XVI.分析の基本、分析技術

1　分析の基本

1）　有効数字

（1）定義

有効数字は、その値がどれだけ信用できるかを示すもので、桁数の多いものほど、精度が高い測定値であることを意味する。

（2）有効数字の表し方

有効数字を考慮して数値を表現する際、一般的に［1 以上 10 未満の数値］×10^n（n は整数）の形で表す。0.0123 は 1.23×10^{-2} と表せることから、有効数字 3 桁である。

※「0.0」は位取りの部分なので、ここは有効数字の桁には数えない。

（3）有効数字を考慮した計算法

加減法	和・差は、そのまま計算した後、**末尾の位の最も高いもの**に合わせて、最後に 1 桁小さい位を四捨五入する。 例）$\underset{(少数第二位)}{\underline{12.31}} + \underset{(少数第一位)}{\underline{6.5}} - \underset{(少数第二位)}{\underline{8.98}} = 9.83 \fallingdotseq 9.8$
乗除法	積・商は、そのまま計算した後、**有効数字の桁数の最も少ないもの**に合わせて、最後に 1 桁小さい位を四捨五入する。 例）$\underset{(有効数字四桁)}{\underline{12.31}} \times \underset{(有効数字二桁)}{\underline{32}} = 393.92 \fallingdotseq 3.9 \times 10^2$ $12.31 \div 32 = 0.3846875 \fallingdotseq 0.38$

加減法と乗除法が混同した計算の場合

例）$12.31 + 6.55 \times 8.989$

まずは、掛け算を行って乗除法により求める。

$\underset{(有効数字三桁)}{\underline{6.55}} \times \underset{(有効数字四桁)}{\underline{8.989}} = 58.87795 \fallingdotseq 58.9$

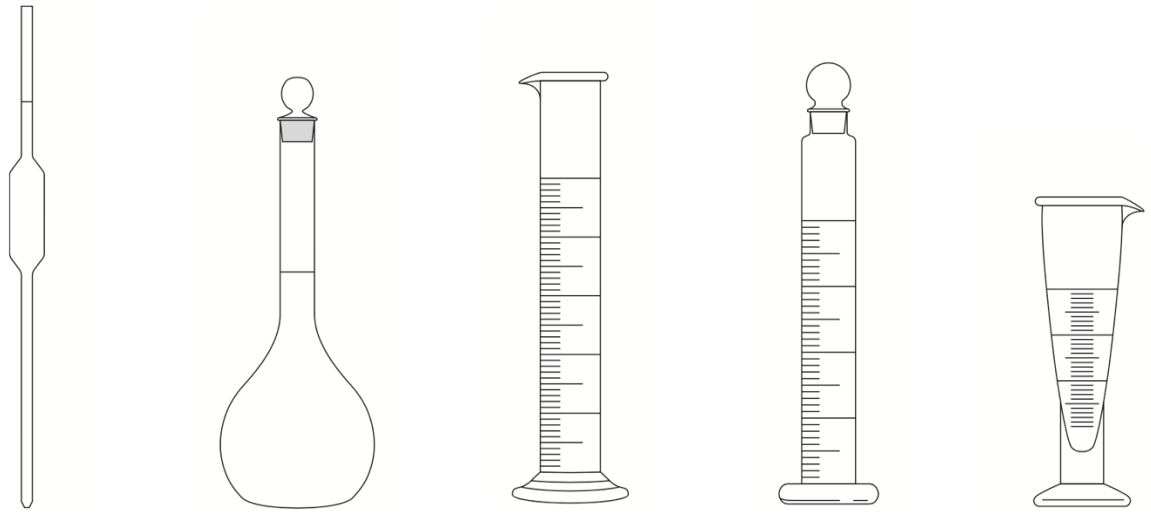
次に、足し算を行って加減法により求める。

$\underset{(少数第二位)}{\underline{12.31}} + \underset{(少数第一位)}{\underline{58.9}} = 71.21 \fallingdotseq 71.2$

