の作製はその一例である¹²⁾。

2. 2 KMM-6V-2を切換えバルブとして使用する場合

試料導入と同様に最も単純な例は片側のバルブの使用である。Fig.6に1つの閉鎖系がバルブの切換えにより、交互に作れる接続法を示す。これは閉鎖系内に種類の異なる固定化酵素カラムや検出器を設置し、逐次定量を行うのに便利である。Fig.7は1つの、Fig.8は2つの閉鎖系を作る接続法である。これらはストップフロー法に適用出来る。ストップフロー法は酵素試薬を用いた分光光度法のみならず、応答時間の長い微生物センサー（エチルアルコール、酢酸、BOD）等に応用出来る。近年HPLCの分野に於いて、血漿蛋白除去等の前処理及び分析を単一のカラムで行うことが可能なPinkertonTMカラムが注目されている。このカラムは毎日流路を可逆的に交換することが、メーカーから推奨されている。これを従来のHPLCシステムで行う場合、カラムを一旦はずし接続し直す必要があったが、Fig.7のようにPinkertonTMカラムを接続すれば、溶離液の流れ方向を

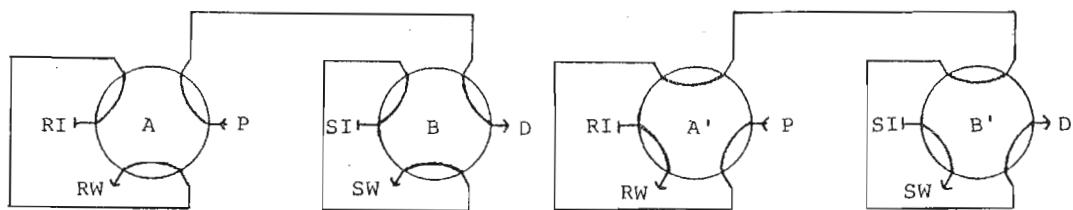


Fig. 3A A scheme of plumbing for separate series injection

RI: Reagent injection; RW: Reagent waste; SI: Sample injection;
 SW: Sample waste; P: Pump; D: Detector; A: One side six-way valve;
 B: The other side six-way valve (the prime means the after of switching)

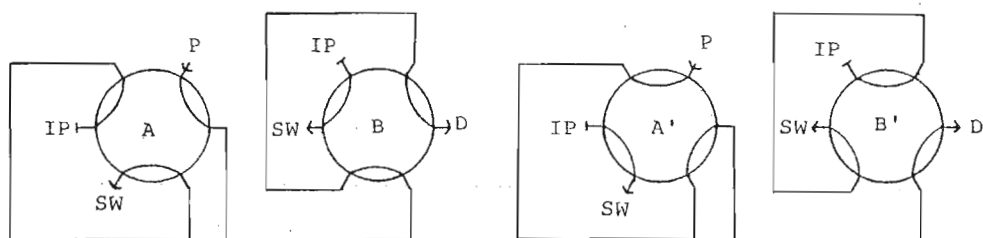


Fig. 3B A scheme of plumbing for construction of two calibration curves

IP: Injection port

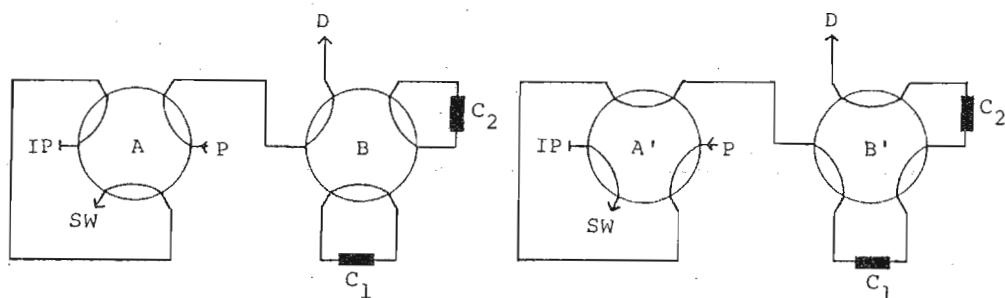


Fig. 4 A scheme of plumbing for combination of sample injector and switching valve

