

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

 SEP./OCT. 1990
VOL.33 NO.5

U.D.C. 543.084 - 52

● 目 次 ●

特集 分析の自動化

巻 頭 言

分析の自動化……………砂原 広志- 1

報 文

 リン化合物のフローインジェクション分析法；「改訂論文」の効用
与座 範政 徳重 紀子 中里 哲也- 3

 先天性副腎皮質過形成症の新生児
マスキング……………富士 勝- 7

ラボラトリーロボットを用いた医薬品の分析……………松田りえ子-12

解 説

 湿式化学分析の自動化……………
……………黒石 忠文 前小屋千秋-15

 日立高速液体クロマトグラフ用前処理機能付きオートサンブラとこれを用いたブリカラム誘導体化法への応用……………
……………平田 源蔵 嶋本真由美 横倉 武文 伊藤 三男 加地 弘典-19

ザイメイト ラボラトリーオートメーション システム—自動化の考え方—……………橋本 英世-24

臨床用自動分析装置……………小澤 恭一-28

トピックス

第51回分析化学討論会開催さる……………6

第7回液体クロマトグラフィー春季討論会開催さる……………23

原子雲の挙動の動的観察……………18

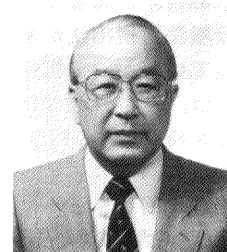
特集 分析の自動化

巻 頭 言

分析の自動化

Automatization in Analytical Chemistry

砂原 広志*



1. はじめに

分析化学の基本的な役割は物質の認知であるが、その認知は何か何パーセントという従来の目的からどのような状態で、どこに存在しているのかという広い範囲に及び、物質を扱う多くの分野の必須な情報である。その物質の認知の方法が、イオンや分子の持つ特異的、選択的、鋭敏な化学反応を利用することから、物質の持つ固有エネルギーを利用する方法にまで発展したおかげである。特に後者の方法は、1940年後半頃からInstrumental Analysisとして発展したもので、1950年代に入り多数の試料、極微量の試料分析の省力化、迅速化を目途として化学成分は最終的に電気的情報に変換され、可視的に記録された。どうやらこの頃から分析の自動化が本格的にはじまり、一世代というべきであろう。

主として米国を中心とするInstrumental Analysisは、1950年後半頃に様々な化学プロセスの適正化のため、プロセス計器の発展の基礎になり利用されているのに、実験室タイプの自動分析機器の発展と利用はむしろ遅れていた。それは従来の分析化学的操作である計量、分割、希釈、試薬注入、液移送、濾過、抽出等のいわゆる前処理操作を含む多くの化学的操作の自動化が、他の分野の人々をも含めて組織的に総合的に試行されなかったか、または従来の分析化学者および技術者の習慣的意識と合致しなかったことも考えられる。そこで、著者は実験室型の分析自動化について種々な考えを持ちながら、動向を静観してきた。ところが種々な分野におけるライン化の進歩、種々な工程のシステム工学による適正化の遂行等の発展を考えると、実験室規模の分析自動化システムの実現は次第に必要となっていると考えられる。

2. 化学操作の自動化

分析化学に用いられる種々な方法は、試料採取からデータ処理までを含むシステム化として考えるべきであろう。すなわち、試料採取、試料計量、溶解、試薬注入、

* 広島大学 工学部 環境基礎学講座、教授、理博

沈殿、汙過、濃縮、分割、希釈、抽出等の複雑なさらに経験の必要な多くの前処理法を経て、定量機器に適用する。そこで化学量は電気量に変換され同時にデータ処理し、要望される化学量の情報に正規化され評価される。

ここで言う化学操作は定量機器のための試料調整であり、多量の試料を取り扱うためにはこれらの前処理のための化学的操作の自動化が必要である。特に医薬生化学の分野においては、かなりの前処理用の化学操作の自動化が実現している。これらの分野においては、微量かつ多試料でしかも不安定な試料であり、連続的な前処理の必要性があるためであろう。特にスウェーデン国のアガー社の血液分析が最初であろう。しかしながら、試料形態が固体や粉末で、その主成分や、主成分中の微量成分の分析法となると、その多数の試料の化学的前処理操作の自動化のシステムが進んでいない。特に固体試料の粉末化、計量化、熔融、溶解、さらに液体試料の調整等であろう。個々の化学的操作は自動化されているものの、それらのシステム化を考える状況にあると考えている。このためには、前処理操作に必要な物理的、物理化学的、化学的な反応および生化学的反応の自動化は、その操作の最適化や反応終点の確認のための自動計測化が遅れているようにも考えられる。それほどまでに分析用前処理操作は、可視的な経験的なものであったかもしれない。

3. 分離と計測化

混合系の物質から個々の成分を認知するためには、その分離法と検出法が基本である。物質の分離は古い歴史を持っているが、分析化学に利用されている分離の基本的な方法は、(1)特異的な化学反応を利用する方法、(2)特異的な機能を持つ“場の科学 (Topo Science)”を利用する方法、(3)物質の固有のエネルギーをスペクトルにして認知する方法等に発展し、さらに高度なデータ処理法と合体し、利用者と機器との間にCommunicating Instrumentの地位までになってきた。気体および液体試料の分析自動化システムは、優れた分離剤の発展により、ガスクロマトグラフィや液体クロマトグラフィにみられるように、物質の認知を可能にしてきた。この方法は、分析試料の前処理操作をある一面では簡易化しているが、一面では特有な操作が必要である。しかしながら、これらの前処理操作の自動化は遅れているし、さらに自動計測のための検出器が限定されている。

物質を構成する種々な成分間で、多量成分中の極微量の成分あるいは種々な主成分を分析する方法は未だに問題を持っている。それは分離と自動計測化の両方の限界のためである。しかしながら、固体試料における外部からのエネルギー励起法による発光エネルギーのスペクトル法は、分離操作のないままで遂行できる利点を持っている。さらに、液体および気体試料にみられる蛍光法や化学発光法は、非分離のまま対象物質の計測化が可能であるものの、そのための条件設定に限界があろう。どうやら気体および液体試料の分析自動化システムはIntegrate Instrumentとしての実

現性が可能であるが、固体および粉末試料については非分離のままでの分析自動化システムを發展させなくてはならないように考えられるし、固体試料の局所分析、深さ方向の分析となると種々な問題点があるように思える。

4. 自動化システム

試料採取からデータ処理までをどの程度まで自動化できるか、その自動化システムはどんな特色を持ち、どんなところに多く利用されるのかは、現在考える価値があると思っている。今から20年前頃の米国で問題となり、現在の日本でもささやかれる「きたない」、「きけん」、「きつい」の3Kの仕事は分析化学における前処理操作にも適合する面がある。分析操作に必要な酸、アルカリ、種々な試薬溶液の調整、溶解、分解等は化学操作の基本でありながらこれまでも自動化を考案せねばならないのであろうか（技術面では可能であるが）。現に米国で発表されている。

分析対象の試料範囲は極めて広い。ある限定される試料についての自動試料採取法は利用されているものの、殆んどの場合は対象物質を扱う人々の総合的な判断による適正試料採取となる。そこで、試料採取後の前処理と分離定量、さらにデータ処理法までの自動化システムとならざるをえない。

上記のような限定された場合の自動化システムの可能性は次のような条件が必要であろう。

- (1) 同種類の試料であり（例えば血液、生体液、金属、珪酸塩等）多数の試料の分析が要求されること。
- (2) 試料中の分析対象の成分の種類が限定され、かつ成分量の差が極端でないこと。
- (3) 分析にかかわる費用が、現状の人件費、消耗費および機器償却費の合計に比べて低いこと。

さらに、自動化システムが現状動向と技術管理からみて、次のような条件を満足できることである。

- (1) 気体、液体および固体試料の分析に対応できる自動化システムであること。
- (2) 分析の前処理操作の自動化は、各々の前処理工程をユニット化し、適正な前処理工程の確認が必要であること。
- (3) 高度な分離と成分検出法を用いる場合は、これに適合できる試料の前処理操作を合わせた自動化システムであること。
- (4) 各々の試料の番号付け区分から、自動計量、自動移送、さらに個別前処理工程を経て検出し、そのデータ処理までをライン化すること。

5. おわりに

実験室規模の分析自動化は、ある限定された対象物についてシステム化は可能であると考えられる。それは、前述したように基本的な化学操作および特殊な操作の自動化であり、複雑な工程を持っているが電子工業にみられるミクロン技術の発展があり、さらにシステム工学の進歩とともに次第に分析自動化システムの実現が可能であろう。

報 文

リン化合物のフローインジェクション分析法：「改訂論文」の効用

Flow Injection Analysis of Phosphorus Compounds ; Role of a " Revised Paper "

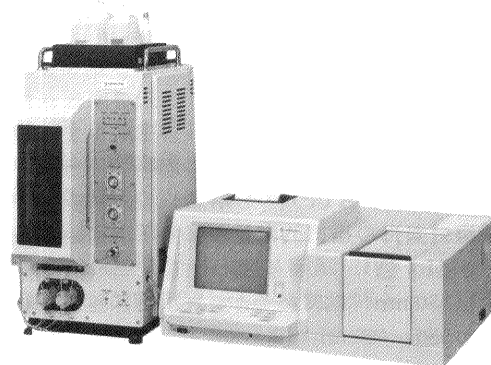
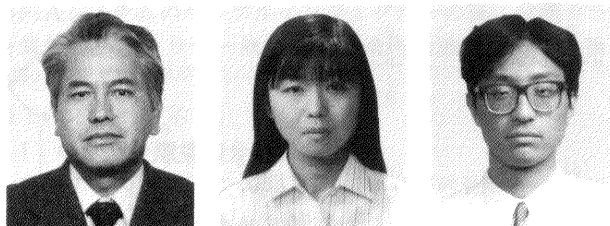
与座 範政* 徳重 紀子* 中里 哲也*

(平成2年6月20日受理)

1. はじめに

フローインジェクション分析法(Flow Injection Analysis, FIA)に関する多くの著書^{1)~8)}や網羅的な総説^{9)~12)}で概観できるように、FIAに関する開発研究はハード(装置の写真および文献¹³⁾を参照)およびソフトの両面で著しく進展し、約15年の間に多くの基礎データが蓄積されている。公定分析法として採用される動きもあり(フローインジェクション分析方法通則 JIS K0126-1989)、ルーチン分析法として本格的な実用段階に入った感がある。公表された基礎データがあまりにも多種多彩であるために、特に他人のデータを参考にしてルーチン分析用のマニュアルを作成する場合には、データの取捨選択と再評価が必要であり、かなりの労力を要する。オリジナル論文を作成する段階では、実用性について吟味が不十分な寄せ集めのデータを盛りつけたり、または著者が研究成果の利点を過大評価(実際は欠点の過小評価)して公表する習性があるので、他人のオリジナル論文の内容を公正に評価するのは困難な場合が多い。できれば原著者自身が冷却期間(試用期間)を置いて各自のオリジナル論文を再審査し、不要な枝葉部分を切り捨てた実用性のある「改訂論文」を出していただければ、利用者にとって簡便になるであろう。しかし、なかなか改訂論文にはお目にかかれない。分析法の開発を専業とする者にとっては、改訂は益のない退屈な作業であることも一因であるが、改訂論文の掲載を歓迎する学会誌が少ないことが大きな理由であろう。日立の本誌がその役割をになっていただくことを期待し、この報文がその一例になればと思う。

筆者らの研究室はリン化合物の専門店であり、環境水や生体関連試料中のリン化合物を取り扱う場合も多い^{14),15)}。不安定化合物や酵素による分解過程を追跡するので、FIAやHPLCのような迅速分析法を昼夜連続運転でルーチン分析に利用している。自給自足で分析法を開発し、分析法の開発者とユーザーが相互依存で共生しているので、両者の立場から分析法の評価に関する議論が多くなる。分析法の開発段階では感度や精度が重点的に検討されるが、ルーチン分析法として多数の人が実用する段階では、むしろ簡便性と信頼性(reliability)が重要な評価基準になる。我々が用いる信頼性とは(一般に容認されたものではない)、カメラの評価用語を借りれば、バカチョン式FIAと呼べるもので、未熟練者が利用しても測定精度や感度に関してリスクが小さ



U-2000形日立ダブルビーム分光光度計と組合わせた
K-1000形日立フローインジェクション装置

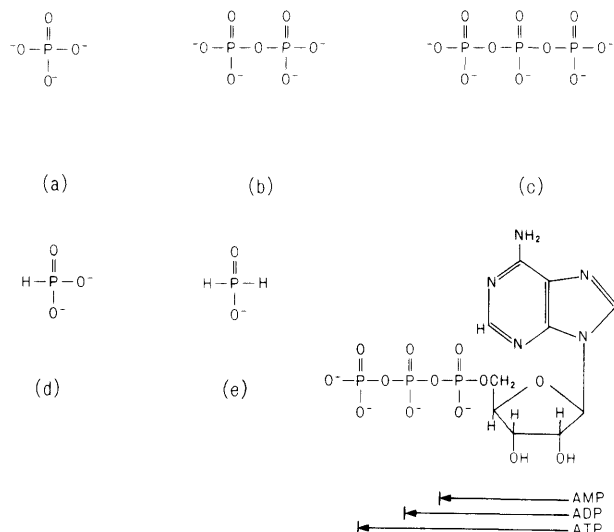
いことに重点を置く。熟練者(分析法の開発者)が厳密な条件設定のもとに注意深く操作すれば、非常に高い精度や感度が得られる分析法でも、わずかな実験条件(試薬組成や流速)の変動により精度や感度が大きく変動したり、誤認されやすい疑似ピークが発生するようでは、信頼性に欠け、ルーチン分析法としては不都合である。例えば、試薬が細管や検出器に徐々に吸着され、開始時のコンディショニング(ベースラインの安定化など)に長時間を要する系では、かなりトラブルが多くなる。本法は分析化学講習会(日本分析化学会九州支部)や筆者らの研究室で初心者(新入4年生)に課題して、比較的信頼性が高い実例を具体的に紹介する。

2. 分析の対象

リン化合物は生体に不可欠であり、医薬、食品、肥料、飼料等の製品にも豊富に含まれており、また環境化学的(富栄養化)にも関心の高い化合物であるから、広い分野で種々のリン化合物の迅速分析法の開発が重要課題である。最もポピュラーな化合物は、オルトリン酸塩(a)とその重合体であるピロリン酸塩[(b)ニリン酸塩]やトリポリリン酸塩[(c)三リン酸塩]である。使用頻度は少ないが低酸

* 九州大学 理学部 化学教室

化数の亜リン酸塩〔(d) ホスホン酸塩〕や次亜リン酸塩〔(e) ホスフィン酸塩〕がある。また生体内反応で非常に重要な役割をするATP (AMP, ADP) をあげておく。



3. オルトリン酸塩の選択的定量

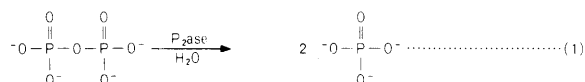
市販の試薬〔化合物(b)~(e)〕中に含まれる不純物 (a) や低酸化数化合物 [(d), (e)] の酸化生成物 (a) の定量, ポリマー [(b), (c), ATP] の分解過程の追跡のためにオルトリン酸塩 (a) の選択的定量が必要である。オルトリン酸塩のみがMo (VI) 試薬と反応して黄色錯体を生成する。吸収極大は330 nm付近であるが, 実用的には試薬自体の吸光が小さい380~420 nmがよい(長波長になるに従って感度は低下する)。 10^{-5}M ~ 10^{-3}M のサンプルの分析に適切である。

3.1 Mo (VI) 試薬

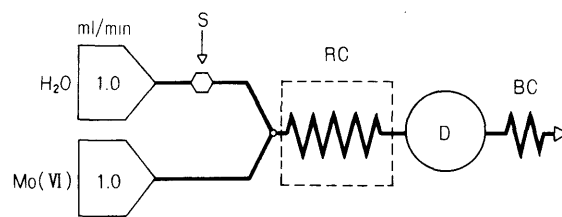
市販のモリブデン酸アンモニウム, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.3 gを約900 mlの水に溶解し, 濃硫酸16.5 mlを加えた後に, 水で1Lにし, 0.03M Mo (VI) ~ 0.3M H_2SO_4 試薬溶液を調製する。 0.3M 硫酸に直接モリブデン酸塩を溶解することも可能であるが, 溶解速度が非常に遅い。

3.2 酵素分解への適用例

ピロリン酸塩 (P_2) は無機ピロホスファターゼ (EC3.6.1.1, P_2ase) によって次のように加水分解されて, オルトリン酸塩 (P_1) を生成する¹⁴⁾。



P_2 と P_2ase の混合液 (pH7.2) の一部 ($100\mu\text{L}$) を1分ごとにFIAシステムへ注入すると, 時間とともに P_1 の生成量(ピーク高)が増大し, 分解反応が終了すると一定値になる(図1)。この酵素はマグネシウムイオンで活性化され〔同図(a)], カルシウムイオンで阻害される〔同図(b)~(d)]。



(a) $[\text{Mg}^{2+}] = 4 \times 10^{-4}\text{M}$

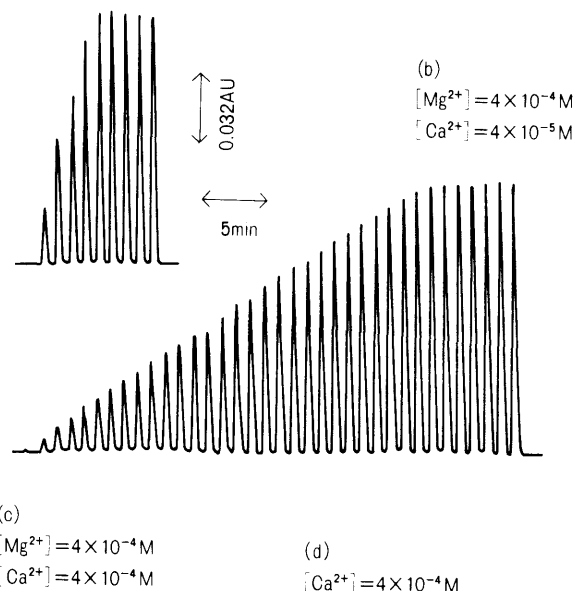


図1 FIAによる無機ピロリン酸加水分解酵素の活性測定 (pH7.2)

$[\text{P}_2] = 2 \times 10^{-4}\text{M}$, $[\text{P}_2\text{ase}] = 3 \times 10^{-9}\text{M}$.

