

ミニチャンバーを有する気節-自動化学分析システムの開発

[研究代表者] 手嶋紀雄 (工学部応用化学科)
[共同研究者] 村上博哉 (工学部応用化学科)

研究成果の概要

コンピュータ制御の流れ分析法であるシーケンシャルインジェクション分析 (Sequential Injection Analysis, SIA) は、化学分析の自動化に威力を発揮する。本研究は SIA 法の機能をさらに向上させたものである。すなわち分析システムのマルチポジションバルブ上にマイクロピペットチップからなるミニチャンバーを設置し、かつ送液時に気節を用いることにより、化学分析において煩雑な希釈操作、検量線溶液の調製、標準添加法の操作を自動的に行うことに成功した。本気節-SIA システムを評価するために、バイオマーカーとして有用なアルブミン、グルコース、クレアチニンの吸光光度法を用いた。なお、本研究の成果は学術性を考慮して *Molecular* 誌に投稿された。ここではその一部について紹介する。

研究分野: 分析化学, 臨床化学

キーワード: 流れ分析, 化学分析, 吸光光度法, 自動化, ダウンサイジング

1. 研究開始当初の背景

フローインジェクション分析 (FIA) 法は、「化学分析の自動化法」、「低環境負荷型の技術」として 1975 年にデンマーク工科大学の Ruzicka 教授と Hansen 教授によって提唱された¹⁾。FIA 法とは、内径 0.5~1.0 mm 程度の樹脂製細管 (通常はテフロン管) 内のキャリアー溶液の流れに試料溶液を注入し、試薬溶液と合流させて反応コイル内で化学反応を行わせた後、下流に設置した検出器で分析目的成分を検出して定量する分析方法である。それ以来、シーケンシャルインジェクション分析 (Sequential Injection Analysis, SIA)²⁾、同時注入迅速混合フロー分析 (Simultaneous Injection Effective Mixing flow Analysis, SIEMA)³⁾⁴⁾などの新しい流れ分析技術が次々と提案されている。これらの分析法は包括して流れ分析法と呼ばれる。この流れ分析法は、優れたオンライン試料前処理能 (希釈, 酸化分解, 固相抽出, ガス捕集など) 有することから、環境分析, 食品分析, 薬品分析, 臨床分析など各種の分析分野に応用されている⁵⁾。

2. 研究の目的

FIA は、バッチ式マニュアル分析法よりも試料や試薬の消費量を削減することができる。しかしベースラインを恒常的に形成させるために、キャリアー水と試薬を連続的に送液しなければならない。一方 SIA は定量に必要な分だけ (通常数十~数百 μL) の試料, 試薬を用いるため、バッチ式マニュアル分析法のみならず、FIA よりも試薬の削減が達成される。しかし、試薬等消費量が少ないのは溶液を装置にセットした後のことであり、希釈操作を含めた試料・試薬の調製は、オフラインで手操作で行うため、測定に供されずに廃棄する試料や試薬が一定量存在する。また、分析値を得る方法として検量線法ではなく標準添加法を適用する場合、試料・試薬の調製数は大幅に増える。

3. 研究の方法

そこで、化学分析において煩雑な希釈操作、検量線溶液の調製、標準添加法の操作を μL レベルで自動的に行うために、図 1 に示すような自動化学分析システムを構築した。すなわち SIA の基本要素であるマルチポジションバルブ上にマイクロピペットチップ (1 mL) か