C: Column

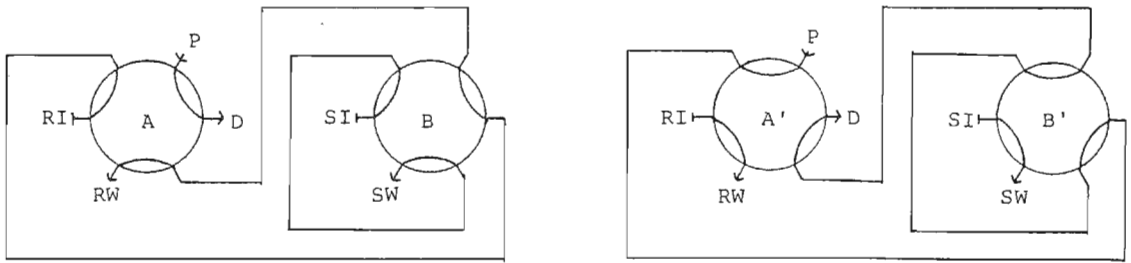


Fig. 5 A scheme of plumbing for sandwich injection

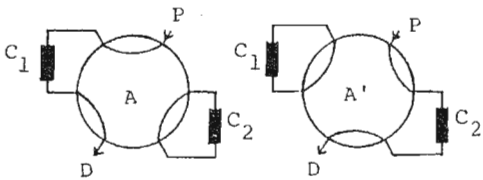


Fig. 6 A scheme of plumbing for a switching valve which has a mutual closing system

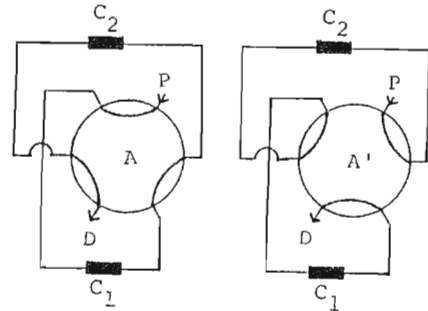


Fig. 9 A scheme of plumbing for a switching valve without a closing system

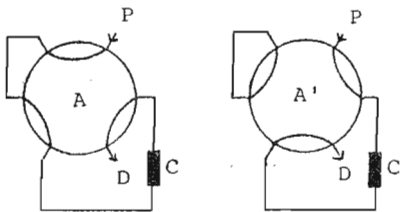


Fig. 7 A scheme of plumbing for a switching valve with or without a closing system

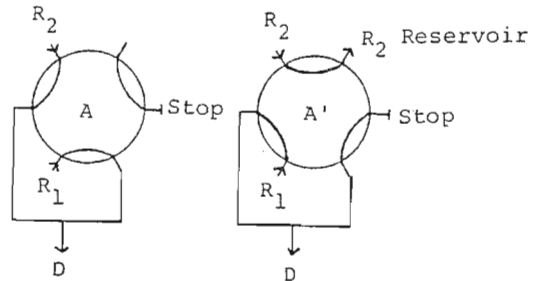


Fig. 10 A scheme of plumbing for modification of carriers

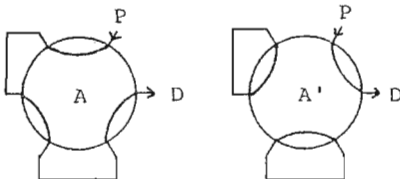


Fig. 8 A scheme of plumbing for a switching valve with or without two closing systems