S: サンプル (インジェクタ), RC: 反応コイル (内径0.5 mm, 長さ5 mのPTFE, 30°C), D: 吸光検出器 (380 nm), BC: 背圧コイル (常温では是非とも必要なものではないが, 内径0.25 mm, 長さ1 m程度のコイルを連結したほうが安定しやすい。)

4. ポリリン酸塩の定量¹⁵⁾

2節で述べたオルトリン酸塩以外の化合物を検出するには, それぞれの化合物を加水分解または酸化分解して, オルトリン酸塩を生成させ, 発色試薬と反応させる。Mo (V) ~Mo (VI) 試薬と高温・高圧FIAシステム (図2) を用いると, P_2 や P_3 のポリリン酸塩の加水分解と呈色反応が同時に進行するので, オルトリン酸塩と同様に定量的に検出できる (図3)。青色錯体は820 nmに極大 (図2参照: $\epsilon = 3 \times 10^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) をもつスペクトルを示すが, 低波長側 (600~700 nm) でもかなり高感度であり, 10^{-6} ~ 10^{-4}M P の分析に適切である。試薬の酸濃度を高くしてポリリン酸塩の加水分解を促進すると同時に共存成分による妨害を抑制した。また可視部における試薬自体の吸光が極めて低く, 管壁 (フローセル) への吸着性もないので, ベースラインが安定しやすい。この方法でATPの β および γ 位のリンも定量的に発色する。 α 位のリン (AMPに相当) は加水分解しにくいので, 発色が不完全である。なお, 低酸化数の亜リン酸塩や次亜リン酸塩はこの方法で発色しないので, 分別定量, 例

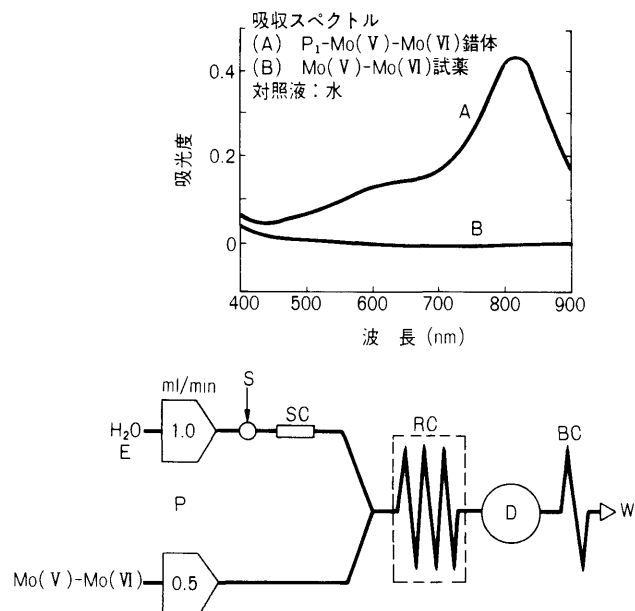


図2 FIA-HPLC交換性機能のあるリン化合物分析用システム

P: ポンプ, S: サンプル (インジェクタ), RC: 反応コイル, 内径 0.5 mm, 長さ 20 m PTFE, 140 °C, BC: 背圧コイル, 内径 0.25 mm, 長さ 2 m PTFE, W: 排出, D: 吸光検出器, 820, 600 nm: HPLCモード用に付加するものとして, SC: 分離カラム, 内径 4 mm, 長さ 25 mm, TSK-gel SAX (10 μ m), E: 溶離液, 0.25M KCl + 0.1 % EDTA (4 Na)

例えば亜リン酸塩に含まれる微量のオルトリン酸塩の定量が可能である。図2のような高温FIAシステムでは、流路系内での沸騰（気泡の発生）を抑えるために、背圧コイルが不可欠であるので、特に留意していただきたい。

〈Mo(V) — Mo(VI) 試薬〉

3節のMo(VI) 試薬の調製と同様に、モリブデン酸アンモニウム5.3 gを900 mlの水に溶解する。濃硫酸100 mlを加えて、約1.8M H₂SO₄とする。砂状亜鉛0.65 gを加え、かく

はんしながら完全に溶解させる。この過程でMo(VI)の一部がMo(V)へ還元されて、約1 LのMo(V) — Mo(VI)試薬ができる。少なくとも6ヶ月（室温）は安定である。

5. FIAとHPLCの互換¹⁵⁾

FIAは単一成分の定量、酸化数(2節を参照)が同じである複数成分の含量、酸化数が異なる2成分の分別定量には威力を発揮するが、同酸化数の複数成分の分別定量には役に立たない。例えば、図3のP₁、P₂およびP₃の含量を求めることは簡単であるが、3成分混合試料中の各成分を分別定量するのは困難であるから、HPLCモードを採用したほうがよい。HPLCモードに切り替えるのは非常に簡単で、図2のFIAシステムのサンプルインジェクターの後に分離カラムを装着し、キャリア液（水）を適当な溶離液に置き換えるだけでよい。

以下に応用例を示す。

5.1 ポリリン酸塩の分離定量

市販のトリポリリン酸塩 (P₃) には不純物としてピロリン酸塩 (P₂) やオルトリン酸塩 (P₁) が含まれている。またP₃を水に溶解し放置しておくと、しだいに加水分解してP₂やP₁を生成する。図4(a)は、加水分解生成物を分離定量するために設計したHPLCシステムを用いて、3成分の等モル混合物を分離したものである。やや分離は不完全であるが、溶離液濃度を低くすれば (0.23M KCl), 完全に分離できる。図3で検証したように、3成分とも定量的に発色するので、ピーク面積を測定すれば同一の検量線が利用できる (FIAの場合には、ピーク高でもピーク面積でも、3成分に共通の検量線が利用できる)。この分析法は環境水中のリン化合物を分析するのに簡便である。図4は600 nmで測定したものであるが、長波長になるにつれて感度は増大する (820 nmが極大)。10⁻⁶M ~ 10⁻³M (100 μ L) のリン化合物の分析に適用できる。

5.2 ATP関連化合物の分離定量

ATP, ADP, AMP等はUV吸収 (260 nm, アデノシン) を測定して定量するのが一般的であるが、共存物質の妨害を受けやすい。Mo(V) — Mo(VI) 試薬を利用すると可視

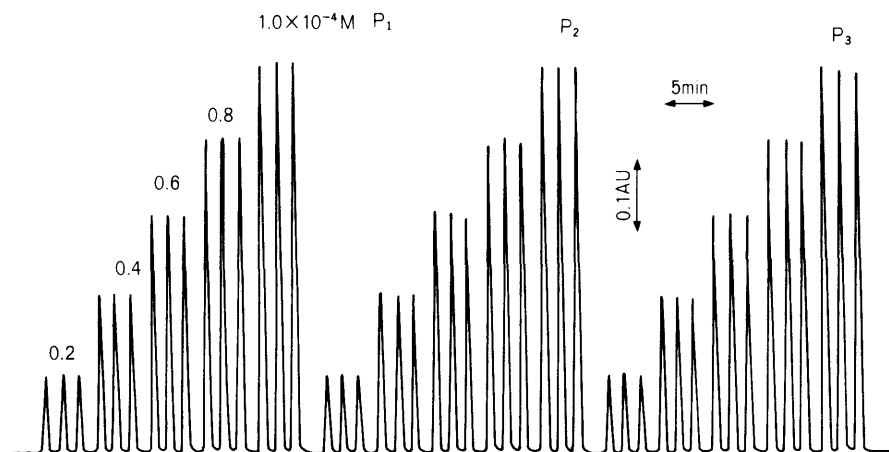


図3 FIAによるオルトリン酸塩 (P₁)、ピロリン酸塩 (P₂) およびポリリン酸塩 (P₃) の定量

FIAシステム: 図2 (測定波長820 nm), サンプル濃度: それぞれPの濃度

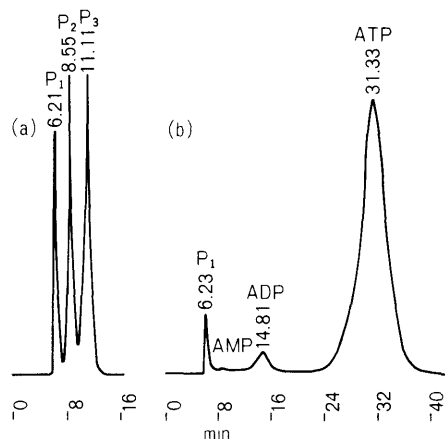


図4 FIAシステムを検出系とするHPLCによる無機リン化合物(a)およびATP関連化合物(b)の分離定量

HPLCシステム：図2（測定波長600 nm, (a)0.08 AUFS, (b)0.04 AUFS, サンプル濃度：(a) P_1 , P_2 , P_3 の混合試料（それぞれ 1×10^{-4} M), (b) 2×10^{-4} M ATP

部でATP等のリンの定量が可能であり、試薬の純度検定や分解過程の追跡に威力を発揮する。図4(b)は市販のATPを水に溶解した直後の試料を分析したもので、ADP、AMPおよび P_1 が含まれている。溶液を放置すると、分解生成物がしだいに増加する。前節で述べたように、 α 位のリンの加水分解一発色が不完全であるために、4成分に共通の検量線を利用できないのは残念である。各成分について検量線を作成して定量することは可能であるが、もっと強力な分解法の開発が望ましい。Mo(V)–Mo(VI)試薬の酸濃度を上げれば加水分解速度は速くなるが、発色速度が遅くなる。また酸化分解剤（ペルオキソ二硫酸塩など）を添加すると、発色しなくなる。多分Mo(V)がMo(VI)へ酸化されるためであろう。この問題について適当な解決策があればご教示をいただきたい。

6. おわりに

我々の研究室で開発した分析法から、比較的信頼性の高いと思われる2例を紹介したが、それぞれ万能ではないから、分析対象によって使い分けをしていただきたい。Mo(VI)試薬を用いる380 nmでの測定は、試薬の調製と操作が最も簡便であり、妨害成分の少ない基礎研究には有利であるが、

環境水の分析には感度と妨害の点から不向きである。Mo(V)–Mo(VI)試薬を用いる可視部での測定は高感度で妨害が少ないので、環境試料を含めて適用できる範囲は広がる。ただ高温-高压システムを用いるので、常温実験に比べると運転上注意すべき点が多いので（背圧コイル、耐圧性のポンプ、チューブ、ジョイントの使用等）、初心者には近くの経験のある方（例えば日立の黒石忠文氏、文献13）にご相談するか、直接筆者らへ（電話092-641-1101, 内線4232, 4233）へご連絡いただきたい。

参考文献

- 1) J. Ruzicka and E. H. Hansen: "Flow Injection Analysis" John Wiley & Sons, New York (初版1981, 2版1988).
- 2) M. Valcarcel and M. D. Luque de Castro: "Flow-Injection Analysis: Principles and Applications", Ellis Horwood, Chichester (1987).
- 3) Bo Karlberg and G. E. Pacey: "Flow Injection Analysis: A Practical Guide", Elsevier, Amsterdam (1989).
- 4) J. Burguera (Editor), "Flow Injection Atomic Spectroscopy", Marcel Dekker (1989).
- 5) 石橋信彦, 与座範政 訳: フローインジェクション分析法, 化学同人 (1983); 原著は文献1) (初版).
- 6) 上野景平, 喜納兼勇: フローインジェクション分析法入門—実験と応用, 講談社 (1983).
- 7) 日本分析化学会九州支部編, 機器分析入門, 13章, 改訂2版, 南江堂 (1989).
- 8) 高島良正, 与座範政編: 図説フローインジェクション分析法, 広川書店 (1989).
- 9) 与座範政: ぶんせき, 1980, 555: 1984, 513.
- 10) 伊永隆史: ぶんせき, 1987, 245.
- 11) 小熊幸一: ぶんせき, 1988, 31.
- 12) 山根 兵, 木羽信敏: ぶんせき, 1990, 357.
- 13) 保田和雄, 黒石忠文: J. Flow Injection Anal., 6, 5 (1989).
- 14) N. Yoza, H. Hirano, Y. Baba and S. Ohashi: J. Chromatogr., 325, 385 (1985).
- 15) N. Yoza, Y. Sagara, H. Morioka, T. Handa, H. Hirano, Y. Baba and S. Ohashi: J. Flow Injection Anal., 3, 37 (1986).

Topics

第51回分析化学討論会 開催さる

第51回分析化学討論会が、5月26日から5月28日の3日間、佐賀大学教養部で開催された。参加者数約700人、発

表件数294件と前回は44件上回る盛況ぶりをみせた。また今回からポスターセッションが設けられ、ここでも活発な討論が行われていた。

会場は昨年発掘され一大センセーションを巻き起こした古代遺跡古野ヶ里や有田焼の窯元にも近く、討論終了後、これらの九州古代文化や伝統工芸品に触れる機会にも恵まれ、学会参加者の多くから好評を博していた。

研究発表は、七つの会場にわかれて

行われ、八つの討論主題特別講演を基調に活発な議論が展開された。

新素材、バイオテクノロジーなど最先端での超微量、超微小部の分析評価がいつそう進展する一方、全地球的な環境保全が叫ばれているなか、環境関連の測定対象物の多様化が特徴的であった。また日立からは、IPC、原子吸光、蛍光、FIA、NMRに関して最新の分析技術13件を発表し、注目を集めた。

(白崎俊浩 記)

先天性副腎皮質過形成症の新生児マススクリーニング

Neonatal Mass-Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia

福士 勝*

(平成2年6月20日受理)

1. はじめに

先天性副腎皮質過形成症 (CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia) は、副腎皮質にあるステロイドホルモンの合成に関与する酵素の先天性な欠損により、ステロイドホルモンの産生、分泌に異常が起こることによって引き起こされる疾患である。CAHは欠損している酵素の種類により、表1に示した5つの病型に分類される。この中で最も頻度が高いのが21-水酸化酵素欠損症であり、CAH全体の90%以上を占める¹⁾ことから、これがマススクリーニングの対象となる。

本症の塩喪失型では、出生後のグルココルチコイドとミネラルコルチコイドの不足に伴う急性副腎不全と塩喪失症状があり、早期に診断し適切な治療を行わなければ重篤な状態となり死亡する危険性がある。単純男性化型でもACTH (向副腎皮質ホルモン) の過剰分泌による色素沈着、過剰な副腎性アンドロジェン分泌による外性器異常による性の誤認や思春期早発症の問題がある。さらに、本症の発生頻度は10,000~20,000人に1人と高く、既に行われているフェニルケトン尿症やクレチン症と同様に、新生児マススクリーニングによる早期発見、早期治療が有用な疾患である。

21-水酸化酵素欠損症では前駆物質である17-OHP (17 α -Hydroxyprogesterone) が著増することから、新生児マススクリーニングでは乾燥汙紙血液を用いて17-OHPを定量することになる。乾燥汙紙血液17-OHPの測定はRIA法 (Radioimmunoassay) による方法が一般的であった^{2)~4)}。しかし、大量検体を迅速、正確、簡便に行わなければならないマススクリーニングでは、廃棄物の処理、試薬の長期安定化、検査の自動化等の点でラジオアイソトープを用いない酵素免疫学的な方法によるELISA法 (Enzyme Linked Immunosolvent Assay) が有用であることから、マイクロ

ウェルプレートを用いるELISA法による乾燥汙紙血液17-OHP測定法を開発し⁵⁾⁶⁾、1982年からCAHの新生児マススクリーニングを札幌市において行政レベルで実施している。さらに、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による2次スクリーニング法及び精査時の検査法⁶⁾についても検討したので報告する。



2. スクリーニングシステム

札幌市におけるCAHのスクリーニングシステムは、1978年から実施している先天性代謝異常症及び先天性甲状腺機能低下症と同じである。産婦人科等の医療機関で生後4~7日目に汙紙に採血し、検査機関の衛生研究所に郵送する。衛生研究所では、生後8~12日以内に17-OHPを測定する。17-OHPが異常高値の場合は直ちに保護者に対して産婦人科と保健所を通じて精密検査及び治療機関 (北海道大学医学部小児科) を受診させることにより、2週間以内に精密検査が可能である。一方、17-OHPが軽度高値の場合は産婦人科医療機関へ再採血を依頼して再検査を行い、17-OHPの高値が持続していれば精密検査の対象となることから、受診までに3週間以上を要することになる。しかし、CAHでは従来の対象疾患と異なり、重篤な症状が出現する以前にスクリーニング結果が得られなければならないことから、ハイリスクスクリーニングとして出生時に臨床所見や家族歴等からCAHが疑われる場合には、生後1~3日でも採血を行い直ちに17-OHPの測定結果の報告ができるようにしている。

3. 測定方法

3.1. ELISA法による17-OHPの測定

第2抗体 (抗家兎IgG山羊血清IgG分画) を固相化した、マイクロウェルプレートを用いる競合法を測定原理としている。ウェル内で直径3 mmディスク1枚 (全血換算で1.5 μ l) と抗17-OHP抗体、17-OHP-ペルオキシダーゼ結合体を反応させ洗浄した後、発色剤 (O-phenylenediamine: 過酸化水素水) を加えて酵素反応を行い、492 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する (直接法)。詳細については既報⁵⁾を参照されたい。現在はキット化され国内の数社から市販されているので容易に試薬が入手できる。

本法では特異性を良くするため、乾燥汙紙血液中の水溶性のステロイドを除去するためジエチルエーテルによる抽出を行ってから測定されることもある (抽出法)。

3.2. 高速液体クロマトグラフィ (HPLC)

多種類のステロイドホルモンを同時に測定するには簡便

表1 先天性副腎過形成症の病型

(1) 21-水酸化酵素欠損症
(a) 塩喪失型
(b) 単純男性化型
(2) リポイド過形成 (20, 22-デスマラーゼ欠損)
(3) 11 β -水酸化酵素欠損症
(4) 17 α -水酸化酵素欠損症
(5) 3 β -ステロイド脱水素酵素欠損症

* 札幌市衛生研究所

性、迅速性、特異性の点でHPLCが優れている。そこでCAHの関連ステロイドホルモンの一斉分析法⁷⁾を開発し、マススクリーニングの開始時から精密検査時の検査項目の一つとして実施している。また、本法は汙紙血液でも17-OHPが40 ng/ml以上であれば直径10 mmのディスク1枚で検出可能であることから、スクリーニングで17-OHP高値を示す検体の確認検査にも利用できる。

3.3. HPLC-ELISA

HPLCは感度は低いが特異性に優れている。一方、ELISAは感度は高いが特異性に問題があることから、両者の組み合わせによる測定法⁸⁾を考案し、疑陽性例の17-OHPとコルチゾールの正確な定量法としている。

4. マススクリーニングのカットオフ値の検討

4.1. 抽出法ELISAの17-OHPのカットオフ値と再採血率

低出生体重児716人を含む新生児15,905人を対象として、抽出法ELISAの17-OHPのカットオフ値を5 ng/mlから10 ng/mlまで変えてみると、その再採血率は0.92 %から0.18 %まで低下した。また、低出生体重児は再採血対象児の $\frac{1}{3}$ 以上を占めていた(表2)。

抽出法のカットオフ値は再採血率が0.4 %以下となる7 ~ 8 ng/mlが適当と考えられた。

4.2. 直接法ELISAの17-OHPのカットオフ値と再採血率

低出生体重児701人を含む新生児13,987人を対象として、直接法ELISAの17-OHPのカットオフ値を20 ng/mlから40 ng/mlまで変えてみると、その再採血率は3.15 %から0.12 %まで低下し、低出生体重児は再採血対象児の $\frac{1}{3}$ 以上を占めており、抽出法とほぼ同様の結果を示した(表3)。直接法単独測定のカットオフ値は、再採血率が0.4 %以下となる35 ng/ml以上が適当と考えられた。

直接法、抽出法いずれの方法を用いてもCAH患児以外でも17-OHP高値となることがあり、これらの鑑別に2次スクリーニングのための確認検査が必要である。

5. HPLCによるステロイドホルモンの一斉分析

5.1. 装置と条件

HPLCの装置は送液ポンプ(日立655形)、紫外検出器(日立638形)、ODSカラム(エルマERC1171)、カラムオープン(ガスクロ工業製)、データ処理装置(日立D-2500)を使用した。HPLCの条件はカラム温度40℃、移動相はメタノール、水を容積比で60:40として流速1.3 ml/minで246 nmの

紫外波長で検出した。

5.2. 標準ステロイドホルモンとデータ処理

図1に示した標準ステロイドホルモンをメタノールで5 ~ 30 μ g/mlに調整し、内部標準物質19-ノルテストステロン(19-NT)との波高比から、各ステロイドホルモンの検量線を求めて濃度を算出した。

5.3. 試料の前処理

血清0.1 mlに0.5Mリン酸緩衝液(PH8.0)0.9 ml、19-NTを10 ngを加え、これをExtrelut column (Merck社)に添加して保持させる。15分後ジクロロメタン10 mlをカラムに流し、溶出したジクロロメタンを蒸発乾固する。汙紙血液では直径10 mmディスクに緩衝液1 mlを加えて同様の操作を行う。

5.4. 標準ステロイドホルモンのクロマトグラム

主要なステロイドホルモン22種のクロマトグラムを図1に示した。約30分と短時間でCAH関連ステロイドホルモンの分析が可能であり、回収率、再現性も良好であった。本法の測定感度は、絶対量でコルチゾール、21-デオキシコルチゾールが0.5 ng、17-OHP、アンドロステンジオン、テストステロンが1 ng、プロゲステロンが2 ngであった。

5.5. 正常新生児とCAH患児のクロマトグラム

血清100 μ lを試料とすると、正常新生児ではコルチゾール以外は検出されない。しかし、CAH患児では17-OHP、アンドロステンジオン、21-デオキシコルチゾールの他に未特定のピークが多数出現していた(図2)。

汙紙血液を試料とすると、正常新生児ではコルチゾール以外は検出されず、抽出法ELISAで17-OHPが25 ng/ml以上であったCAH患児4例では、17-OHPのほかに一部でアンドロステンジオン、21-デオキシコルチゾールのピークが認められたことから、緊急を要する患児の確認検査として優れていた。

6. HPLC-ELISAによる17-OHPの測定

6.1. 対象

スクリーニングで正常となった新生児20例、要再検査となった26例(正常出生体重児15例、低出生体重児11例)、CAHと診断された6例について検討した。

6.2. 測定方法

標準汙紙血液と新生児汙紙血液の直径3 mmディスク2枚からリン酸緩衝液(PBS)による溶出とジエチルエーテ

表2 抽出法ELISAの17-OHPのカットオフ値と再検査率

カットオフ値 抽出法17-OHP (ng/ml)	再採血対象児数		合 計 (n=15,905)
	正常出生体重児 (n=15,189)	低出生体重児 (n=716)	
5	92(0.61%)	55(7.68%)	147(0.92%)
6	51(0.33%)	42(5.87%)	93(0.58%)
7	35(0.23%)	29(4.05%)	64(0.40%)
8	27(0.18%)	27(3.77%)	54(0.34%)
9	18(0.12%)	16(2.23%)	34(0.21%)
10	15(0.10%)	13(1.82%)	28(0.18%)

表3 直接法ELISAの17-OHPのカットオフ値と再検査率

カットオフ値 直接法17-OHP (ng/ml)	再採血対象児数		合 計 (n=13,987)
	正常出生体重児 (n=13,286)	低出生体重児 (n=701)	
20	320(2.41%)	171(24.39%)	491(3.51%)
25	104(0.78%)	49(7.00%)	153(1.09%)
30	41(0.31%)	25(3.57%)	66(0.47%)
35	18(0.14%)	14(2.00%)	32(0.22%)
40	12(0.09%)	5(0.71%)	17(0.12%)