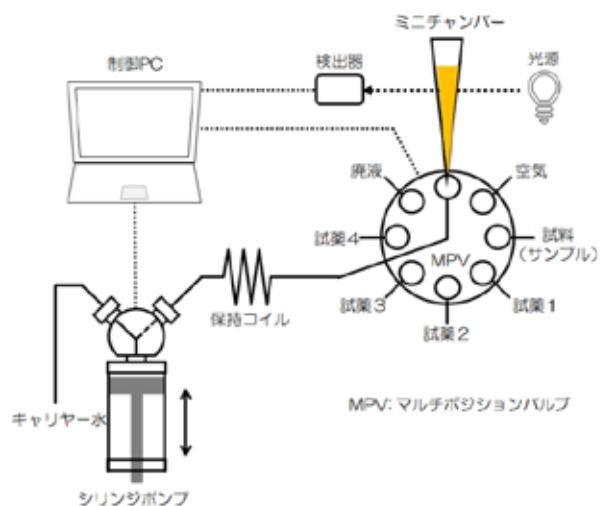


図1 ミニチャンバーを有する自動化学分析システム

らなるミニチャンバーを設置し、これを全量フラスコと見立て、分光分析を行うために光路を設置した。例えば図1に示した保持コイル中に100 μL の空気を吸引し、次いで試料、試薬1の順に吸引したのち、再び空気を吸引する。シリンジポンプの逆方向の動きにより、これらの溶液をミニチャンバーに送り込むが、その際に溶液は空気によって挟まれているので、それ以上分散される（希釈される）ことなく、チャンバーに送り込むことができる。試料を希釈したければ、水を一定体積吸引すればよい。水を段階的に吸引すれば、 μL レベルの範囲内で各種濃度の検量線溶液をチャンバー内で調製することができる。試料を一定量添加し、段階的に標準液を添加する標準添加法においても同様にオンラインで溶液調製計測が可能である。

4. 研究成果

(1) アルブミンの定量

染料のテトラプロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPEH) がミセル共存下でアルブミンと pH 3.2 でイオン会合し、青色会合体 ($\lambda_{\text{max}} = 605 \text{ nm}$) を形成する反応を利用した。本イオン会合反応は迅速に進行するため、ミニチャンバー内の溶液の定常状態における吸光度を検量線に用いるパラメータとした。検討の結果、200 μL 中で 3.5 μg のアルブミンまで直線の検量線 ($r^2 = 0.992$) が得られた。検出限界は、0.4 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ であった。

(2) グルコースの定量

グルコースはグルコースオキシダーゼ存在下酸素と

反応し、過酸化水素を生成する。この過酸化水素は pH 4.5 かつ Fe(II)触媒の共存下で *p*-アニシジンと反応し赤色生成物 ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) を生成する。この酸化発色反応は時間を要するため、ミニチャンバー内で反応の完結を待つことなく、吸光度が時間と共にほぼ直線的に増加する際の吸光度変化率を検量線のパラメータとした。グルコース検量線の直線範囲 ($r^2 = 0.986$) の上限は、200 μL 中 4 μg であり、検出限界は 1.5 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ であった。

(3) クレアチニンの定量

クレアチニンは Jaffe 反応を利用して定量した。すなわちアルカリ性条件下でピクリン酸とクレアチニンが赤色 ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) の生成物を生成する。Jaffe 法は定量に及ぼす妨害物質の影響を除去するために予め試料を希釈しなければならない。この希釈操作を含めた検量線溶液の調製・反応・測定をオンラインで行うことに成功した。グルコースと同様にミニチャンバー内の反応溶液の吸光度変化率を検量線のパラメータとした。検出限界は 1.9 $\mu\text{L}/200 \mu\text{L}$ 、直線性 ($r^2 = 0.996$) は 20 $\mu\text{L}/200 \mu\text{L}$ まで確保された。

文献

- 1) J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145 (1975).
- 2) J. Ruzicka, G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 329 (1990).
- 3) N. Teshima, D. Noguchi, Y. Joichi, N. Lenghor, N. Ohno, T. Sakai, S. Motomizu, *Anal. Sci.*, **26**, 143 (2010).
- 4) K. Ponghong, N. Teshima, K. Grudpan, J. Vichapong, S. Motomizu, T. Sakai, *Talanta*, **133**, 71 (2015).
- 5) 手嶋紀雄, 村上博哉, 酒井忠雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **69**, 257 (2020).