容易に切換え可能である。同様に六方バルブを用いた方法¹³⁾もあるが、切換えバルブの一部にstopperをしたり、三方ジョイントを用いる必要がある。

閉鎖系の全く出来ない接続法をFig.9に示す。これではC₁及びC₂を図のように設置した場合、バルブの切換えにより試料及びキャリアーが、C₁及びC₂を通過する順序を逆転出来る。例えばC₁及びC₂で異なった反応を起こすように設定し、その反応結果が順序によって異なる場合、この接続法は有用である。HPLCに於いて、同種カラムを2本用いたこの接続法の使用例がある¹⁴⁾。複數目的物質の同時定量を行う条件にて、他の目的物質に比較し著しく保持時間の長い物質を、バルブ切換えにより2本目のカラムを通過させることなく、短時間に分離する方法である。またC₁及びC₂に固定化酵素カラムなどを設置した場合、サンプルインジェクターの接続位置により、試料のカラム通過順序を変えたり選択的に使用することが可能である。例えばバルブの外側で、ポンプ寄りにインジェクターを置けばカラム順序が換えられ、C₁(またはC₂)の直前に置けば1つのカラムとその1つを含む2つのカラムが使い分けでき、C₁(またはC₂)の直後に置けばカラムの使用、未使用を選択出来る。2つの六方バルブを用いることで、より複雑な系を組むことも可能であるが割愛する。

次に切換えバルブによりキャリアーの流れを変化させる方法について記述する。Fig.10はR₁とR₁+R₂の流れを切換える接続法である。R₁の流れに変化はなく、切換えによりR₂の合流の有無を決定するものである。ここに於いてR₁とR₂が異なった試薬ならばキャリアーの組成が変化し、同じ試薬であれば流量のみが変化する。またR₂に水等の溶媒を用いれば、キャリアーの濃度変化が起こり、どちらか一方のキャリアーを事前に加熱または冷却することで温度変化が起こる。注目すべき点はこれらの条件変化が短時間に、再現性良く出来ることであろう。Fig.10に示した接続法の場合、切換えで変化しないキャリアーが1つで、キャリアー数の変化は1から2(または2から1)であったが、この2つの数に注目し、接続法を検討した。基本的な接続法をFig.11-14に示し、それを含む上記定義の数に基づく接続法の分類をTable 1に示す。

この他に二連六方バルブを用い流れを変える事により、フローインジェクション原子吸光光度法のメモリー効果を減じた報告がある¹⁵⁾。その接続法をFig.15に示す。

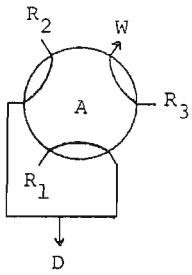


Fig. 11 A scheme of plumbing for modification of carriers

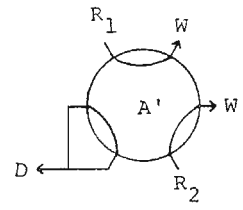
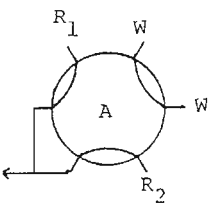
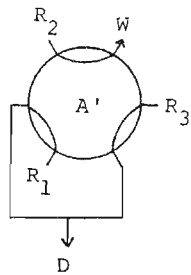


Fig. 12 A scheme of plumbing for modification of carriers

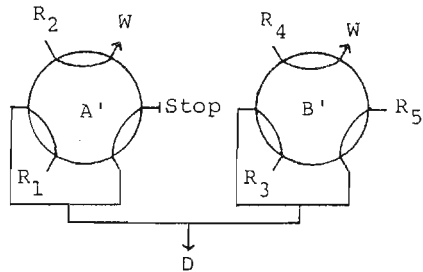
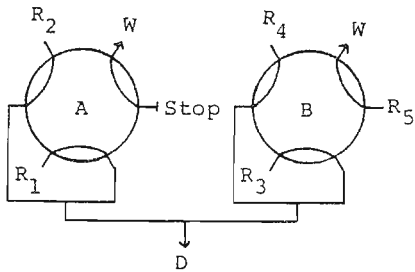


Fig. 13 A scheme of plumbing for modification of carriers

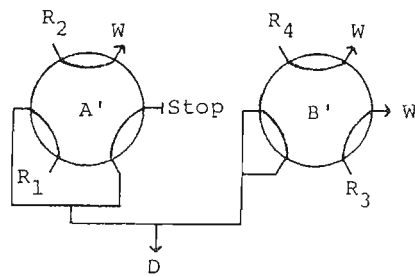
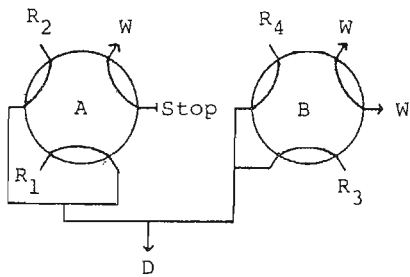