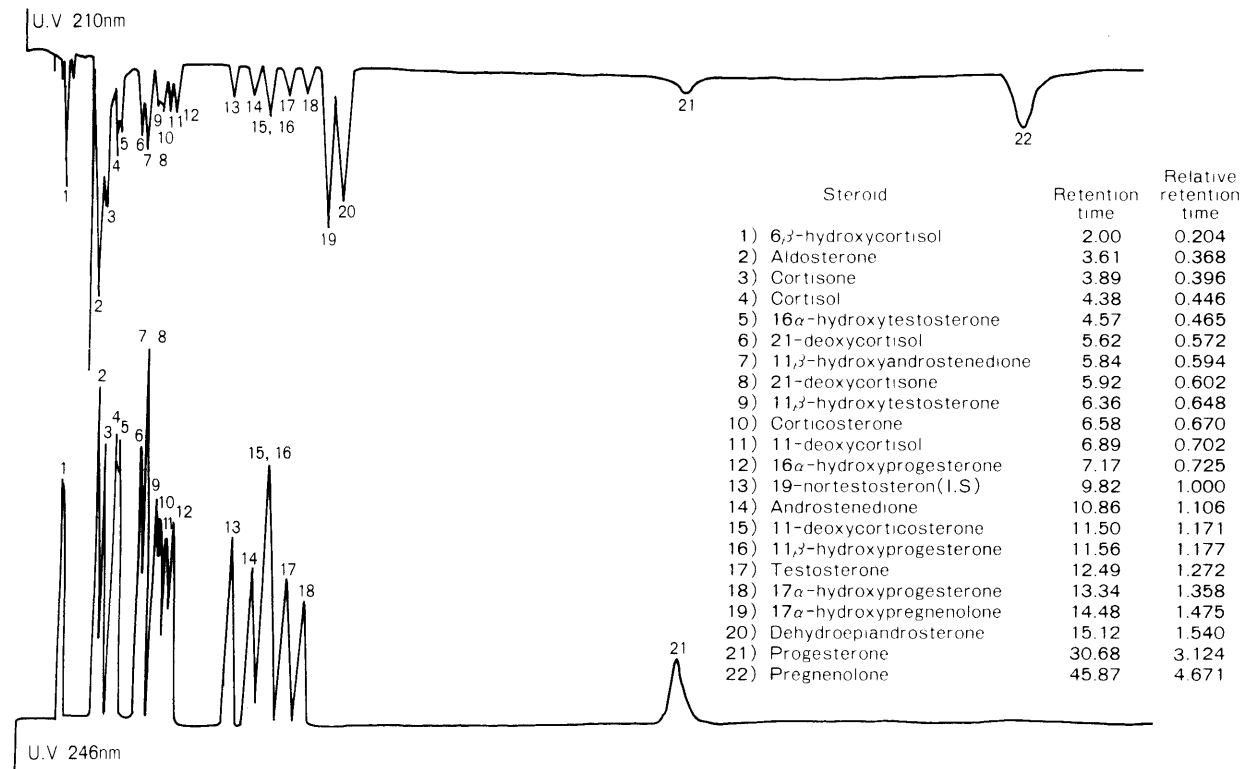


図1 HPLCによる各種ステロイドホルモンのクロマトグラム

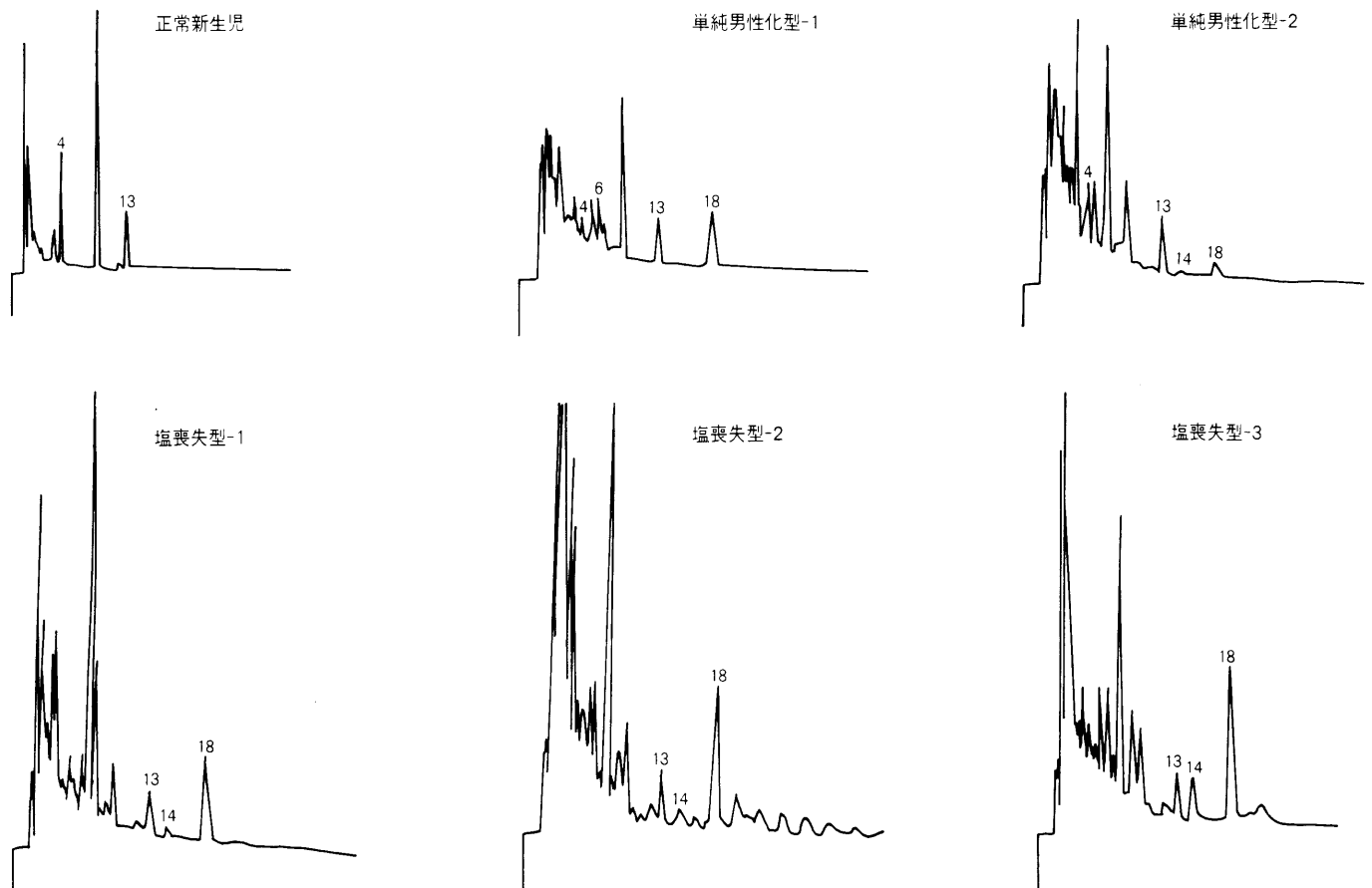


図2 正常新生児及び先天性副腎過形成症児の血清によるクロマトグラム

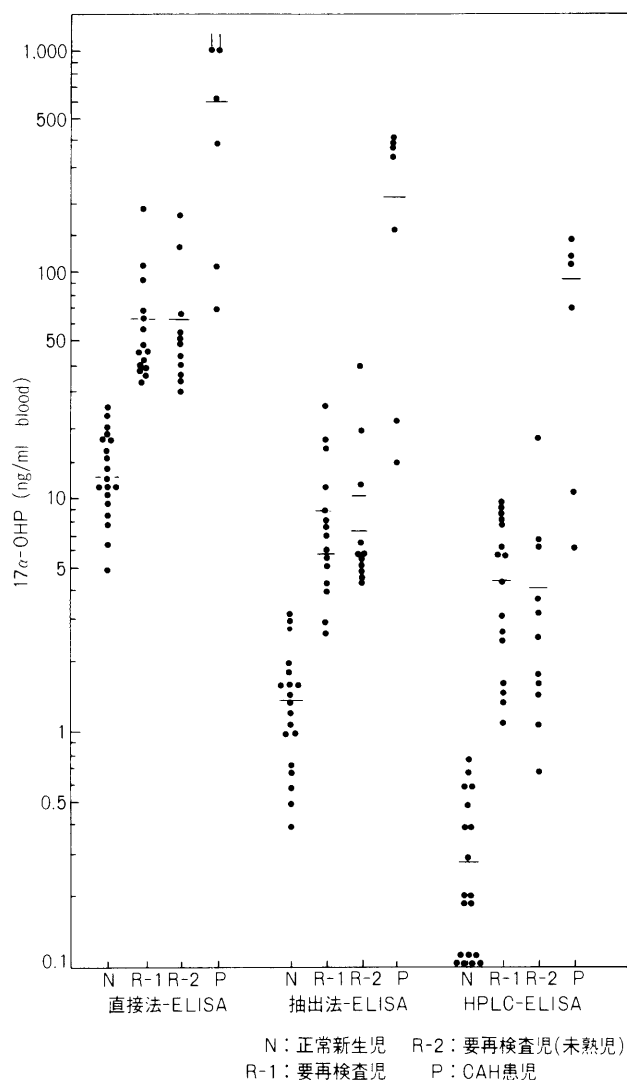


図3 測定方法の違いによる正常新生児、要再検査対象児及び先天性副腎過形成症児の17-OHP値

ル抽出を行い、5.1節に述べたHPLCの条件により1分間に1.3 ml分取し、蒸発乾固後リン酸緩衝液(PBS)-牛血清アルブミン(BSA)に溶解し、ELISAにより17-OHPの測定を行った。

6.3. 直接法、抽出法、HPLC-ELISAの比較

直接法、抽出法、HPLC-ELISAでの17-OHPの平均値±標準偏差は、正常新生児ではそれぞれ 13.2 ± 5.8 , 1.4 ± 0.8 , 0.3 ± 0.2 ng/mlであり、要再検査児の正常体重児は 56.0 ± 1.6 , 7.5 ± 1.9 , 4.7 ± 3.0 ng/ml 低出生体重児は 55.5 ± 1.8 , 7.8 ± 2.0 , 4.3 ± 3.3 ng/ml, CAH患児では 608 ± 519 , 229 ± 189 , 99.8 ± 79.4 ng/mlであった。(図3)。また、直接法と抽出法及びHPLCとの相関係数は、それぞれ $r = 0.969$, 0.973 と有意な相関を示していた。これより特異性が良くなるほど17-OHPは低値となるが、直接法で35 ng/ml以上を示す新生児では、HPLC-ELISAでも患児の17-OHPの分布とオーバーラップしていることから、適切なカットオフ値を設定することで、簡便な直接法でもスクリーニングが十分可能である。

7. 過去7年間のマススクリーニングの結果

1982年4月から1989年3月までの7年間に140,080人の新生児がスクリーニングされ、9例のCAH患児が検出された。スクリーニングでの検査法とカットオフ値により分類した第1期から第3期までを比較すると、再採血率は1.5%, 0.9%, 0.4%と減少し、精密検査率も0.14%, 0.06%, 0.04%と減少した。この結果、要精密検査者中の患者の割合(偽陽性率)は $\frac{1}{30}$ から $\frac{1}{15}$ まで減少した(表4)。しかし、患児の発見率はほぼ12,000人~20,000人に1人と一定であり、さらに見逃し例も経験していないことから、これまで使用してきた検査法及びカットオフ値の設定が妥当なものであることが示された。

8. マススクリーニングで発見されたCAH患児の臨床症状と検査所見

マススクリーニングで発見された患児9例の初回スクリーニング時の17-OHPは、抽出法で14.1-450 ng/mlに分布していた。精密検査時の臨床症状と検査所見を比較すると、

表4 札幌市における先天性副腎過形成症マススクリーニングの結果

期 間	測 定 法	カットオフ値			
第1期 (1982.4~1983.3)	抽出法ELISA 17-OHP (ビーズ法)	17-OHP : +3SD	21,518	318(1.48%) 30(0.13%)	1
			112*	7	
第2期 (1983.4~1986.3)	抽出法ELISA 17-OHP (ビーズ法)	17-OHP : 5ng/ml	61,557	566(0.92%) 36(0.06%)	5
			194	5	
第3期 (1986.4~1989.4)	直接法ELISA 17-OHP コルチゾール (フレート法)	17-OHP : 97パーセンタイル 17-OHP コルチゾール0.3以上	56,985	240(0.40%) 22(0.04%)	3
			111	8	
合 計			140,080	1,144(0.8%) 88(0.06%)	9
				417	20
					1 : 15,564**

注 : * (低出生体重児数), ** (発症頻度)

表5 先天性過形成患児のスクリーニング時及び初診時の所見

症 例		1	2	3	4	5	6	7	8	9
スクリーニング	日 齢	3	2	3	5	2	5	2	5	2
	17-OHP (ng/ml) (抽出法)	450	200	234	41.9	260	288	83.4	14.1	238
精 密 検 査	日 性 別	10 女	3 女	4 女	17 女	3 女	14 男	2 女	40 男	3 女
	外 性 器 異 常	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	色 素 沈 着	+	+	+	+	+	+	+	±	+
	嘔 吐	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	下 痢	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	脱 水	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	体 重 増 加 不 良	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17-OHP (ng/ml)	263	30	408	116	356	161	408	129	104
	21-DOF (ng/ml)	27	260	11	52	n.d	32	11	30	103
	△4-AD (ng/ml)	242	15	106	9.0	69	40	106	n.d	9.3
査	F (ng/ml)	n.d	n.d	n.d	3.9	n.d	8.2	n.d	4.7	n.d
	Na (mEq/l)	142	141	149	138	142	134	144	141	139
	K (mEq/l)	6.3	5.7	6.0	7.1	8.1	5.4	4.7	5.4	4.3
	病 型	塩喪失型	単純型	塩喪失型	単純型	塩喪失型	単純型	塩喪失型	単純型	塩喪失型

食塩喪失型が5例（全例女児）、単純男性化型が4例（男児2例，女児2例）であった。臨床症状として，外性器異常は女児全例に認められた。色素沈着は9例中8例に認められたが，脱水ショック症状等は全例認められなかった。HPLCによるステロイドホルモン分析では17-OHP，21-デオキシコルチゾール，アンドロステンジオンの高値を認め，コルチゾールは単純男性化型でのみ検出された（表5）。なお，全例が適切な治療により順調に発育している。

9. おわりに

以上，CAHの新生児マススクリーニングにおけるELISA法及びHPLCの有用性について述べるとともに，札幌市における過去7年間のスクリーニングの成績を報告した。

参考文献

- 1) 諏訪誠三，五十嵐良雄，加藤精彦，楠智一，田苗綾子，新美仁男，矢田純一：先天性副腎過形成症の実態調査結果，第一編，頻度に関する研究，日児会誌，85：204～210，1981.
- 2) Pang, s., Hotchkiss, J., Dragh, A. L., Levine, L. S. and New, M. I. : Microfilterpaper method for 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay, J. Clin. Endocrinol. Metab., 45 : 1003～1008, 1977.
- 3) 下澤和彦：先天性副腎過形成症（21-水酸化酵素欠損症）の新生児マススクリーニングに関する研究：第一編，乾燥汚紙血液による血中17 α -hydroxyprogesteroneの測定，日内分泌会誌，59：1845～1859，1983.
- 4) Hofman, L. F., Klaniecki, J. E. and Smith, E. K. : Direct solid-phase radioimmuno-assay for screening 17 α -hydroxyprogesterone in whole - blood samples from newborns, Clin. Chem., 31 : 1127 ~ 1130, 1985.
- 5) 福士 勝，荒井 修，水嶋好清，高杉信男，藤枝憲二，松浦信男：先天性副腎過形成症（21-水酸化酵素欠損症）のマススクリーニングに関する研究：第1報，乾燥汚紙血液17 α -hydroxyprogesteroneの酵素免疫測定法の基礎的検討と新生児マススクリーニングへの応用，日内分泌会誌，62：683～696，1986.
- 6) 福士 勝，荒井 修，水嶋好清，高杉信男，藤枝憲二，松浦信男：先天性副腎過形成症（21-水酸化酵素欠損症）のマススクリーニングに関する研究：第3報，マイクロプレートを用いる乾燥汚紙血液17 α -hydroxyprogesteroneの酵素免疫測定法開発，日内分泌会誌，63：113～122，1987.
- 7) 水嶋好清，福士 勝，荒井 修，高杉信男，藤枝憲二，松浦信男：先天性副腎過形成症（21-水酸化酵素欠損症）のマススクリーニングに関する研究：第2報，高速液体クロマトグラフィによる血中および羊水中ステロイドの一斉分析，日内分泌会誌，63：102～112，1987.
- 8) 高杉信男，福士 勝，藤枝憲二，松浦信男：昭和63年度厚生省心身障害研究報告書，マススクリーニングに関する研究：171～174，1989.

ラボラトリーロボットを用いた医薬品の分析

Analysis of Drugs with the Aid of a Robotic System

松田りえ子*

(平成2年5月31日受理)

1. はじめに

近年、数種のラボラトリーロボットシステムが開発され、実験室における作業の自動化が図られている^{1)~3)}。ロボットシステムによる自動化の最も大きな利点は、多数の試料を連続的に処理することができ、処理の再現性が良いことである。さらに、ラボラトリーロボットシステムは産業用のロボットに比較して、プログラミングが容易であり、ユーザが自由にシステムを構築できるのが大きな特徴である。

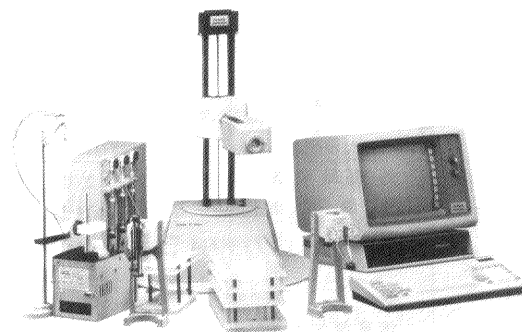
医薬品分析の分野における品質管理においては、薬局方などにいくつかの試験が規定されているが、これらの試験は1試験当たりの試料数も多く、また医薬品の人体に適用されるという性質上高い精度が要求される。このため、医薬品の試験はロボットが有効に利用できる分野であると言える。しかし、ロボットシステムを用いた自動化の大部分は、単に分析機器に供するための試料の前処理を行うのみで、判断機能を備えたような自動化には至っていない。ロボットを上位のコンピュータによって制御すれば、判断計算等の処理を含めたシステムを作ることができる。

著者は、ロボットシステムを用いて、製剤の含量均一性試験を行うシステムを作成した^{4),5)}。含量均一性試験は、錠剤またはカプセル剤等の固形製剤について、個々の製剤に薬物が均一に含まれていることを確認する試験であり、10~30個の製剤を分析する必要がある⁶⁾。このシステムでは、製剤中の分解物のような不純物を分離して分析するために、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で定量を行い、製剤からの薬物の抽出、分析を自動的に行う。また、HPLCの分析時間を短縮するために、試料を短い時間間隔で注入し、得られた重なり合ったクロマトグラムをカルマンフィルタで解析する方法(overlapped chromatography)を用いた。この手法によれば、分析時間を容易に短縮することができる^{7),8)}。システム全体は、パーソナルコンピュータによって制御され、薬物名、個数等を入力すれば、ロボットに適切なプログラム名、分析パラメータ等が送られる。また、overlapped chromatographyを行う場合、HPLCへの注入において正確な注入間隔が要求されるので、通常のオートサンブラ等ではこの方法を応用することは困難であるが、パーソナルコンピュータのタイマを用いてロボットを制御することにより可能となった。

2. 実験

2.1 機器及び試薬

ロボットシステムは、Zymate IIを使用した。試験管等を移動させるためのgeneral purpose handとチップを取り付けて、液体の分取、添加を行うsyringe handの2種類の



ZP-100 ザイメイトバイテクノロジーシステム

ハンドを用い、必要に応じて付け替えた。内部標準液、抽出溶媒等を加えるために、master laboratory stationを、遠心分離のためにcentrifuge stationを使用した。ボルトテクサ、超音波抽出機の電源のon-offはpower & event controllerにより行った。HPLCへの注入には20 μ lのループ付きのHPLC injector stationを使用した。

Zymate本体及び各stationの制御はコントローラによって行い、プログラム言語はEasy labを使用した。さらに、controllerはcomputer interfaceを介して、パーソナルコンピュータ(NEC PC-9801)に接続されており、システム全体の制御はこのパーソナルコンピュータによって行った。パーソナルコンピュータのプログラムはN88BASICによって作成した。作成した製剤分析システムの配置図を図1に示す。HPLCは紫外線検出器、カラムオープン(温度40 $^{\circ}$ C)を組み合わせ、カラムはガスクロ工業製Inertsil ODS(25cm $\times$ 4.6mm)を使用した。

HPLCの移動相はHPLC用アセトニトリル、特級リン酸、特級リン酸二水素カリウム(以上、和光純薬製)及び蒸留水により調製した。

ジアゼパム、フマル酸クレマスチンは医薬用を、p-ヒドロキシ安息香酸プロピルは特級品を使用した。

2.2 データ解析

HPLC検出器からの信号は増幅器(横河電機製 3131)で増幅後、A/Dコンバータ(Elmec製、EC-2325)変換し、パーソナルコンピュータ(NEC製、PC-9801VX)に取り組みで解析を行った。解析はカルマンフィルタによって行い、重なったピークを分離した。

3. 含量均一性試験

3.1 ロボットによる処理操作

ジアゼパム錠の含量均一性試験における試料溶液の調製法を図2に、分析条件を表1に示す。1回の操作で4錠が処理される。錠剤はあらかじめ1個ずつ試験管に入れておき、0.1%リン酸を加えて崩壊させる。master laboratory stationにより内部標準溶液及びメタノールを加え、超音波

* 国立衛生試験所

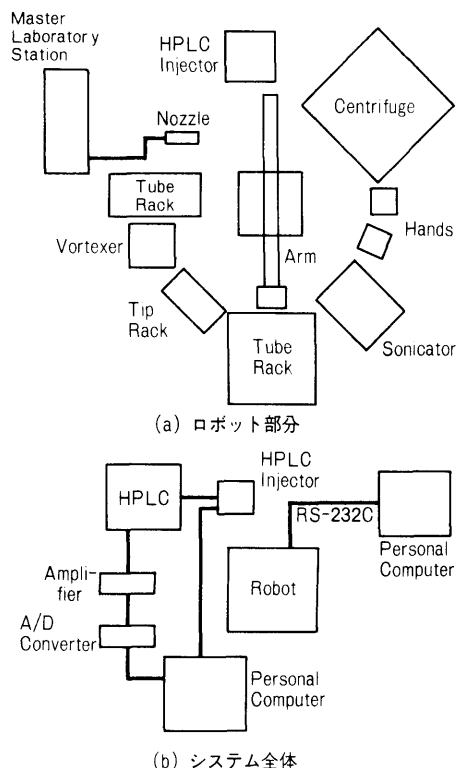


図1 製剤分析システムのブロックダイアグラム

照射によって主薬を抽出する。vortexerにより攪拌し、centrifuge stationで遠心分離した後、syringe handで上清0.3mlを採取する。上清はHPLC移動相を加えて希釈混合して、試料溶液とした。試料溶液をHPLCに注入するときに、injector stationからパルスが発生し、これに同期してコンピュータへのデータ取込みを開始した。

3.2 再現性

クロマトグラムを図3に示す。同図(a)はジアゼパム標準溶液のクロマトグラム、(b)は同じ溶液を180秒間隔で5回注入したときのoverlapped chromatogramである。全体としての分析時間が短縮され、分析の効率が改良されている。表2には図3(b)のクロマトグラムをカルマンフィルタを用いて解析した結果を示す。各ピークの推定値は、図3(a)のクロマトグラム中のピークを1として表されている。ジアゼパムと内部標準のピークの推定値の比の相対標準偏差RSDは0.5%以下であり、HPLCへの注入タイミング、データ解析ともに精度よく行われていることがわかった。

ロボットによる抽出処理の再現性を検討した結果を表3に示す。錠剤に代えてジアゼパム溶液(2mg/ml) 1mlを用い、錠剤と同様に処理を行い、10回繰り返したときの分析結果である。それぞれのピークの推定値のRSDは4%以上でやや大きい。この原因は、syringe handで遠心分離後の上清を採取する際に5mlのシリンジで0.3mlを採取しているため、この部分での誤差が大きいものと解釈される。しかし、内部標準を最初に加えたので、定量上は問題はないと思われる。実際ジアゼパムと内部標準の比のRSDは1.05%であった。このばらつきには試料調製とHPLCの分析の誤差

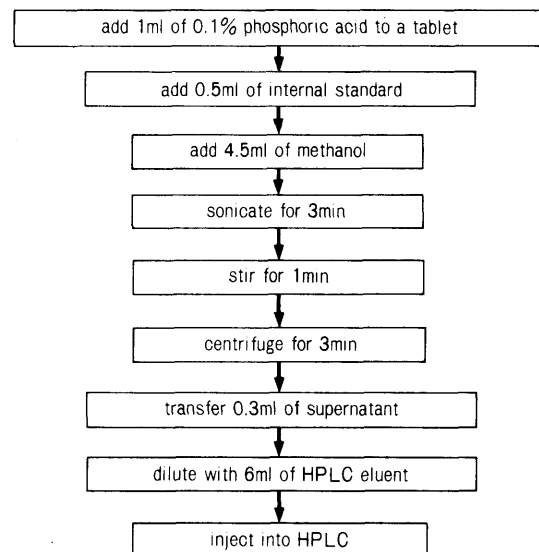


図2 含量均一性試験における処理方法

表1 ジアゼパム錠の分析条件

column	Inertsil ODS 25 cm × 4.6mm
eluent	methanol - pH3, 0.05M phosphate buffer(4:6)
flow rate	1 mL/min.
column temp.	35°
detection	240 nm
internal standard	n-propyl p-hydroxy benzoate 4 mg/mL, 0.5mL
sampling interval	0.4 s

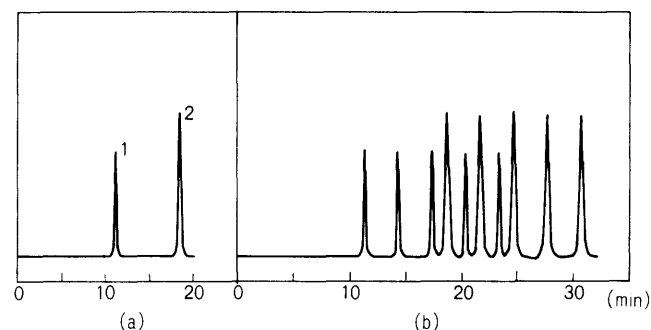


図3 (a) ジアゼパム標準溶液のクロマトグラム、(b)180秒間隔で注入して得られるクロマトグラム
(ピーク1 内部標準物質、ピーク2 ジアゼパム)

が含まれているので、表2の解析結果と比較すれば、ロボットによる処理が再現性よく行われていると考えられる。

3.3 用手法との比較

ジアゼパム錠20個の含量均一性試験を、上記のロボットシステム及び用手法によって行った結果を比較した。HPLCの条件は同一である。表4には、それぞれの含量の平均値、最低値、最高値、RSDを示す。自動化法でも用手法でも結果は同様であり、ロボットシステムによる試験が、従来行われていた方法と同様の結果を与えることが確認された。

3.4 ロボットシステムによる処理の効率化

ロボットシステムによる処理の流れを図4に示す。上段

表2 カルマンフィルタによる解析結果

injection No.	Internal standard	Diazepam	Ratio
1	1.0149	1.0237	1.0087
2	0.9950	0.9964	1.0014
3	0.9976	0.9963	0.9987
4	0.9927	0.9923	0.9996
5	0.9946	0.9914	0.9968
Mean	0.9989	1.0000	1.0010
R.S.D. (%)	0.9094	1.3419	0.4580

表3 ロボットシステムの試料溶液調製の再現性

Injection Nn.	Internal standard	Diazepam	Ratio
1	1.0066	1.0072	1.0006
2	0.9828	0.9805	0.9977
3	0.8927	0.8892	0.9964
4	0.9716	0.9829	1.0117
5	0.9763	0.9724	0.9959
6	0.9765	0.9724	0.9959
7	0.9939	1.0039	1.0100
8	0.8858	0.9007	1.0168
9	0.9723	0.9925	1.0208
10	0.9980	0.9873	0.9893
Mean	0.9659	0.9705	1.0052
R.S.D. (%)	4.3494	4.2498	1.0451

表4 自動化法と用手法の結果の比較

	Automated method	Manual method
Number of tablet	20	20
Mean (mg)	2.0023	1.9788
Range (mg)	1.8982-2.1572	1.8973-2.11
R.S.D. (%)	3.56	3.66

はロボットによる処理。下段はHPLCの分析状況を表している。薬物名、個数、内部標準の量等のパラメータがコンピュータから転送された後、まず標準溶液を調製し(□□□□), HPLCに注入する。標準溶液の分析の間に(——) 試料溶液(4錠剤)を調製する。試料溶液はHPLCに連続して注入(■)される。以後、ロボットは試料溶液調製とHPLCへの注入操作を交互に行う。試料調製の時間がHPLCの分析時間よりも長ければ、ロボットは休止することなく処理を続ける。HPLCの分析時間も、overlapped chromatographyを用いることにより、短縮することが容易である。20個の錠剤の処理時間は3.5時間であり、試料溶液を調製してから分析を行うよりも大きく短縮されている。また、調製した試料溶液を直ちに分析するので、不安定な薬物の分析も可能である。

3.5 不純物のピークを含む場合

次に、不純物が含まれている錠剤の例を示す。図4(a)は、

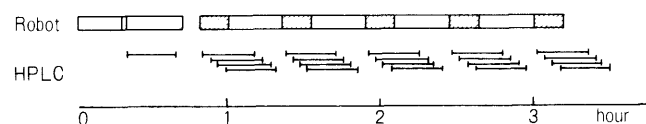


図4 錠剤分析システムでの処理手順

- 試料溶液の調製
- HPLCへの注入操作
- 試料のHPLC分析

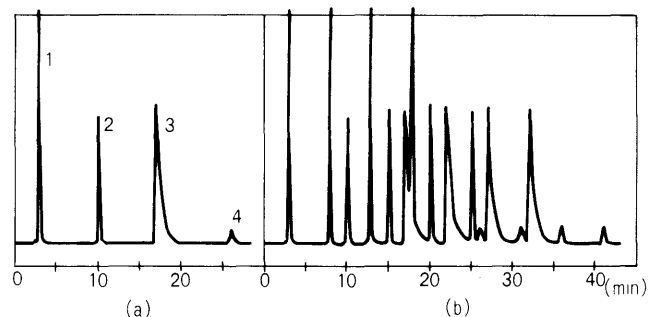


図5 (a) フマル酸クレマスチン錠試料溶液のクロマトグラム, (b) 300秒間隔で注入して得られるクロマトグラム

ピーク1: フマル酸, ピーク2: 内部標準物質, ピーク3: クレマスチン, ピーク4: unknown

フマル酸クレマスチン錠をジアゼパム錠と同様の操作で抽出した試料溶液のクロマトグラムである。分析条件等は表1と同じである(但し検出波長は210nm)。ピーク4は製剤中に含まれていた分解物であろうと思われる。また、主薬のクレマスチンのピークはかなりテーリングしている。同図(b)は試料溶液を300秒ごとに注入したときのクロマトグラムであり、一部でピークがかなり重なっている。前述のジアゼパム錠の例ではインテグレートでも定量は可能であったが、このようにピークの重なりが大きいときには、カルマンフィルタが有効である。また、この例のように不純物によって分析時間が長くなる場合にはoverlapped chromatographyは分析時間を短縮するのに有効な手段となる。

4. 結言

ロボットによる自動処理と、overlapped chromatographyを組み合わせるにより、製剤分析の効率を大きく向上させた。ロボットをパーソナルコンピュータで制御することにより、種々の薬物への対応が容易になった。HPLCへの注入など、厳密な時間制御を要する場合にも、上位コンピュータによる制御が有用である。

参考文献

- 1) Special Issue on The Robot in the Liquid Chromatography Laboratory, J. Liq. Chromatogr., Vol.9 (1986)
- 2) J. R. Strimatis and G. L. Hawk: Advances in Laboratory Automation Robotics Vol.4 (1988)
- 3) J. R. Strimatis and G. L. Hawk: Advances in Laboratory Automation Robotics Vol.5 (1989)
- 4) R.Matsuda Y.Hayashi, M.Ishibashi and Y.Takeda: J. Chromatogr., 438, 319 (1988)
- 5) Y.Hayashi, R.Matsuda, S.Yoshioka and Y.Takeda: Anal. Chim. Acta, 209, 45 (1988)
- 6) Japanese Pharmacopoeia 11-th edition
- 7) Y.Hayashi, T.Shibazaki, R.Matsuda and M.Uchiyama: Anal. Chim. Acta 202, 187 (1987)
- 8) Y.Hayashi, T.Shibazaki and M.Uchiyama: J. Chromatogr., 411, 95 (1987)

解 説

湿式化学分析の自動化

Some Automated Methods for Wet Chemistry

黒石 忠文* 前小屋千秋*

(平成2年6月20日受理)

1. はじめに

実験室や研究室等で広く行われている湿式化学分析を「自動化して日常分析から人手を開放しよう」という試みは古くから行われてきた。しかし、あまり実用化されていないのが現状である。この理由の一つに、湿式化学分析の測定項目が多く、また測定対象の濃度範囲が広いことや、共存物の種類や濃度も異なることなどがあげられる。たとえ同じ物質を測定する場合でも試料の由来が異なると測定に至るまでの操作が変わってくる。このことが湿式化学分析の自動化を進める上で大きな障害となっている。

2. 湿式化学分析の自動化の変遷

湿式化学分析のバッチ法の手順と自動化の比較を図1に示す。各種の処理操作を行い、反応が平衡に達した試料をキュベットに移し替えて分光光度計で測定する、という分析を行う場合について比較する。

サンプルシッパでは、処理操作はバッチ法で行い、発色した溶液をキュベットに移し替えるという操作を自動化したものである。

フローインジェクション法は、1975年に発表されて以来¹⁾湿式化学分析に対する適応範囲が広いことから自動化の一つの方法として定着してきた。ところがフローインジェクション法にも制約がある。例えば、試料は液体であることが条件となる。また、添加する試薬の種類が増加するにつれて流路が複雑になり、信頼性の低下、測定精度の低下などの要因が増加する。さらに、試料ループに順次試料を供給する手段として、オートサンブラが必要である。

インテリジェントオートサンブラは、フローインジェクション法と同様に溶液の状態の試料について、分取から呈色に至る操作を自動化することができる。検知器との接続は注入ポートを介して行う。このインテリジェントオートサンブラは処理操作の複雑な場合、単位時間当たりの処理速度が低下する。また添加する試薬の種類が増加すると、試薬容器に場所を占められてしまい一度にセットできる試料が減少する。また検出器の機能はないために、処理の終わった試料を何らかの方法で検知器に送り込んでやる必要がある。これには、分光光度計のフローセルに注入ポートから直接送液する方法と、フローインジェクション法の試料ループに送液してからフローセルに送り込む方法がある。

分析用ロボットは、固体試料の秤(ひょう)量、溶解から呈色に至る操作、検知器への送液までほとんどの操作を

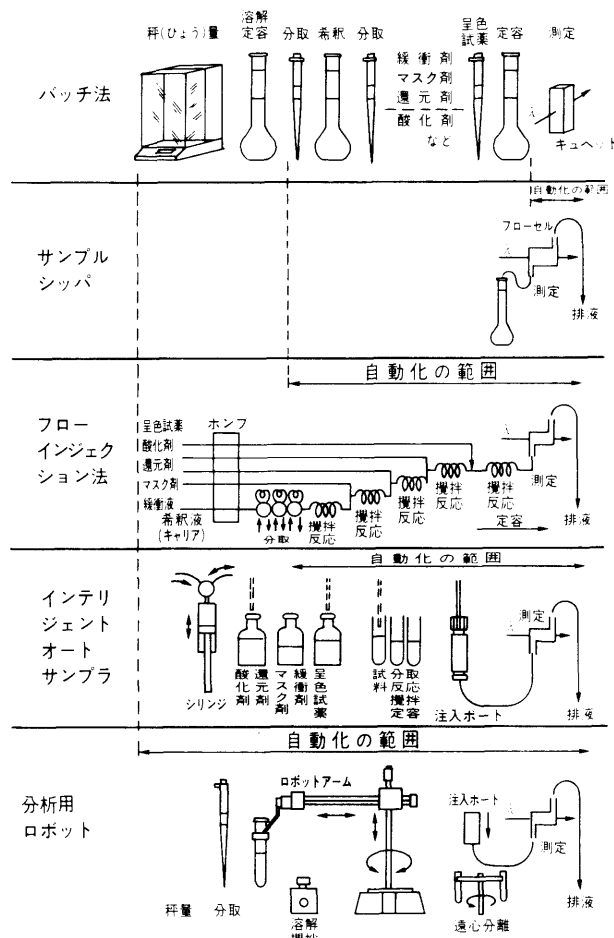


図1 湿式化学分析のバッチ法と自動化の比較
従来のバッチ法に対して、どこまで自動化できるかを視覚的に示した。

自動化することが可能である。しかし、処理能力の面から見ると、処理速度を上げられないという制約がある。

以上述べたように、自動化の程度によって四つの方法が考えられるが、ここでは主として分光光度計用として開発された、AS-3000形インテリジェントオートサンブラについて解説しさらに、フローインジェクション法との組み合わせについても述べる。

* 株式会社 日立製作所 那珂工場 分析システム部

3. AS-3000形インテリジェントオートサンプラによる自動化

AS-3000形の外観を図2に、AS-3000形の流路を図3に示す。

本オートサンプラは、試料や試薬をセットするラックおよびシリンジ、処理の終わった試料を検知器に送液するための注入ポートを持っている。さらに、シリンジの動き、分取量などを分析条件に合わせてプログラムすることが可能である。このため、従来の試料を順番に供給するだけのオートサンプラと区別するためにインテリジェントオートサンプラと呼ばれている。3方バルブの切替とシリンジの上下動で試料、試薬、洗浄液（希釈液）などの吸入、吐出を行う。最終的に平衡に達した試料を吸入し、注入ポートから検知器へ送液して測定を行う。

3.1 特長

- (1) 試料の分取、希釈、試薬の添加などの手順に従ってプログラムを作成し、実行することができる。
- (2) プログラムの作成は、コマンドを組み合わせることによって簡単に作成することができる。
- (3) 外部コンピュータからの制御が可能である。
- (4) 試料、試薬の容器は、任意の大きさ、形状の容器を使用することができる。
- (5) シーケンシャルインジェクション機能があり、試料を順番に測定するだけならば、プログラムを作成する必要がない。

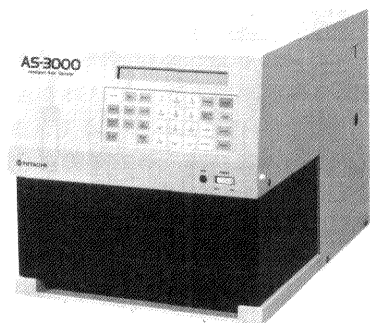


図2 AS-3000形日立インテリジェントオートサンプラ

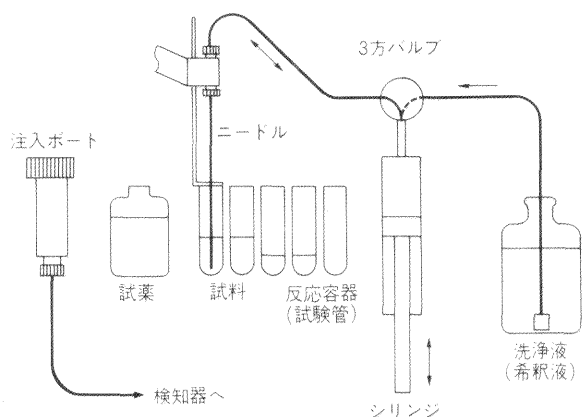


図3 AS-3000形の流路

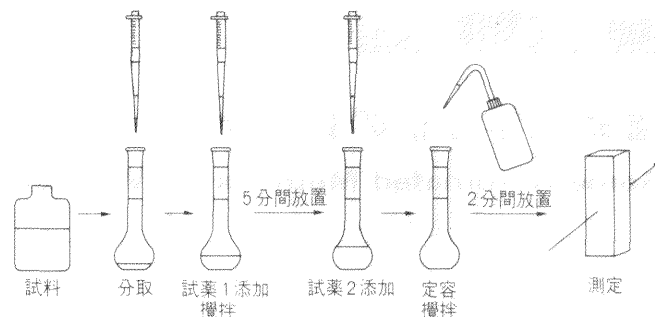


図4 湿式化学分析の手順

3.2 シーケンス

図4に示す手順で処理操作を行う分析法のシーケンスを示す。

- (1) ニードルをホームポジションに移動し洗浄を行う。
- (2) 試料を一定量分取し、次に試薬1を一定量分取する。このとき試料と試薬1の間に空気を少量吸入し、混合を防止する。
- (3) 空試験管に吐出する。
- (4) 吸入と吐出を2回ないし3回繰り返す、攪拌（かくはん）する。
- (5) (3)の操作から5分間待つ。
- (6) 5分間の待ち時間の間にニードルを洗浄する。
- (7) 試薬2を一定量分取し、5分経過後に添付する。
- (8) 吸入と吐出を2回ないし3回繰り返す攪拌する。
- (9) (7)の操作から2分間待つ。
- (10) 2分経過後、反応が平衡に達した試料を一定量分取し、注入ポートから検知器に送り込む。

以上のようなシーケンスをプログラム用のコマンドを利用して作成し、実行することによって図4の分析を自動化することができる。実際のプログラム作成については紙面の都合上ここでは割愛する。U-2000形ダブルビーム分光光度計とフローセルの組み合わせによるカリウムの測定例を図5に示す。テトラフェニルホウ素ナトリウムによる比濁分析法^{2),3)}を応用し、土壌抽出液について原子吸光法と比較した。このときの回帰式は $y=0.980x+1.7$ 、相関係数は0.987であった。

4. フローインジェクション法による自動化

フローインジェクション法の原理や基本的な事柄、応用例などについてはすでに解説^{4),5)}や出版物^{6)~8)}で述べられているので省略する。ここでは自動化システムの一つの手段として見た場合について述べる。