Fig. 14 A scheme of plumbing for modification of carriers

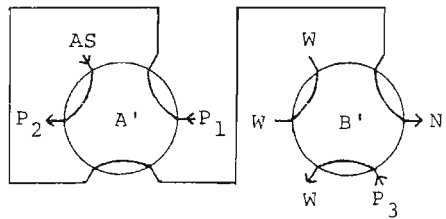
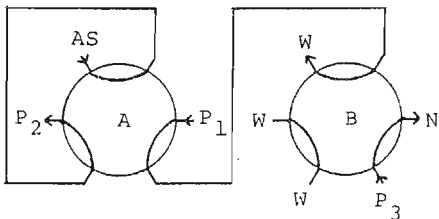


Fig. 15 A scheme of plumbing for switching valve to minimize nebulizer memory for flow injection atomic absorption spectrometry

AS: Auto-sampler; N: Nebulizer

Table 1 The classification of plumbing by two numerical characteristics

The number of carrier streams left unchanged after switching	The change of total number of carrier streams on switching	Fig. No. or Note
0	0 ↔ 2	12
0	0 ↔ 3	A
1	1 ↔ 2	10
1	1 ↔ 3	B
1	1 ↔ 4	14
1	2 ↔ 2	11
1	2 ↔ 3	C
2	2 ↔ 3	D
2	3 ↔ 3	E
2	3 ↔ 4	13

Each system is completed when the Y-joint is connected to the side of (A): R_1 or R_2 for Fig. 12; (B): R_2 for Fig. 10; (C): R_2 for Fig. 11; (D): R_1 for Fig. 10; (E): R_1 for Fig. 11.

3 結 言

以上KMM-6V-2はFIA に於いて極めて応用性の高いサンプルインジェクターかつ、切換えバルブであることがあきらかになったが、切換えバルブとして用いる場合は、通常の六方バルブでもバルブの前に三方ジョイント等を用いることで、かなりの接続法が行え、接続法の工夫によりFIA に更なる可能性が開かれることを確信するものである。

文 献

- 1)内田 和秀, 友田 正子, 齊藤 真一, J. Flow Injection Anal., 2, 143 (1985).
- 2)内田 和秀, 友田 正子, 齊藤 真一, J. Flow Injection Anal., 3, 18 (1986).
- 3)投稿中
- 4)K. Uchida, T. Shibata, M. Tomoda, S. Saito and S. Inayama, Chem. Pharm. Bull., 34, 2649(1986).
- 5)K. Uchida, D. Yoshizawa, M. Tomoda and S. Saito, Anal. Sci., 3, 181 (1987).
- 6)友田 正子, 吉沢 大輔, 内田 和秀, 福島 和昭, 齊藤 真一, J. Flow

Injection Anal., 4, 4(1987).

7)友田 正子, 真保 晃, 内田 和秀, 佐竹 久史, 石川 浩子, 齊藤 真一,
水道協会誌, 56(3), 52(1987).

8)桐栄 純一, 馬場 信行, J. Flow Injection Anal., 2, 151(1985).

9)川崎 誠司, 植田 寛, 只野 寿太郎, 日本臨床検査自動化学会誌, 10, 109
(1985).

10)合田 淳子, 打木 英夫, 黒石 忠文, 保田 和雄, 第44回分析化学討論会
講演要旨集, 101(1983).

11)黒石 忠文, 打木 英夫, 第 4回フローインジェクション分析研究講演会 講
演要旨集, 5(1985).

12)A. Rios, M.D.L. de Castro and M. Valcarcel, Anal. Chem., 58, 663
(1986).

13)鈴木 和寿, 上能伊 公雄, 北澤 式文, 島津科学器械ニュース, 28(1), 10
(1987).

14)N. Kaneda, M. Asano and T. Nagatsu, J. Chromatogr., 360, 211(1986).

15)J.M. Harnly and G.R. Beecher, Anal. Chem., 57, 2015(1985).

謝 辞

本論文提出にあたり英文要旨を御校閲いただいた, 上智大学理工学部化学科の
F.S.Howell博士に感謝します。

(1987年10月20日受理)