図4に示す測定をフローインジェクション法で自動化する場合の流路を図6に示す。

オートサンプラは、試料を順番に注入バルブの試料ループに送液するだけの働きしかしていない。試料を一定量分取するのは、注入バルブの試料ループの長さで決まる。この程度の簡単な反応の場合は、AS-3000形とフローインジェクション法のどちらで自動化システムを構成しても大きな差はない。

亜硝酸イオン、硝酸イオンの測定について以下に述べる。

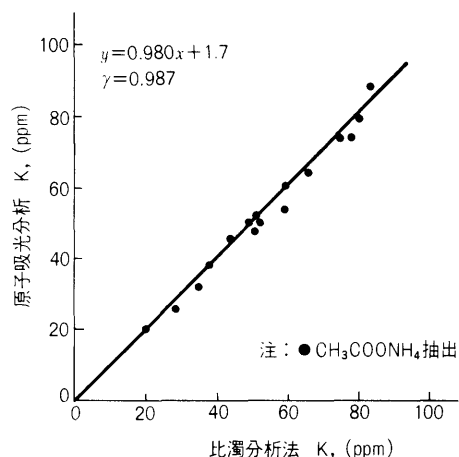


図5 AS-3000形による自動分析法と原子吸光法との相関（土壌）

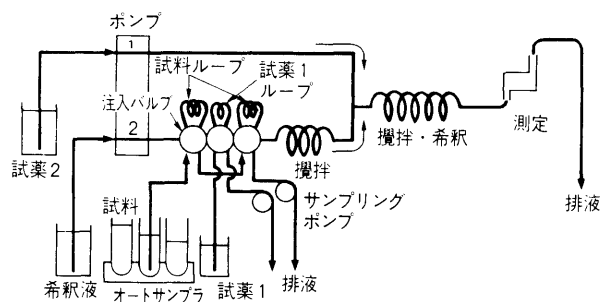


図6 フローインジェクション法による分析の自動化

亜硝酸イオンの測定だけに限れば、AS-3000形でも簡単に自動化することが可能である。しかし、亜硝酸イオンを測定する場合、しばしば硝酸イオンの測定をあわせて行うことがある。この硝酸イオンの測定には、銅-カドミウムカラムに試薬を通して亜硝酸イオンに還元し、ナフチルエチレンジアミン吸光光度法による測定⁹⁾がよく利用されている。AS-3000形の場合、この硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する操作が困難である。また、銅-カドミウムカラム以外の方法で還元を行った場合でも、一つの試料について2回測定しなければならない。一方、フローインジェクション法で自動化した場合は、流路の途中に銅-カドミウムカラムを組み込むことによって、還元を簡単に行うことができる。フローインジェクション法による自動化の流路を図7に示す。試料ループを二つ設け、この二つの試料ループの間に銅-カドミウムカラムを置くことによって、カラムの上流に位置する試料は、カラムを通らないで直接呈色試薬と合流する。したがって、試料中の亜硝酸イオンの濃度を求めることができる。カラムの下流に位置する試料はカラムを通過して試料中の硝酸イオンが亜硝酸イオンに還元される。したがって硝酸イオンと亜硝酸イオンの含量を求めることができる。このようにフローインジェクション法では、1回のサンプリングで亜硝酸イオンおよび亜硝酸イオンと硝酸イオンの含量が求まる。両者の差から硝酸イオンの濃度を求めることができる。測定例を図8に示す。

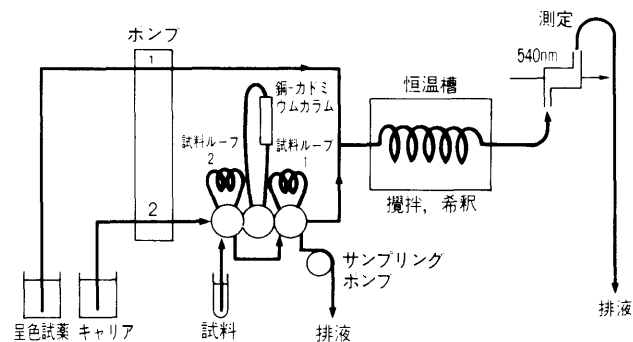


図7 硝酸イオン、亜硝酸イオン同時分析流路

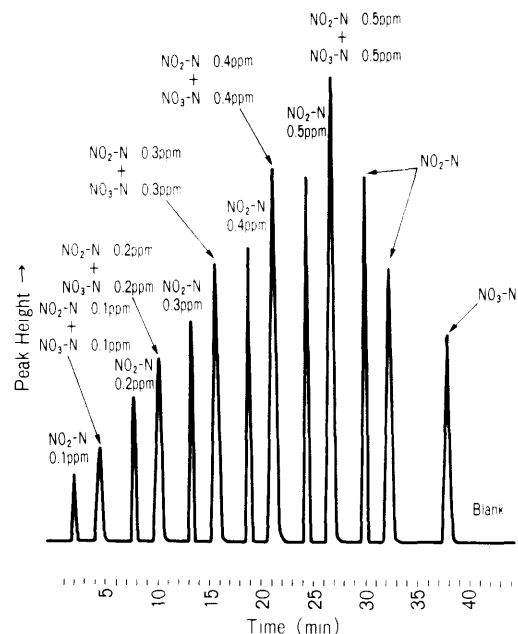


図8 硝酸イオン、亜硝酸イオン標準液の測定例

5. AS-3000形とフローインジェクション法を組み合わせた自動化（濃度範囲の広い試料の測定を行う場合）

フローインジェクション法の測定流路を設計する場合、通常は測定対象物の最低濃度の試料の測定ができるように条件を設定する。なぜならば、低濃度試料の測定が可能ならば、もし高濃度試料を測定してスケールオーバーしても希釈すれば測定が可能になるからである。また、もし逆に高濃度試料の測定が可能な流路を設計した場合、低濃度試料の測定をするためには濃縮が必要となり、これは希釈よりもはるかに困難な操作を必要とするからである。

フローインジェクション法で測定可能な濃度範囲を越えた試料に対しては、測定結果を見てから判断し、希釈して再測定する必要がある。フローインジェクション法で自動希釈を行った場合は^{5),10)~12)}、一度条件を決めてしまうと希釈率が固定されてしまう。希釈の再現性は良好であるが希釈率を簡単に変えることができないという問題がある。このような場合、AS-3000形を使用すれば、あらかじめ5倍、10倍、100倍など段階的に任意の倍率に希釈した試料を調製

して測定することで、高濃度試料も測定可能な濃度範囲に入れることができる。さらに、この希釈操作と合わせて酸、アルカリ、緩衝液などによるpHの調節やマスキング剤の添加、マトリックスをそろえることなどの操作を行うことができる。

6. おわりに

従来から行われていたフローインジェクション分析法による湿式化学分析の自動化に、インテリジェントオートサンプラを組み合わせることによって、両者の長所を生かした自動化システムを構成することができる。すなわち、プログラムの簡素化、流路の単純化などであり、測定精度、信頼性、処理速度などの向上に有効である。これによって、応用分野の大幅な拡大が可能となった。さらに、このインテリジェントオートサンプラを使用することで、従来1システム1項目測定から、1システム多項目測定への拡張の可能性も持っている。本稿が、実験室、研究室などの湿式化学分析の自動化、省力化へのヒントとなれば幸いである。

参考文献

- 1) J. Ruzicka, E. H. Hansen : Anal. Chim. Acta, 78, 145 (1975)
- 2) 上野, 外 : 分析化学, 18, 92 (1969)
- 3) 前小屋, 外 : 分析化学会第38年会講演要旨集, 3 K01 (1989)
- 4) 黒石, 外 : The Hitachi Scientific Instrument News, 27, 2314 (1984)
- 5) 黒石, 外 : The Hitachi Scientific Instrument News, 31, 2816 (1988)
- 6) J. Ruzicka, E. H. Hansen 共著, 石橋信彦, 与座範政共訳 : フローインジェクション分析法 (化学同人)
- 7) 上野景平, 喜納兼勇共著 : フローインジェクション分析法入門 - 実験と応用 - (講談社サイエンティフィク)
- 8) 高島良正, 与座範政編 : ラボ・オートメーション図説フローインジェクション分析法 基礎と実験 (廣川書店)
- 9) JIS K0120 : 工場排水試験方法 (1986)
- 10) 日立テクニカルデータ : UV/VIS No.69
- 11) 黒石, 外 : 第48回分析化学討論会講演要旨集, 2 C01 (1987)
- 12) 保田, 外 : J. Flow Injection Anal., 6No.1, p5 (1989)

Topics

原子雲の挙動の動的観察

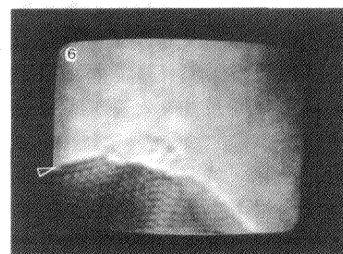
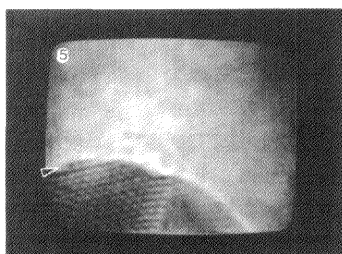
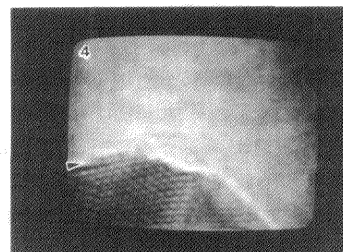
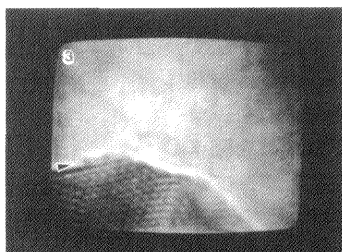
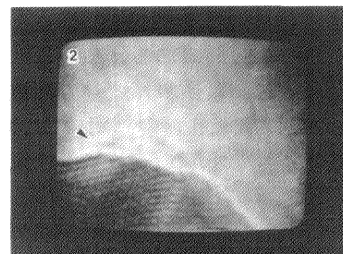
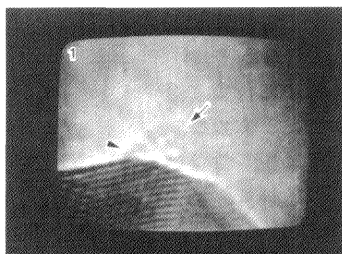
最近、大幅な性能向上が実現した高分解能300kV分析電子顕微鏡H-9000 NAR形を用いて、金の蒸着粒子が強い電子線で照射されたときに、その粒子の表面に発生する金の原子雲の挙動を動的に観察、記録した。

このレベルの観察は、一部の研究者が特殊仕様の装置を用いて試みている、いわゆる特殊観察の領域と考えられていた。

写真はその観察の中でも、今までに確認されたことのない、原子雲の粒子表面への再配列の様子をとらえた例である。金粒子内の比較的不安定な面からはじき出されたと思われる原子は、粒子表面付近に集まり原子雲を構成する(写真1)。その原子雲の一端が、安定な粒子表面の方向へ伸びていく(写真2)。その伸びた集団の先端に位置する原子が、その粒子表面に接して滑り始める。それに続いて、原子雲の原子は次々と滑り、粒子表面に1原子層の

新しい層を築く(写真3~6)。新しい層に点々と並ぶ約0.2nmの黒点は果たして金の原子1個ずつなのか? 興味の尽きないところである。

以上、最近の分析電子顕微鏡は、動く原子をも鮮明に観察できるようになったことについて簡単に紹介した。
(上野武夫 記)



日立高速液体クロマトグラフ用前処理機能付きオートサンプラとこれを用いたプリカラム誘導体化法への応用

HITACHI HPLC Autosampler with Sample Preparation Capability : Application to Pre-Column Derivatization

平田 源蔵* 嶋本真由美* 横倉 武文** 伊藤 三男* 加地 弘典*

(平成2年6月20日受理)

1. はじめに

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) は、応用分野面でも、従来の化学工業、医薬品、食品、環境に加えて、最近では、バイオテクノロジーや医療の分野にまで広がってきている。これに伴い、より自動化の進んだ多機能専用機に対する要求が高まっている。

一方、目的成分を選択的に高感度で検出する有効な手段として、反応液体クロマトグラフィーがある。反応液体クロマトグラフィーには、主に二つの方法が知られている。それらはカラムからの溶離液に適当な反応試薬を加え、目的成分を選択的に誘導体化して検出する方法、あるいは試料中にあらかじめ反応試薬を加えて反応させ、目的成分を高感度検出可能な誘導体に変えカラムに導入する方法である。前者はポストカラム誘導体化法、後者はプリカラム誘導体化法と呼ばれている。

前処理機能付きオートサンプラにこのプリカラム誘導体化法を適用すると、カラム外でのピークの広がりを最小に抑えることができる。また、誘導体化の時間が可能となり、反応時間の短縮および分析中に次の試料の前処理などが可能となり、高スループットの自動分析システムを組むことができる。

AS-4000形前処理機能付きオートサンプラを用いた二、三のプリカラム誘導体化法の応用例について述べる。

2. システムの概要

AS-4000形を含むプリカラム誘導体化自動分析システムの構成例を図1に示す。図2はAS-4000形インテリジェントオートサンプラの流路の概要を示すものである。洗浄液、試料、反応試薬などを吸入・吐出するためのシリンジ・インジェクションポート付きサンプリングバルブ、各バイアルおよびその間を動くニードル、洗浄ポートなどの機能を示している。

プリカラム誘導体化法では、試料と反応試薬を反応瓶に移し、反応後これをニードルから吸引して分離カラムに導入後、分析を行うことになる。

3. 9-フルオレニルメチルクロロホメートをラベル化剤とするアミノ酸の分析

アミノ酸のプレラベル化法にはO-フタルアルデヒド(以下、OPAと記す。)や9-フルオレニルメチルクロロホメー

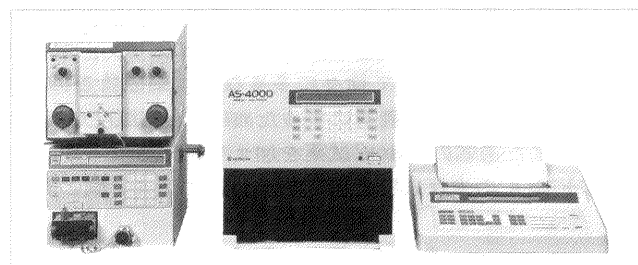


図1 システム構成例

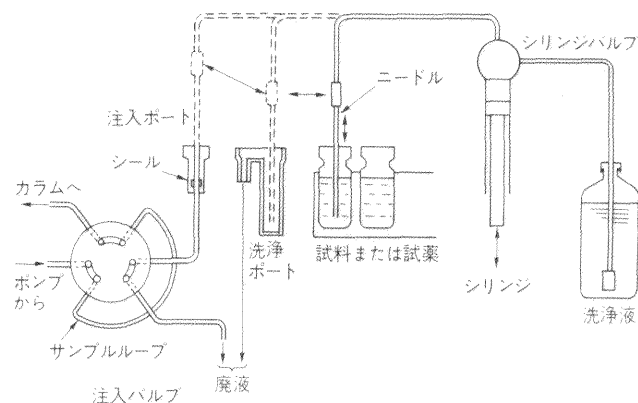


図2 AS-4000形の流路系

ト(以下、FMOCと記す。)などのラベル化法が知られている。後者は、1級アミノ酸と2級アミノ酸の両者に反応するため、より広い応用が期待できる。その反応を図3に示す。

3.1 システム構成と分析条件

システム構成は図4に示すように、送液ポンプには日立L-6200形インテリジェントポンプを、前処理および試料導入には日立AS-4000形インテリジェントオートサンプラを、カラムの保温には日立L-5020形カラムオーブンを、検出器

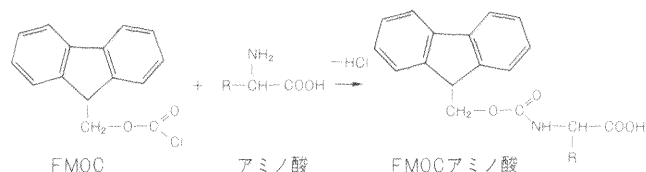


図3 FMOCアミノ酸の反応

* 株式会社 日立製作所 那珂工場 分析システム部

** 日立計測エンジニアリング株式会社 設計部

には日立F-1050形蛍光検出器を、データ処理には日立D-2500形データ処理装置を用いた。グラジエント分析条件を図5に示す。

3.2 試薬およびプレラベル化法

FMOC試薬はSIGMA社製、アミノ酸標準液は味の素社製、他は試薬特級およびHPLCグレードを用いた。FMOCアミノ酸のプレラベル化法は図6に示すように、AS-4000形インテリジェントオートサンブラを用いて行った。

3.3 反応温度の影響と有機溶媒抽出での妨害成分の除去

図7に反応温度でのアミノ酸と副産物の検出を示した。この測定では、リジン (Lys)、メチオニン (Met) およびアスパラギン酸 (Asp) を用いた。その結果、反応温度を上げると、それらのアミノ酸の検出は高くなる。しかし、副産物も40℃を起点として徐々に多くなる。副産物を抑え、アミノ酸の反応効率を最適にするために、反応温度を40℃とした。また過剰のFMOC試薬を加えて反応させるが、その際にFMOCの未反応物と副産物が目的のアミノ酸と重な

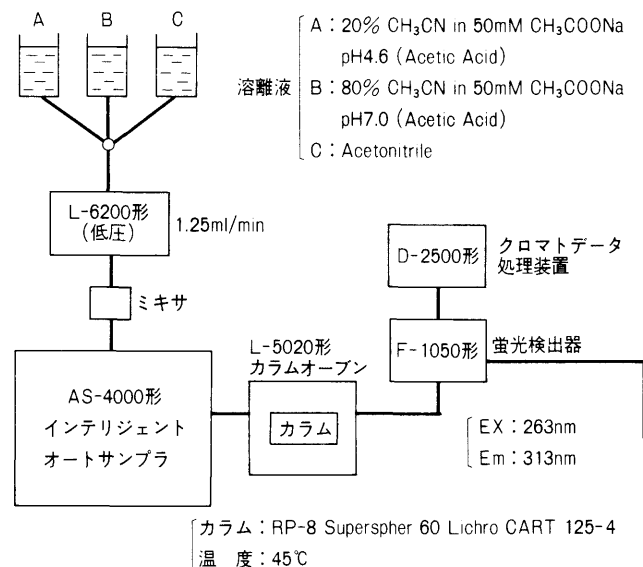


図4 FMOCアミノ酸分析システム構成

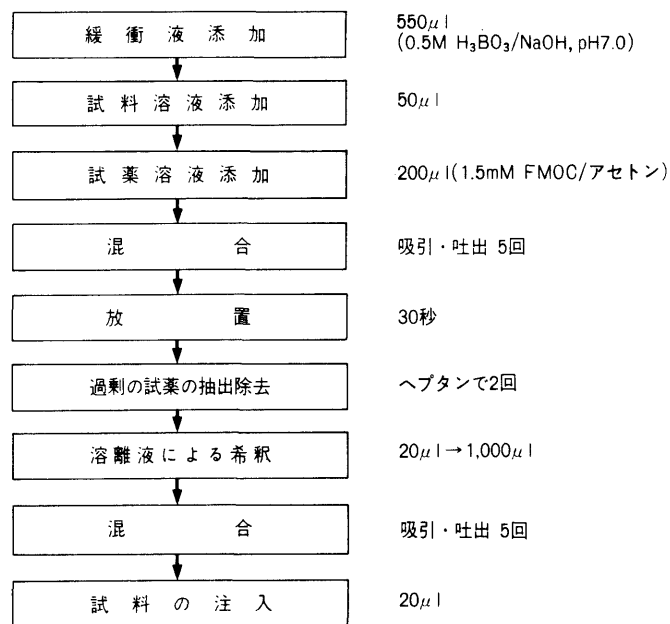


図6 FMOCアミノ酸のプレラベル化法

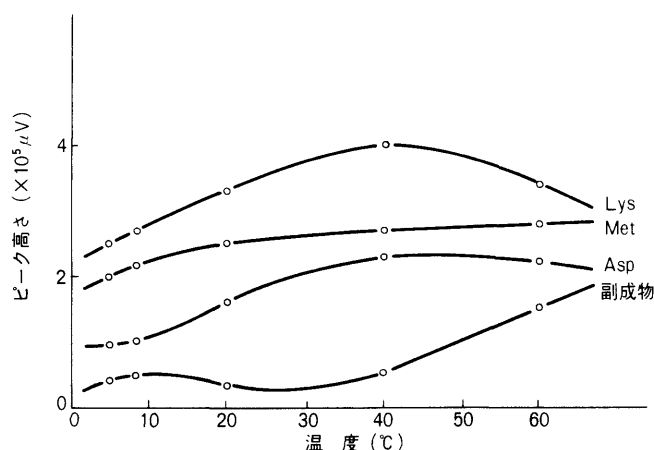


図7 反応温度でのアミノ酸と副産物の検出感度

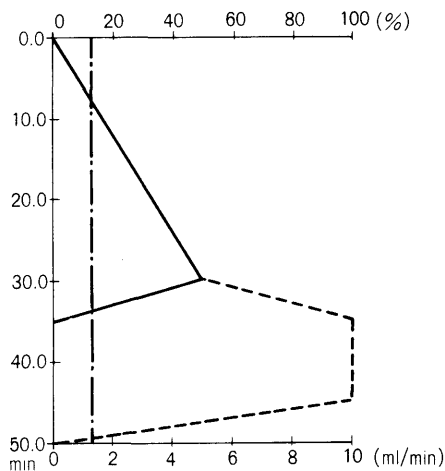


図5 FMOCアミノ酸のグラジエント分析条件

PROGRAM NO.=1

PRESSURE MAIN: MAX 200 MIN 1

TIME (min)	GRADIENT			FLOW(ml/min)
	%A	%B	%C	
0.0	100	0	0	1.250
30.0	50	50	0	
35.0	0	0	100	
45.0	0	0	100	
50.0	100	0	0	

— B%
 --- B+C%
 ···· FLOW (ml/min)

PROGRAM NO.=1

り、定量の妨害となる。したがって、その妨害物質を取り除くために、n-ヘプタンなどの有機溶媒で抽出を行う必要がある。図8に抽出回数による妨害成分の除去を示すクロマトグラムを示す。抽出なしでは、FMOCおよび副成分が多く溶出し、目的のアミノ酸成分と重なり定量の妨害となっているが、2回の溶媒抽出を行うことで目的のアミノ酸との分離も可能となる。

3.4 標準アミノ酸と実試料の測定例

標準アミノ酸分析例を図9に、動物血漿中のアミノ酸分析例を図10に示す。

4. 9-アンスリルジアゾメタンをラベル化剤とする脂肪酸の分析

9-アンスリルジアゾメタン(9-Anthryldiazomethane：以下、ADAMと記す。)は、図11に示すように脂肪酸と反応し、強い発蛍光性のエステルを生成する。生成したエステルの蛍光は、メタノールまたはアセトニトリル中では励起波長365 nm、蛍光波長410 nmの特性を持っている。この反応は、加熱を必要とせず約90分で完了する。反応の際の溶媒は、ほとんどの有機溶媒を用いることができるが、アルコール、アセトンのような極性の高い溶媒のほうがより速く反応が進行する。

4.1 システム構成と分析条件

システム構成は図12に示すように、送液ポンプには日立L-6000形ポンプを、前処理および試料導入は日立AS-4000形インテリジェントオートサンプラを検出器には日立F-1050形蛍光検出器を用いた。

4.2 試薬およびラベル化法

ADAM試薬はフナコシ薬品工業社製を、脂肪酸標準試料はガスクロ工業社製を、他は試薬特級およびHPLCグレードを用いた。脂肪酸とADAM試薬とのラベル化法は、図13に示すようにAS-4000形インテリジェントオートサンプラを用いた。

4.3 ラベル化の反応時間の影響とラベル化剤の経時変化

室温でのラベル化の反応時間とその検出を図14に示す。リノレン酸、リノール酸およびステアリン酸についてみると、約90分で完全反応が行われる。分析時間の短縮を図ることから、完全反応ではないが反応時間を10分間として測定を行った。

反応途中での試薬を導入する場合、再現性に影響を及ぼすがAS-4000形を使用することにより、前処理時間を一定に管理することができるため、再現性も比較的良好な結果が得られた。

ラベル化剤の経時変化について図15に示す。ADAM試薬の長寿命化を考え、電子冷熱ラックを用い4℃に保冷したが、酢酸エチル溶液にすると経時変化が顕著であったので、溶媒の検討を試みた結果、アセトン溶液が経時変化が少なく適した溶媒と考える。

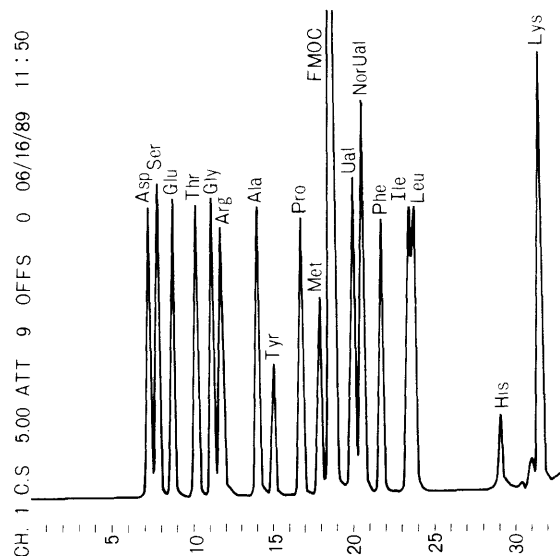


図9 標準アミノ酸の分析例

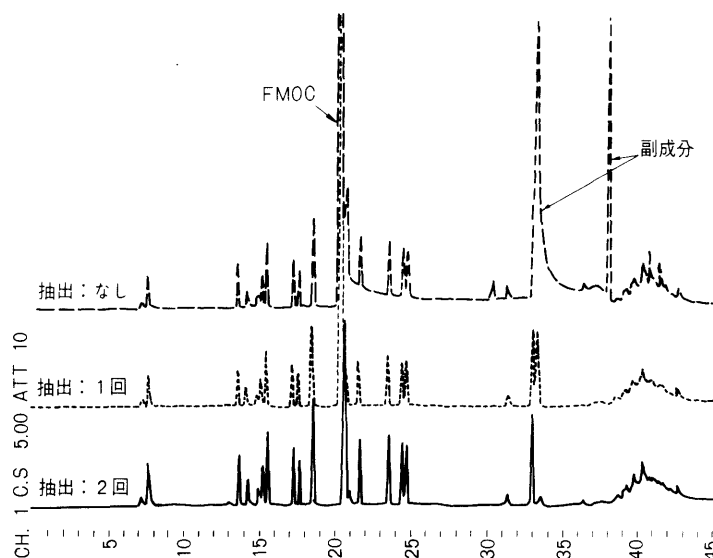


図8 溶媒抽出回数によるクロマトグラム

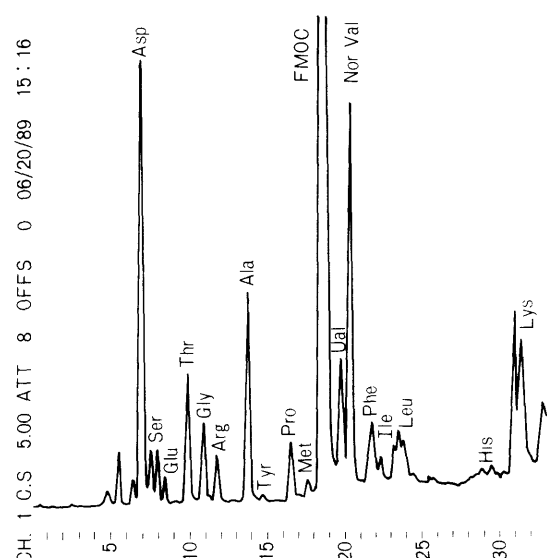


図10 動物(犬)血漿中のアミノ酸分析例

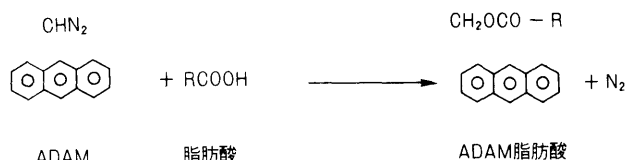


図11 ADAM脂肪酸の反応内容

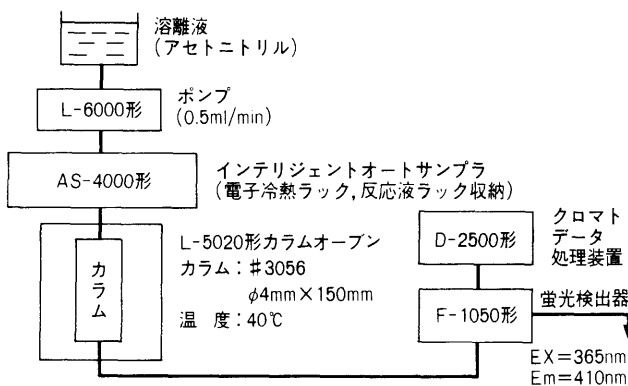
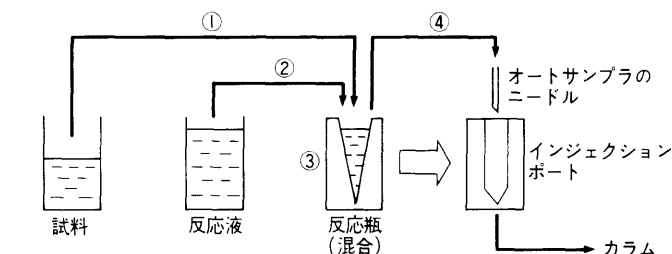


図12 システム構成



- 注：① 試料瓶から試料を70μl吸引し、反応瓶に50μl吐出する。
 ② 反応瓶から反応液を70μl吸引し、反応瓶に50μl吐出する。
 ③ 反応瓶から70μl吸引し、70μl吐出する混合を5回行う。
 ④ ③の終了後10分間反応させ、ラベル化した試料を反応瓶から10μlインジェクションポートへ注入し分析を開始する。

図13 ADAM脂肪酸のプレラベル化法

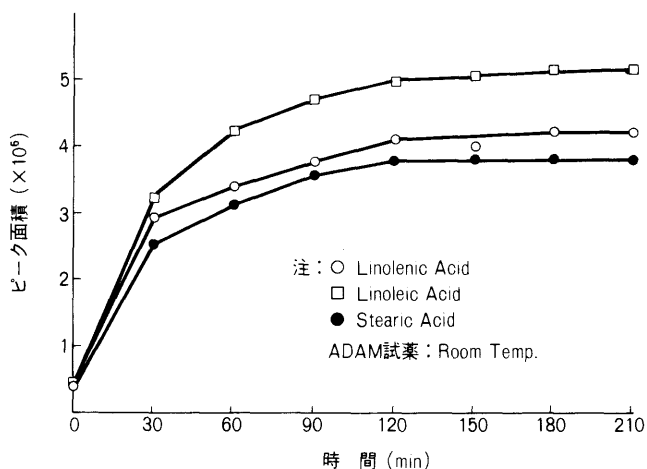


図14 ラベル化の反応時間の影響

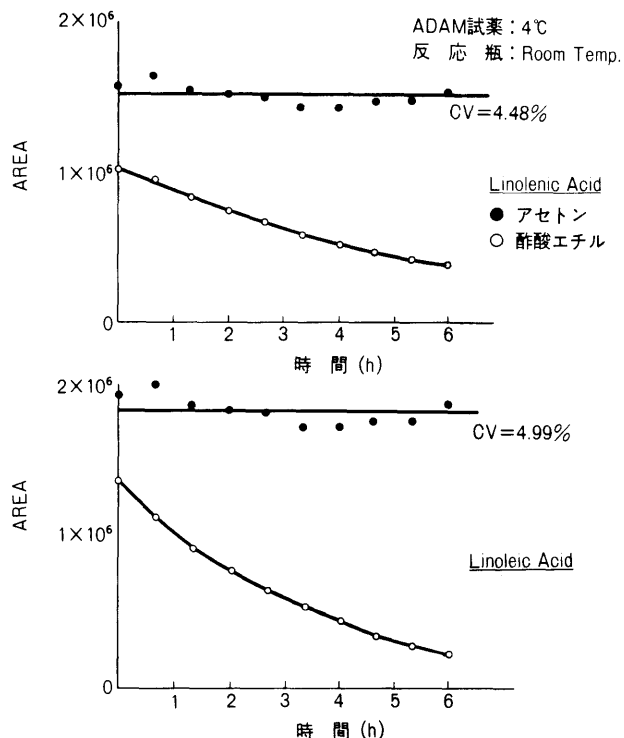
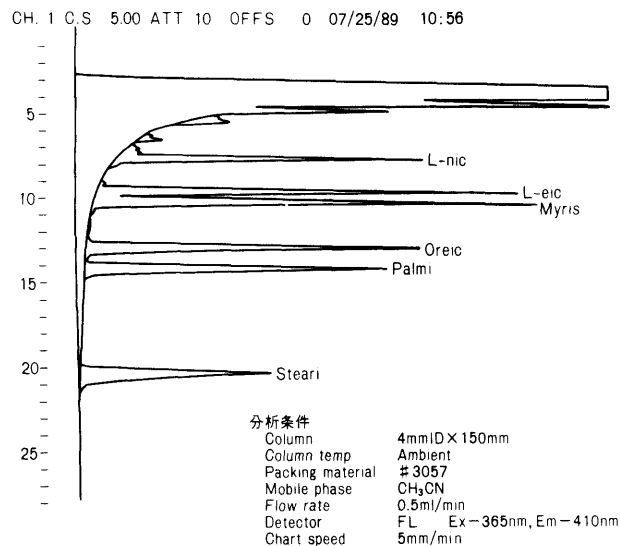


図15 ラベル化剤の経時変化



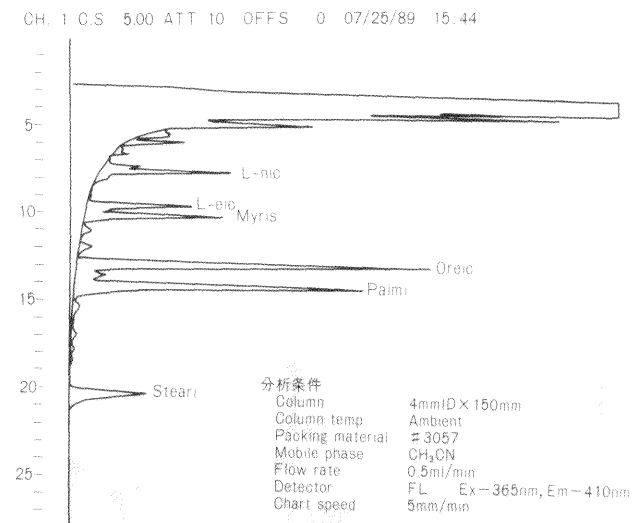
D-2500 07/25/89 10:56

METHOD: ADAM-FATTY A TAG 33 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	HEIGHT	AREA	ng	BC	NAME
4	3.960	993216	57515809	57.515	UU	
5	4.053	922683	8568257	8.568	UU	
6	4.333	993124	17807662	17.807	UU	
7	4.626	566771	53257064	53.257	UU	
9	5.493	84161	1506776	1.506	TUB	
14	7.613	566909	7785728	237.999	TUB	L-nic
17	9.533	785800	11812221	262.999	TUB	L-eic
18	10.146	819984	13101865	287.999	TUB	Myris
21	12.866	622698	11708702	249.999	TUB	Oreic
22	14.133	563866	11740650	249.999	TUB	Palmi
25	20.320	342983	10023455	250.000	TBB	Steari
TOTAL			7252195	204828189	1677.655	
PEAK REJ			1000000			
SF			1.000			
SAMP-AMT			1.000			

図16 標準脂肪酸の分析



D-2500 07/25/89 15:44

METHOD: ADAM-FATTY A TAG: 39 CH: 1

FILE 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE 1 CONC AREA

NO.	RT	HEIGHT	AREA	SS	BC	NAME
3	3.933	1001752	61408194	61.409	UU	
4	4.066	788411	7310774	7.310	UU	
5	4.293	890377	15223695	15.223	UU	
6	4.840	442978	37386168	37.386	UU	
9	5.893	99394	1066663	1.066	TBB	L-nic
14	7.586	231456	3647076	111.486	TUB	L-eic
17	9.560	187092	3246084	72.274	TBU	Myris
18	10.160	245432	4054180	89.117	TUU	Oreic
21	12.880	643223	12202140	260.535	TBU	
22	13.586	52852	1037832	1.037	TUU	
23	14.146	522511	11160104	237.638	TUU	Palmi
27	20.306	131406	3873987	96.623	TBB	Steari
TOTAL		5236884	161617897	991.109		
PEAK REJ		1000000				
SF		1.000				
SAMP-AMT		1.000				

図17 バター中の脂肪酸の分析

4.4 標準脂肪酸と実試料の測定例

標準脂肪酸の分析例を図16に、バター中の脂肪酸の分析例を図17に示す。

5. おわりに

AS-4000形インテリジェントオートサンプラの種々の機能の中で、試料の計量、試薬の添加、混合、反応、抽出、希釈などを行って、HPLCにラベル化した試料を導入した内容について報告した。

全自動の形でプリカラム誘導体化を行わせることは、短時間で微量成分を選択的かつ高感度に測定することが可能となり、スループットを高めた分析手法であり、有用な分析システムであると考えられる。

最終的には汎（はん）用液体クロマトグラフユニットから成るシステムであっても、使われ方としては、目的に応じた専用システムとして用いられ、その中でAS-4000形が、ユーザーごとに固定されたプログラムで使用されることがねらいとしている。

参考文献

- 1) Betner, Föedi: Chromatographia 22, 381~387 (1986)
- 2) 平田, 外: HITACHI SI NEWS '89, VOL. 32 No.4, 28~31
- 3) 横倉, 外: 第7回液体クロマトグラフィー春季討論会講演要旨集, May-June, 1990
- 4) 平田, 外: 第24回HPLC研究談話会要旨集(平成元年8月29日・30日)

Topics

第7回 液体クロマトグラフィー 春季討論会 開催さる



5月31日、6月1日の2日間、大洗文化センターで「第7回液体クロマトグラフィー春季討論会」が開催された。今回の主題は「バイオサイエンス領域におけるLC-基礎と応用」で、特別講義2件、講演19件、ポスター発表10件が行われた。参加者は当初予想を大幅に超える230人で、討論や質問も具体的かつ高度な内容で活発に行われた。

日立グループからは、特別講義を高田副技師長が「電気化学検出器とその応用」のほか、「糖の高速・高感度分析」、「神経芽細胞腫スクリーニングにおけるクレアチニンの同時分析」、「アミノ酸のプレラベル（FMOC法）による自動分析」、「GELPAC充てん剤の親水性側鎖の影響」についてそれぞれ報告した。

31日夕方、太平洋に面したレストラ

ン「マリーン」で懇親会が開かれ、約90人が参加、薄暮の荒波と魚料理を楽しみながら、クロマトの討論に熱中する姿があちこちにみられた。

思えば1970年10人ほどの液クロの同志が集まって始められた同好会が、10年後の秋から東京では討論会に発展し、昨年は10回を記念して国際会議が開かれ約700人の参加を見た。1984年からは春季討論会が各地で開かれるようになり、今年はその7回目に当たる。毎年発表申込みや参加者が増え、今年200人を超える盛況さとなった。また同時に行われたカタログ展示コーナーも30社が参加、分離カラムや新製品などの情報交換の場となり好評であった。

(鷹野重威 記)

ザイメイト ラボオートメーション システム — 自動化の考え方 —

Zymate Laboratory Automation System — How to Automate Your Sample Preparation —

橋本 英世*

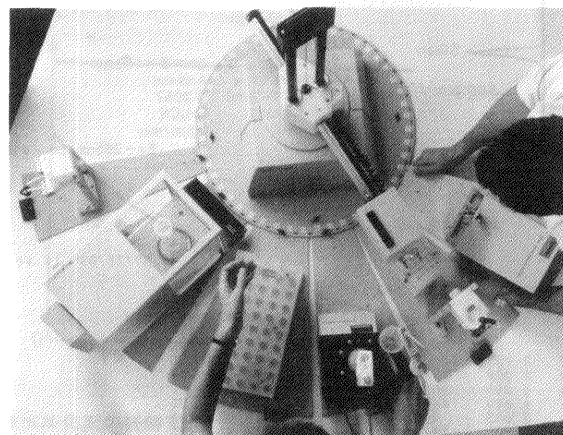
(平成2年5月31日受理)

1. はじめに

産業構造の変化に伴い製造業では人材の確保が難しい時代になっている。しかも、厳しい企業間競争に勝ち抜いていくためには、常に他社よりも優れた品質の製品を供給し、新製品を開発することが不可欠である。現在多くの分野で日本製品の品質の高さは世界のトップレベルにあるが、その陰には種々に工夫されたFA（自動化装置）の活躍がある。FAは成長期に入っており、人的な補助なし（省人化）の完全自動化が実現されているが、化学分析を行う研究者には今まで省力化のためのFAが提供されなかった。新製品を1日でも早く市場に出す役目を担っている研究所では、製品の安全性、安定性および耐久性の評価のための分析に、膨大な時間が費やされている。それらをより効果的に進めるために、各種のコンピュータが駆使されているが、研究者の物理的動作を補助する自動化は遅れている。FAはあらかじめ決められた作業を繰り返し、大量に処理することを目指している。LA（研究分析部門での自動化）は、研究者の種々のニーズに対応できるフレキシブルオートメーションが求められている。ザイメイト ラボオートメーション システム（ザイメイト システム）は複数の手順を実行するために、ユーザーが独自にプログラムの作成ができ、改良、変更が自由に行えるフレキシブル オートメーション システムである。

2. 自動化の範囲

図1は分析手法の工程を示したものであるが、まず各ブロック間のインタフェースが、現在手持ちの装置で可能かどうかを検討する。ザイマーク社はザイメイトシステムをはじめとする自動化装置の専門メーカーであり、分析装置やデータ処理装置を製造していない。したがって、いかにして他社の装置とインタフェースするかという点にさまざまな工夫がなされているが、ケースによっては組み合わせる装置の改造が必要となる。特に分析計との組み合わせではデータに影響する場合があるので装置メーカーとの共同作業が不可欠となる。次に前処理工程の中身の検討に移るが、一気に完全自動化をねらわないことである。ある程度工夫をして、そのステップの自動化を図ることは必要であるが、使用経験のない新しい製品や技術を採用した場合、そのステップを評価するために多大な労力と時間が必要となる。往々そのステップがウイークポイントとなり、本来生産性を上げるべきはずのものが逆効果となる。使用経験



ZP-100 ザイメイトパイテクノロジーシステム



図1 分析手法の工程

のないものを多く使用すると、分析結果の評価を行う場合に問題点の追及が難しい。使用する技術はまず現行の用手法に基づいて行い、評価が終わってから順次改良することが望ましい。図2は前処理工程のフローを示しているが、前処理工程の自動化を考えた場合、原料の状態を川上と表現するならば川下、すなわち分析計に導入する状態から川上にさかのぼるように自動化を考えるのが早期実現の要（かなめ）である。試料形態別の自動化例では液体、軽粘度の液体、スプレー容器に入った液体、練り歯磨きのようなペースト状のもの、粉体試料の実施例がある。ザイメイト システムと分光光度計の組み合わせ例を図3に示す。

3. 仕様と許容度

現在のLAロボットは処理スピードや精度の点で人間よりも劣っている。しかし、適切な条件のもとで働かせると研究者が不在のときでも絶え間なく動くことにより、計画された仕事量を着実にこなす。この適切な条件とは要求する仕様および精度が名人芸やチャンピオン データでなく、実用上十分なレベルに設定することである。

4. 処理検体数

通常、分析の前処理は数ステップ以上の何らかの処理が必要とされている。代表的な処理所要時間は5分/サンプル

* 日立産業株式会社 科学機器営業本部 輸入部

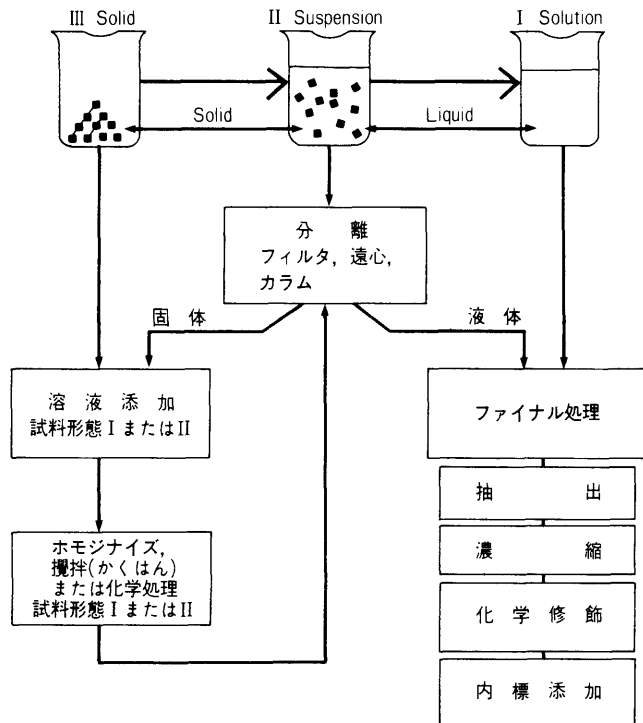


図2 試料形態とその処理

表1 HPLC自動化システムロボット法と用手法の比較
(エスエス製薬 山上¹⁾)

保存条件	ロボット		用手法	
	測定平均値 (%)	CV値 (%)	測定平均値 (%)	CV値 (%)
室温	108.1	1.3	108.7	0.6
40° 75%	104.1	0.8	105.4	0.8
平均	—	1.1	—	0.7

(b) 分析時間の比較

	ロボット		用手法	
	分析者の実働時間	稼働時間	分析者の実働時間	稼働時間
1. 錠剤の粉碎	1時間(用手法)	1時間	1時間	1時間
2. 試料採取 + 抽出	30分	8時間	8時間	4時間
3. 測定時間	0分	0時間	10分	3時間
4. 計算時間	5分	1分	1時間	1時間
合計時間	約1.5時間	約9時間	約6時間	9時間

注：試料延本数：9本

(標準品の分析：3本)

ル～30分/サンプルで、1日の処理可能検体数は48～288サンプル/日となる。検体数が多い場合に問題となるのが、処理すべき原サンプルや処理されたサンプルを置くスペースと組み合わせる分析所要時間である。まずスペースの問題であるが、原サンプルを事前にセットする場合とベルトコンベヤーや補助ロボットなどを使って行うケースが考えられる。事前にセットする場合には、前処理操作に使用す

表2 ICP自動化システムロボット法と用手法の比較
(東亜燃料 水野²⁾)

(a) 繰返し精度

	理論値 (wt%)	測定平均値 (wt%)	測定値のふれ幅 (Max.-Min.)	繰返し精度 (CV%)
Ca	0.045	L 0.045	0.001	2.1
		M 0.046	0.002	4.0
Zn	0.045	L 0.045	0.001	1.3
		M 0.046	0.002	1.1
P	0.045	L 0.045	0.002	1.8
		M 0.047	0.003	2.4
Mg	0.045	L 0.046	0.002	1.6
		M 0.046	0.001	1.0
(11元素) 平均	—	—	0.002	2.0
M	—	—	0.002	1.6

注：測定回数(6回), L(ロボット), M(マニュアル)

(b) 省力効果

作業内容	ロボット		マニュアル
	分析者の実働時間	稼働時間	分析者の実働時間
1. 試料採取 + 溶剤混合	25分	2時間45分	1時間
2. 測定時間	5分	5時間	5時間
3. 計算時間	0(自動)	0(自動)	4時間
合計時間	30分	7時間45分	10時間

注：試料数(20本)

るアクセサリを置くスペースを確定した後、ラックのスペースからセットできる容器数を検討する。ザイメイトシステムの場合、ラックを含めてすべての標準アクセサリが所定のプレートにマウントされ、占有するスペース、セットできる容器量がわかっているので計算が容易である(バイテクノロジー：図3)。2層式多段ラックもあるので、スペースを2倍活用できる。前処理後のサンプルは、そのサンプルを残す場合と、廃棄する場合によってスペースに大きな差がでる。サンプルを分析計に導入した後、再分析する場合に備えてLCバイアルに移し、小形の多段形温度制御ラックに保存し、前処理に使用したテストチューブを廃棄(図3 Disposal)すれば、省スペース化が図れる。分析時間がかかる場合には、複数の分析計を組み合わせるが、設置スペースを省くためにロボット部の下に分析計を設置する。

5. 前処理時間-シリアル法とバッチ法

通常用手法ではバッチ法が採用されているが、LAロボットでは、システムを小形化するためにシリアル法を採用している。単位操作時間の長い操作でやむを得ない場合、例えばインキュベート、シェーカー、遠心機などはバッチ法で行う。シリアル法のメリットはサンプルの処理時間が均一であり、同じ履歴で前処理/分析される。バッチ法は、多くの分析計が一度に一検体しか分析できないシリアル法の装置なので、1番目のサンプルと100番目のサンプルでは保存する間の濃縮など履歴の異なったものとなる。表3に

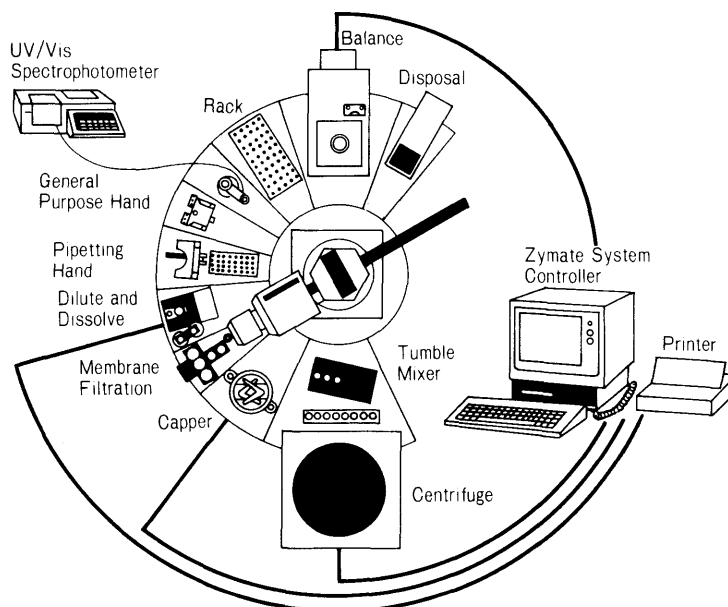
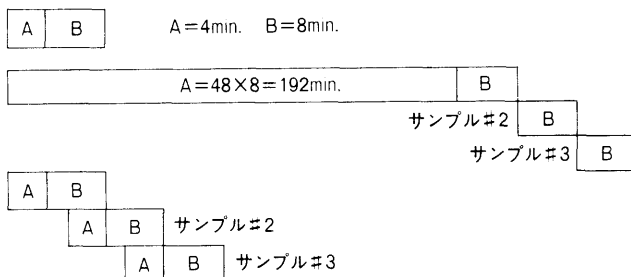


図3 ザイメイト パイ テクノロジー システム



	シリアル	バッチ
最初に処理された試料	12分	200分
最後に処理された試料	388分	576分

図4 HPLC前処理でのシリアル法 vs. バッチ法

クエーカー オーツ社の研究者³⁾が行ったHPLCの前処理(秤量, 混合, 濾過, HPLC注入)での両法の比較を示す。

6. 人間法とロボット法

ロスアンジェルスで開かれたオリンピックの開会式で、背中に小形ロケットを背負った人間がグラウンドに舞い降りる場面があった。空を飛ぶ鳥と上記のロケットとは目的は同じでも方法は異なっている。人間にとってメスフラスコを使った計量法は容易で、繰り返し精度も高いがロボットで液量の調節やレベル検知は得意ではなく、天びんを組み合わせた重量法のほうが容易かつ正確である。現在の各種試験法は人間が取り扱いやすい液量で定めてある。ロボット法では液量が少ないほうが容器、装置のスペース、可搬質量(1.3kgまで)の面で取り扱いやすい。用手法からロボット法に替える場合、スケールの変更や、単に人間が行っている動作を「まねる」のではなく、視点を変える必要がある。

表3 シリアル法 vs. バッチ法

	シリアル法	バッチ法
最初に処理された試料	38分	136分
最後に処理された試料	203分	301分
アベレージ	17分	25分
マグネティックスターラの数	1個	12個

7. エラーとセンサ

人間が無気なく行っている操作の中には、経験に基づいた視覚などによる確認がなされている。現状のシステムは用手法とロボット法に置き換えただけでは必ずエラー(不確実な動作)が起こる。例えば、使用する容器、ピペットチップ、ミニカラム、メンブレン フィルターなど製作精度はロボットと組み合わせることを考慮していないため、ばらつきが大きくエラーの原因となる。また、容器の損傷の有無、強度の不十分なものなど人間なら問題とならない点である。簡単なことは光学センサ、マイクロスイッチで確認を行うが、洗浄後のコンタミネーションのチェックなど難しいことは現象の物性的な性質を利用した分光光度計などの計測器や分析計を使用する。

サンプルの並べ替えなどの人的エラーをなくするためには、サンプルIDを付けるのにバーコード ラベルやインクジェット プリンタを組み合わせる。最近、電子天びんは取り扱いが容易になり、小形で組み込みも容易なことから試料の処理過程を重量法による精度の向上と操作のセンサ機能・評価の面から重要視されている。

8. 他の装置との組み合わせ

他の装置と組み合わせた場合、装置の制御や同期をプログラムレベルに組み込む必要がある。ザイメイト システムにはパワー アンド イベント コントローラがあり、TTLレベルの入力、外部スイッチやAC100Vの可変・ON・OFF、1mV~2VのA/D変換機能が装備されているので、容易に

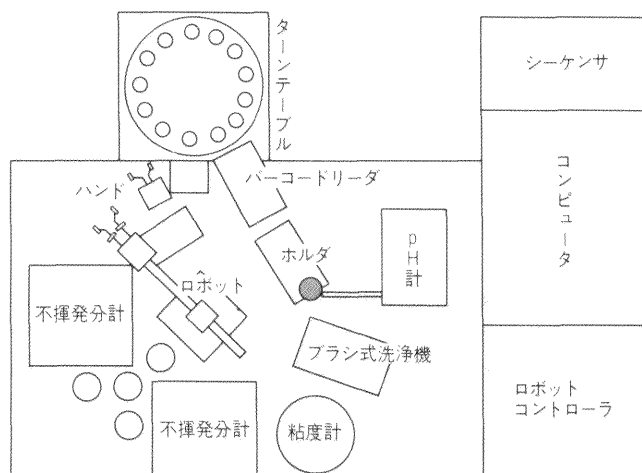


図5 液状樹脂の自動分析システム
(三井東圧 藤巻⁴⁾)

表4 精度比較 (三井東圧 藤巻⁴⁾)

製品名	分析精度 (n=6) 繰返し	粘度 (cP)		不揮発分 (%)	
		自動分析計	手分析	自動分析計	手分析
A	平均値	149.0	148.0	48.0	48.1
	標準偏差(σ)	1.2	1.9	0.11	0.08
	CV (%)	0.8	1.3	0.2	0.2
B	平均値	650	658	43.9	44.1
	標準偏差(σ)	13.1	11.6	0.16	0.14
	CV (%)	2.0	1.8	0.4	0.3
C	平均値	2,450	2,370	40.2	40.0
	標準偏差(σ)	60	49	0.14	0.15
	CV (%)	2.4	2.1	0.4	0.4

各種装置の制御、同期、適正レベルのモニタが可能である。また、組み合わせ例の多いものには専用のI/F(インタフェース)ボードを作りCRT上でプログラム言語を作成することができる。I/Fには各種電子天びん、KF滴定、GC、UV/VIS、引張り試験機などがあり、特別注文もできる。パーソナルコンピュータ(以下、パソコンと略す。)との組み合わせにはリモートコンピュータI/Fがある。既納システムの80%が日本製パソコンと接続され、日本語によるデータ処理、レポート作成やザイメイトロボットの操作を担っている。

9. 結言

図6は分析で得られたデータを評価・判断・制御機能を付加したシステムである。分析で得られた標準サンプルと測定サンプルを比較・評価し、悪いデータが得られたときに適切なフィードバックを行い、再処理、再分析および機器の状態のモニタや変更などを実行しようというシステムである。現在、人間が担っている判断機能、診断機能を付加することによって、グレードの高いトータルLAシステムとなり、省力化から省人化できるシステムになる。

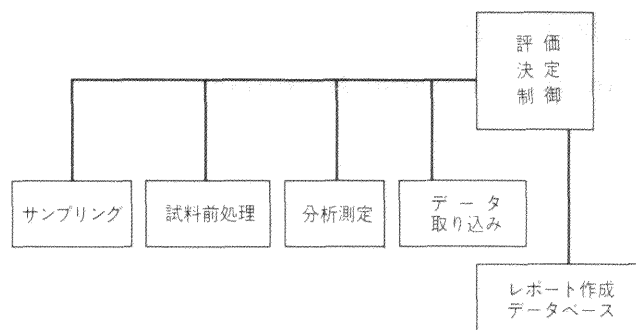


図6 ザイメイト LA コンセプト

ザイメイト LA講習会のご案内

日製産業(株)科学機器営業本部

拝啓 時下ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。
弊社取扱製品に特別のご愛顧を賜り厚く御礼申し上げます。弊社では、LAインハウスセミナーを下記の要項で定期的に開催しています。ラボの自動化を模索されている皆様のご参加をお待ちしております。

1. 半日コース：無料

場所：日製産業（西新橋三井ビル）及び 日製ソフトウェア（和歌山10ビル）

時間：13:00-17:00（毎月1回開催。）

定員：各回 10名（1名から実施）

内容：ザイメイトLAの考え方、如何にしてLAに繋がり得るか
LAの現状：ザイメイトLAに何ができるか？
ユーザーの実施例
実機デモ：ザイメイトシステム
Q & A：貴方の作業は自動化できるか？

2. 1日コース：有料（10万円）

場所：日製産業（西新橋三井ビル）及び 日製ソフトウェア（和歌山10ビル）

時間：9:30-17:00（毎月1回開催、2日間。）

定員：各回 2名（1名から実施）

内容：1日目：上記半日コース + システムの概要
2日目：プログラム作成 及び 実機運転
講師：日製ソフトウェア LA技術部長、科学機器輸入部 橋本

3. ユーザーコース：有料（5万円）

場所：日製ソフトウェア（和歌山10ビル）

時間：9:30-17:00（毎月1回開催。）

定員：各回 2名（1名から実施）

内容：プログラム作成 及び 実機運転
講師：日製ソフトウェア LA技術部長

※休職コース、ユーザーコースを合わせて定員2名と致します。

問合せ先及申込先：日製産業 科学機器輸入部 橋本宛 03-504-7261

199 年 月 日

ザイメイト LA講習会申込書

勤務先：	1. コース：() 半日2-1, () 休職2-1
ご所属：	() ユーザーコース
勤務先住所：	2. 参加日
	() 9月 6日 () 12月 6日
ご芳名：	() 10月 4日 () 191年1月24日
電話番号：	() 11月 8日 () 191年2月 7日
弊社営業員名(又は特約店)：	
全て本曜日です。休職コースは木、金曜日に行ないます。ユーザーコースは金曜日に行ないます。	

参考文献

- 山下義己, 他: 複合ビタミン剤中のチアミンの定量, 第4回LAロボットシンポジウム (1989年7月)
- 水野 康, 他: ラボラトリーロボットによるICP発光分光分析の自動化システム, 第3回LAロボットシンポジウム (1988年3月)
- J. Edris: A Serialized Procedure for Automated Preparation and HPLC Injection of Cereal Samples. Zymark Laboratory Automation News Letter Vol.1, No.4, 1985
- 藤巻享司, 他: 液状樹脂の自動分析システム, 第4回LAロボットシンポジウム, 1989年7月

臨床用自動分析装置

Clinical Chemical Analyzer

小澤 恭一*

(平成2年6月2日受理)

1. フロー方式による自動化の夜明け

臨床生化学検査の自動化¹⁾はフロー方式の自動分析装置の開発、製品化によって始まったといってもよい。Skeggs²⁾は流れの中に気泡を入れるという、今なら当前に感じるかも知れないが、当時としては非凡なアイデアで実用に耐えられるものを作った。普通に考えると、1本の管の中を次々と異なった検体を流して、前検体の影響を受けないデータを得ることなど、至難の業(わざ)とみるものではないだろうか。これを流れに気泡を入れることで乗り越え、しかも、それによって攪拌(かくはん)の効果も得るというアイデアと、それを企業化した技術力が、現在の臨床化学分析の自動化のきっかけを作ったのである。

2. ディスクリート方式の台頭と自動分析装置の普及

臨床検査の自動化がフロー方式によって始まったのは事実としても、古い特許などを調べてみるとかなり早くからディスクリート方式(個々の検体を個々の項目ごとに別々

の容器の中で反応させ測定する方式)での自動化の考案がなされているのを見ることができる。このような用手法での分析の手順を、そのまま自動化しようとする試みは思い付きやすいし、また、理解しやすいものであったのであろう。自動分析装置の変遷のあらましを表1に示す。1970年ごろになって、フロー方式の多項目同時測定装置が発表されるようになると、ディスクリート方式でも複数の多項目同時測定装置が市販されるに至って、普及期に入った。ディスクリート方式のあらまきは次のようなものである。ピペットの先のような部分(プローブ)で検体を吸い、反応容器に中へ吐出する。次いで、試薬が混合されて、反応のため一定温度(普通37℃)に一定時間保たれ、光度計で測光される。これらの動作は、用手法による手順とほとんど同じであるが、装置が実行するために時間など正確となり、信頼度の高いデータを得ることができる。また、その中で検体の取り違いが起きることはない。

表1 自動化学分析装置の変遷

	時 期	代表的機種	主 な 仕 様			特 徴	トピック
			項 目 数	反応液量 (ml)	分 析 時		
第一世代	1950~1965 導入期	ユニカム テクニコンAAなど	1~	数ミリリットル	30	とにかく自動化	フロー方式
第二世代	1970頃 普及期	日立400 500形 SMA 12 60など	2~12	3~5	120~720	多項目化 微量化	ディスクリート方式 の台頭
第三世代 前期	1975前後 実用期	日立716, 706D SMAC セントリフィケム デュボン aca など	6~20	1~3	120~3,000	多項目化 微量化 マイクロコンピュータ導入 大型と小型への 2極化	遠心方式 バック方式
第三世代 後期	1970年代末	日立 726 SMAC	12~30	1~2	120~3,000	さらに多項目化 CRT ドットブリタ ID	電極
第四世代	1980年代 前半	日立 705 日立 736 コダックエクタクム	16~35	0.1~1	180~ 10,500	多項目、高速 微量化 全反応過程測光	ドライケミストリー
	後半	日立 7050 日立 7150 日立 7250	20+3 32+3 32+3	0.3	180~ 600		免疫専用機
				0.25~0.4	2,400+電解質 ただし最高 600検体/時		各種バック方式
		日立 7450	40+3		9,600+電解質 ただし最高 600検体/時		
?	今後	---					

* 株式会社 日立製作所 那珂工場

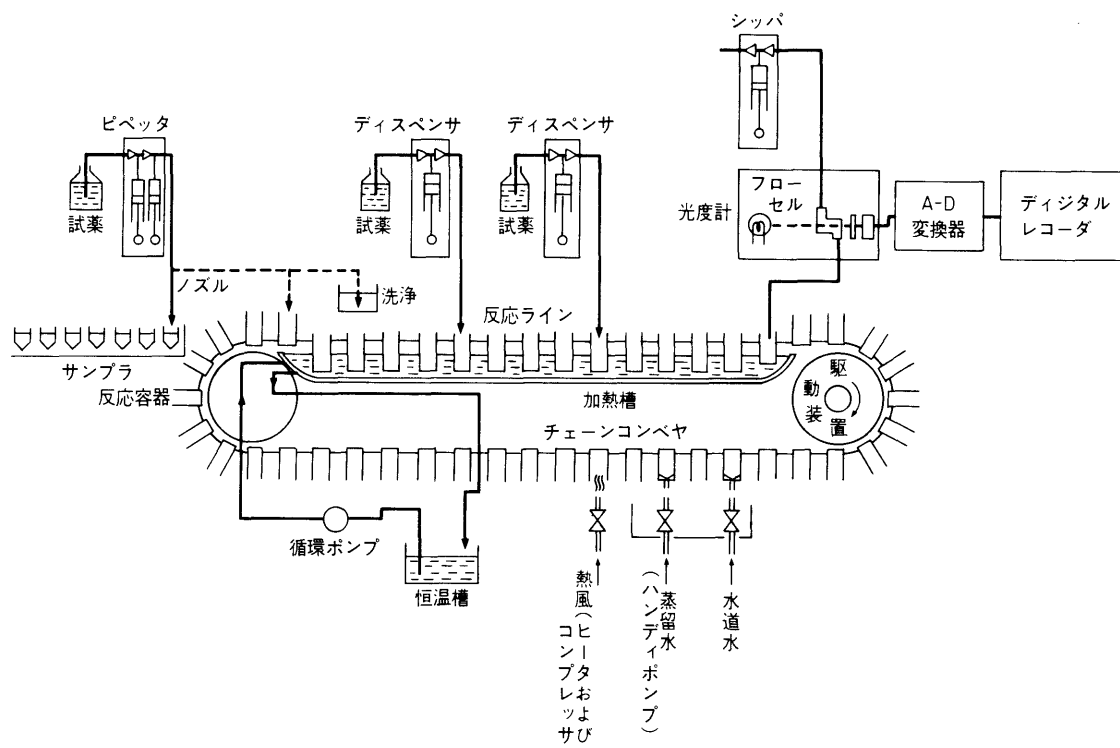


図1 ディスクリット方式の自動分析装置の例（日立400形）

当時の代表的なディスクリット方式であった日立400形のダイアグラムを図1に示す。

3. 多項目、微量化への努力

ところで、今こそディスクリット方式の自動分析装置は確立した自動化装置のようにみえるが、その開発の道程には多難なものがあつた。例えば、検体の量り取りに用いるピペッタ、試薬の添加に用いるディスペンサなどでも、詳細は省くがシリンジの構造、切り替え弁の形式、それらの材料などととも、それらの接続方法にもいろいろの試みと、取捨選択があつた結果、現在の正確度、精密度と十分な機能性を兼ね備えるものとなつたのである。さまざまな試みのあと、現在では攪拌棒によるものが多く用いられている。

制御方式とデータ処理に関する発達は最も目覚ましいものと言えよう。これはひとえにマイクロコンピュータの進歩によるものである。1975年前後に発表された装置716形に初めてマイクロコンピュータが組み込まれ、これまでのカムとマイクロスイッチ、リレーなどによって組み上げられた頭の固いシーケンサから一変して、きめ細かな柔軟性のあるプログラムによって制御できるものとなつた。

表1には仮に世代を分けて変遷を眺めてみたが、総括してみると、全体としては多項目化と微量化、それに使い勝手向上への道程であつたと言える。そして、第二世代はそれの始まり、第三世代はマイクロコンピュータの導入による多機能化、第四世代は全反応過程測光方式（後述）の採用による高効率化、という大きな変化があつたと言えよう。

4. 技術の変遷

図2に上述の技術をも含めて、これらの技術の主な変遷をまとめてみた。

まずあげられるのは、光度計の進歩である。古くは光学的フィルタを用いたフィルタ光度計であつたが、すぐ回折格子が採用され、現在では凹面回折格子となり、単純でも性能の良い光度計が得られるようになった。分光光度計はその名が示すように、光を分光したあと、必要な波長の光を選んで被測定物にあて、光の吸収の度合いを測定するものであつた。最近では分光する前の白いままの光を被測定物に当て、光がそれを通り過ぎてから回折格子に導いて分光するものが多い。検知器では複数個（普通十数個程度）用意してあり、それぞれ特定の波長の光の場所にセットしてある。必要な波長の信号を選ぶには、コンピュータによって相当する検知器を選択する。これは、いうなれば後分光方式と呼ぶことができる光度計（多数の波長のデータを同時に得ることができるので、多波長光度計とも呼ぶ。また、後分光方式に対し従来の光度計の方式を前分光方式と呼ぶことがある。）となっている。

この方式によれば、反応済みの液を光度計のフローセルに導いて測光するという手続きを用いないで、反応容器そのものを光度計の光路中で直接に測定する直接測光方式をとることができ、フローセルを用いることによって生じるキャリーオーバーを避けることができる。また、測定波長の選択をまったくメカの介入（前分光方式ならば、機械的にミラーやプリズムなど、分光素子を動かす必要がある。）なし

技 術		旧	新
光 度 計		フィルタ光度計	分光光度計(回折格子)
		フローセル	直接測光(多波長光度計)
制 御		カム、マイクロスイッチ、リレーなどによるシーケンサ	回路による制御
			マイクロコンピュータ
ピペッタなどの駆動	動力	シンクロナスマータ	空気圧
	液量	カムとねじ	ブロック
試 薬 添 加		デイスベンサ	ピペッタ
		キャタピラ(洗浄乾燥)	ディスク(洗浄だけ)
測 定 法	測光	エンドポイントだけ	エンドポイントレートアッセイ(長) (全反応過程測光)
	化学	水溶液	電極 ドライケミストリ

図2 自動分析装置での技術変遷

にまったく電氣的に行うことができるので、きわめてコンピュータとの相性のよい光度計ということができる。

この光度計を用いて、シングルライン マルチアナリシス(ディスクリット方式による、一つのラインで多項目の分析を空間的、時間的むだなく処理する方式)による自動分析装置706D形を社会に送り出すことができた。以後の装置には、すべてこの形式の光度計が使われている。メカの動作の制御については上に述べた。

ピペッタ、デイスベンサの構造機能については、ここでは詳しくは触れないが、装置の精度に直接関係する部分であり、その開発、改良には非常な努力が払われたものであること、これもまたマイクロコンピュータの発達によって助けられたことは言うまでもない。

当初、反応ラインには、キャタピラ式で上下に反応容器が回転するものが用いられた(400形など：図1参照)。現在では、平面上に回転する円盤形式(ディスク)のものが用いられている(705形以降)。これは、次に述べる全反応過程測光方式に、多波長光度計を直接測光方式で用いて有効である。7150形の動作原理図を図3に示す。

従来の測光方式(図4(a))では、光度計は反応ラインのほぼ終点に位置し、一定時間反応させた後の反応液の吸光度または吸光度の変化率を測定していた。全反応過程測光方式(同図(b))の構造はこのままで、検体が反応容器に吐出されるごとに、ディスクは1周と1容器分進む(同図(a))の場合は、1容器分だけしか進まない。この動作によって、各検体吐出ごとにディスク上の全反応容器の吸光度が測定できることとなり、例えば736形の場合、12秒ごとに検体を吐出(300検体/時)し、反応時間が10分ならば、反応時間中に50点の測光ができることになる。これによってレートアッセイ時の測光時間をきわめて長くすることができるほか、第2試薬添加前の吸光度と、第2試薬添加後一定時間

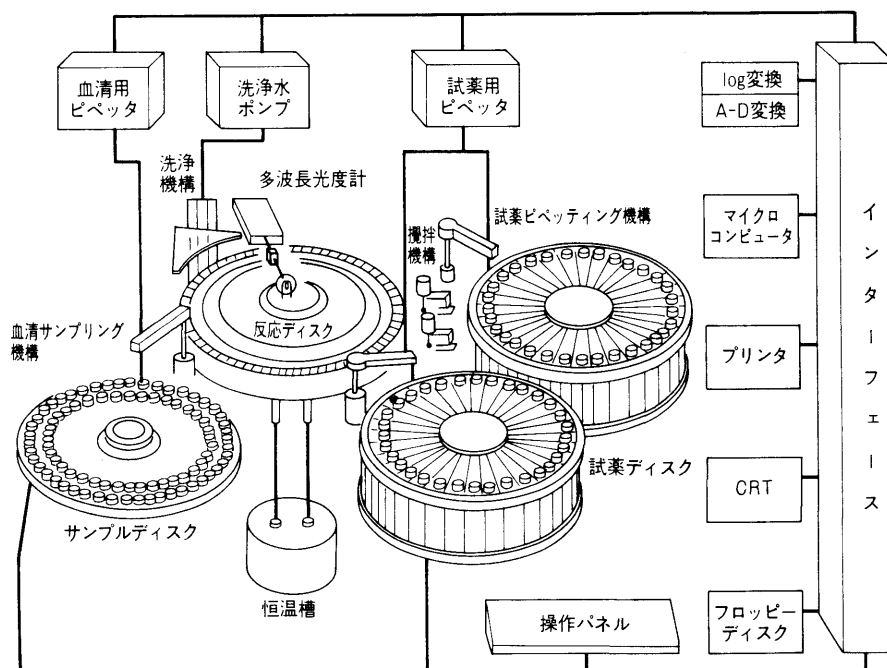


図3 7150形の動作原理図

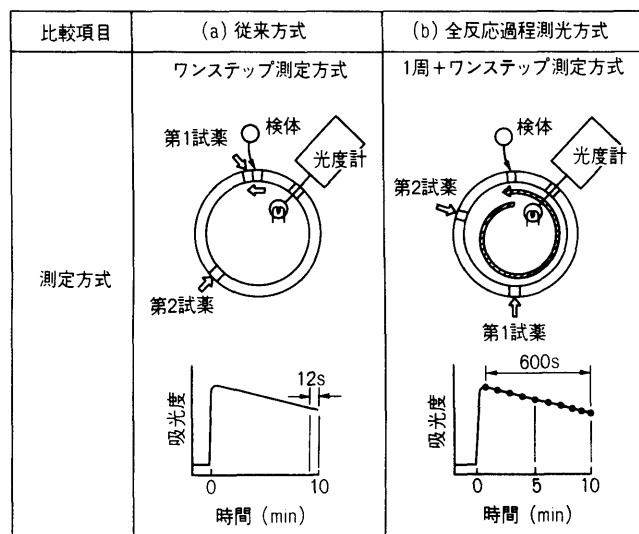


図4 全反応過程測光方式と従来方式の比較

の吸光度とから、例えば、一反応容器だけで検体ブランクをとったり、2項目測定を行ったり、検体の量、試薬の量、どちらにとっても経済的な測定を行うことができる。

5. 新しい方式の自動化装置

ディスクリット方式では、以上のようないわばオーソドックスな形式のもののほかにもいろいろの考案がなされ、製品が出されている。そのうち、遠心方式は特筆すべきものであろう。遠心力を用いた液の移動、攪拌は巧妙なちょっとしたまねのできない考案である。小規模装置として成功を収めている。

次に、バック（またはバッグ）方式がある。柔軟なプラスチック製袋（最近は固い箱状容器のものもある。）に試薬が内部に封じ込められており、検体と緩衝液が容器中に注入された後、内部の試薬が容器中に放出され、混合されて反応するようになっている。容器をそのまま測光するので、キャリオーバの起こりうるところは検体採集のピペット部だけということになる。このように、反応の場（容器）として使用される場に必要試薬を必要十分だけ用意（封入）している方式をバック方式と呼ぶことにすれば、このほかにも数種ある。

また、ドライケミストリも同種のものとみることできる。

電極は、以上の測定法とはまったく異なった行き方のものである。電極には今のところ電解質などの無機イオンを測るものが多いが、このほかに酵素や抗体のような生物由来のものを用いたりして有機物を測るものもあり、特異性の高い測定を期待できる。

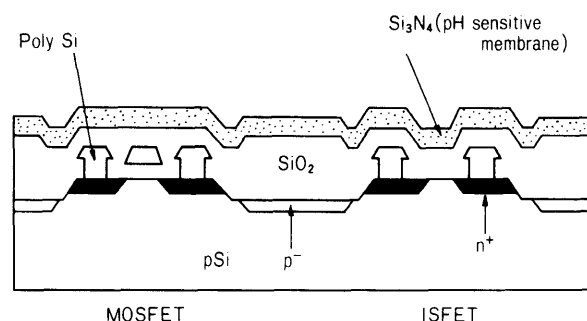
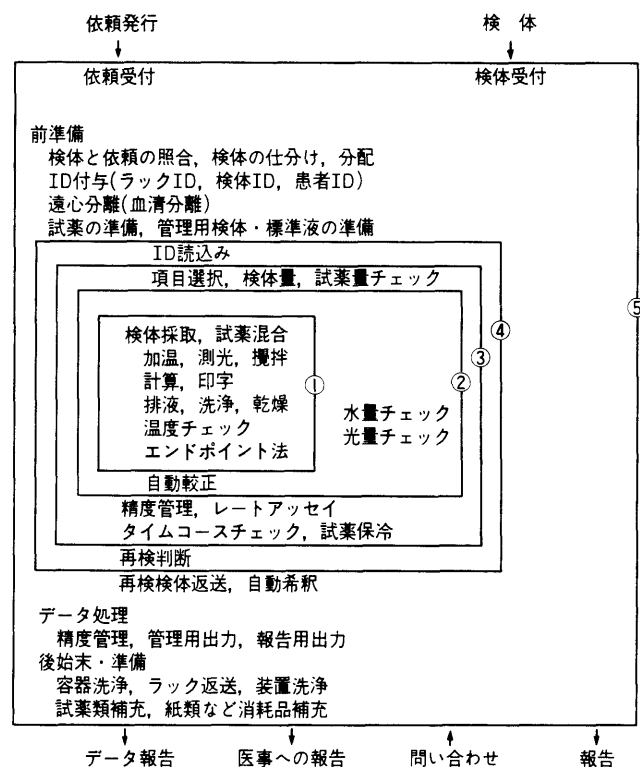
なお、生物界にはいろいろなセンサがある³⁾。感度の点からだけみても、カイコのガの臭覚など性誘引物質の分子が7個/秒あれば感じるというすばらしい感度のものもあり、生物界に学べばすばらしいセンサを作ることができるのではあるまいか。

一方、LSI（大規模集積回路）などを作る半導体製造技術を、化学センサの製造に用いようという試みも多くなされ

ており、小さなチップ上に複数のセンサを形成する技術も進んでいる⁴⁾⁵⁾（図5）。近い将来、鉛筆の先ぐらいのセンサで多項目のデータが得られるものも手に入るようになるかもしれない。そうすると、自動分析装置の形も大きく変わるであろう。

6. 今後の自動化の方向

生化学検査の自動化は、これが普及し始めてから20年、このようにして進んできた。これからは、免疫化学的手法の取り入れや、電極のような新しい技術の組み入れなどによって形を変えながら限りなく進むであろう。しかし、現在のところ、その自動化の範囲は限られたものでしかない。臨床化学検査の作業のおおよその内容を図6に示す。同図

図5 MOSFETを集積化したISFETの断面構造⁵⁾

注：①～④（種々のレベルの自動化の範囲）
⑤（検査室の作業範囲）

図6 臨床化学検査の自動化

中⑤の枠は生化学検査室の範囲である。表1の第一世代～第二世代の自動化は、同図の①の枠内程度のところであったが、世代を追うに従ってしだいに外の枠のほうに広がった。しかし、現在でも自動化の範囲は大体④の枠内程度であって、その外側、ことに上部には自動化に値する作業が多く残されている。というより、Skeggsが自動化装置を考案するに至ったきっかけとなった一つに、過誤の解消があったのであるが、その起こりうるポイントがこのあたりにあるのに、まだ達成されていなかったことになる。しかし、最近、省力と感染防止などをねらって、このあたりの自動化が積極的に行われ始めた。例えば、高知医大でのベルトラインシステム⁶⁾と、ロボットによる輸血検査などの自作⁷⁾、空気浮上のリニアモータによるトヨタ記念病院のシステム⁸⁾(製作は日立製作所)がある。

また、日立製作所も検体自動遠心をふくむ搬送システムを製作し、秋田大学⁹⁾、信州大学に納入し、すでに稼動し効果を上げている。

本年のオークリッジカンファレンス¹⁰⁾(1990年4月5～6日、米国フロリダ州タンパで開催)でも検査の自動化が主題として取り上げられ、シンポジウムを含め37題の発表があった。

このような生化学検査全体のシステムの自動化には、IDシステム(どこで、どのようにしてIDを決め、どのようにして検体に付けるかを含めたシステム全体)の設計・実施と、めんどろな血清分離、検体の分配などの問題がある。上記の病院でもそれぞれのシステムが構築されているが、この問題は個々の病院によって事情が異なり、部屋の配置、人と物の動線や、情報の流れが異なっており、一概にどう

いうシステムが良いとか、悪いとか決めかねる難しさがある。これからしばらくは摸索の時代に入るかも知れないが、日に日に進歩するメカトロニクスや、ある意味でのロボットの機構、それに、最近よく研究されてきているAI(人工知能)などが大きな役割を担い、しだいにその形が決まっていくことになるだろう。

参考文献

- 1) 小澤恭一編：臨床用自動分析，東京 講談社サイエンティフィク(1985)
- 2) Clinical Chemistry's Man on Horseback:L.T.Skeggs; Chemistry and Engineering News.Aug.10:54,1970
- 3) 菊地俊英：化学感覚器を利用した検出器，ぶんせき，478～483(1977)
- 4) 鈴木周一：バイオセンサー，東京 講談社サイエンティフィク(1984)
- 5) 塚田啓二，外：差動増幅回路を一体化したISFET，電子情報通信学会論文誌J70-C，550～555(1987)
- 6) 佐々木匡秀：検査部内自動搬送システム，ベルトラインシステムの考案，臨床病理，32，119～126(1984)
- 7) 佐々木匡秀：臨床検査室のロボット化，臨床病理，35，1072～1078(1987)
- 8) 熊田国道，外：臨床検査自動ラインシステム，TACS計画中間報告，第一回桂浜カンファレンス抄録集，P.15～16(1987)
- 9) 上杉二郎：秋田大学における検査の自動化・システム化の試み，第二回桂浜カンファレンス抄録集，P.25(1990)
- 10) Program and Abstract : Oak Ridge Conference on Advanced Analytical Concepts for the Clinical Laboratory.Special Topic:Laboratory Systems Integration:Robotics and Automation 1990.

日製産業株式會社

本社 電話 東京(03) 504-7211
 筑波支店 電話 土浦(0298)23-7391
 千葉営業所 電話 千葉(0472)47-4151
 北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
 京都営業所 電話 京都(075)241-1591
 岡山営業所 電話 倉敷(0864)25-1316
 沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

札幌支店 電話 札幌(011)221-7241
 北関東営業所 電話 大宮(048)653-2341
 横浜支店 電話 横浜(045)671-5421
 豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191
 大阪支店 電話 大阪(06)366-2551
 広島支店 電話 広島(082)221-4514

仙台支店 電話 仙台(022)264-2211
 西関東営業所 電話 八王子(0426)43-0081
 新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011
 名古屋支店 電話 名古屋(052)583-5841
 四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
 九州支店 電話 福岡(092)721-3501

<編集後記>

分析法が確立されると自動化の研究が始まり、広範囲な普及を促すというのが典型的パターンといえます。その目的は省力化であったり、分析値の信頼性向上、あるいは不快作業の回避など様々ですが多くの自動化装置がいろいろな場面で活躍しています。また、次々と新しい装置が開発されています。本号では分析の自動化にスポットを当て特集を組みました。紙面の関係上、巻頭言を含めて5つのテーマになりましたが諸先生には自動化の意義、歴史的な経緯、あるいは信頼性・操作性施策などを含めた広い視野でのお話を伺わせていただきました。分析自動化の研究開発の一層の発展を期待したいと思います。

(内野興一 記)

■本ニュースに関するお問い合わせは、下記へ、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

- 日立計測エンジニアリング株式会社
 テクノリサーチセンタ
 〒312 茨城県勝田市市毛882番地
 電話 勝田(0292)73-2111(代)
- 日製産業株式会社
 科学機器営業本部 企画開発部
 〒105 東京都港区西新橋1-24-14
 電話 東京(03)504-7195(ダイヤルイン)
 FAX (03)504-7756

HITACHI
 SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
 SEP./OCT. 1990 VOL.33 NO.5

発行 平成2年9月1日(年6回発行)
 発行人 塚田勝男
 編集人 永谷 隆
 発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部 科学機器部
 〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
 電話 東京(03)214-3123(直通)
 印刷所 日立印刷株式会社