２） 分析に用いる器具

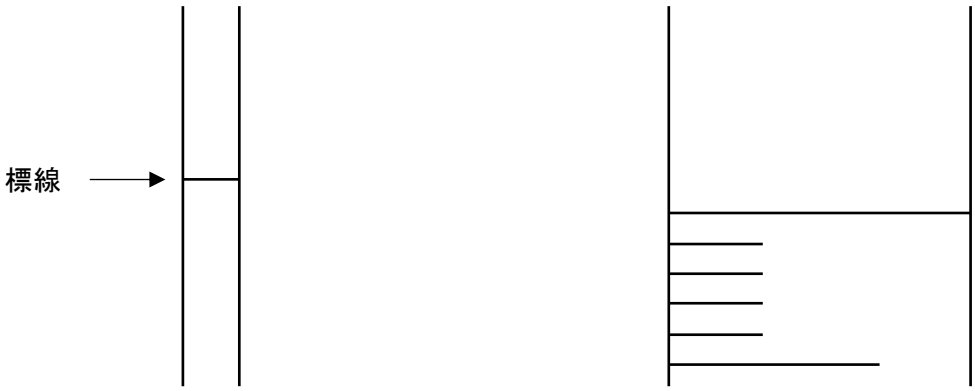
容量分析に用いられる体積測定用の器具を化学用体積計という。体積計にはホールピペット（全量ピペット）、メスフラスコ（全量フラスコ）、メスシリンダー、メートルグラスなどがある。これら体積計には、内部に溶液を入れた時の体積が表示体積である受用器具と、体積計から溶液を出した時の体積が表示体積の出用器具がある。

受用器具	メスフラスコ、メスシリンダー、メートルグラスなど
出用器具	ホールピペット、メスピペット、ビュレットなど



ホールピペット（全量ピペット）　**メスフラスコ（全量フラスコ）**　**メスシリンダー（無栓形）**　**メスシリンダー（有栓形）**　**メートルグラス**

溶質を溶媒に溶かして溶液を調製するときは、**受用器具の有栓形**（メスフラスコ、メスシリンダー）を用いる。また、**正確に一定の液量**を計測する場合は、1 つの標線をつけた**ホールピペット**や**メスフラスコ**を用いる。



ホールピペット、メスフラスコ
標線付近が細いため**誤差が少ない**

メスシリンダー、メートルグラス
標線付近が太いため**誤差が大きい**

３） 分析法のバリデーション

（１）定義

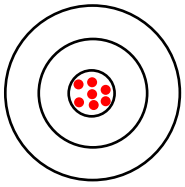
日本薬局方において、分析バリデーションは「医薬品の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる範囲であることを科学的に立証することである。」と定義されている。試験法の規格値などを基にして、設定する基準値を満足させるものかどうかを実証することにより分析法の妥当性が保証できる。

（２）分析能パラメータ

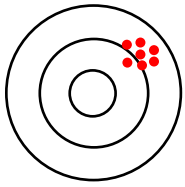
分析法の妥当性を評価するために評価が必要な変数のことである。

分析能パラメータ	定義・評価方法
真度 （正確さ）	真の値からの**かたよりの程度**のことであり、系統誤差の影響を評価するパラメータ （真の値と測定値の総平均との差で表される。）
精度 （精密さ、再現性）	測定値の**バラツキの程度**を示すもの （測定値の分散、標準偏差又は相対標準偏差で表される）
特異性 （選択性）	共存物の存在下で、**試料中の分析対象物を正確に測定できる能力**のこと 分析法の識別能力を表すパラメータ
検出限界 （感度）	試料に含まれる分析対象物の**検出が可能な最低の量**（濃度）
定量限界	試料に含まれる分析対象物の**定量が可能な最低の量**（濃度）
直線性	分析対象物の量（濃度）に対して、**直線（比例）関係にある測定値**を与える分析法の能力のこと
範囲	適切な精度と真度を与える分析対象物の**下限と上限の量（濃度）に挟まれた領域**のこと

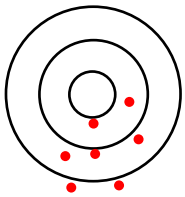
＜真度と精度の違い＞



真度：良好
精度：良好



真度：不良
精度：良好



真度：不良
精度：不良

2　分析技術

1）　ドライケミストリー

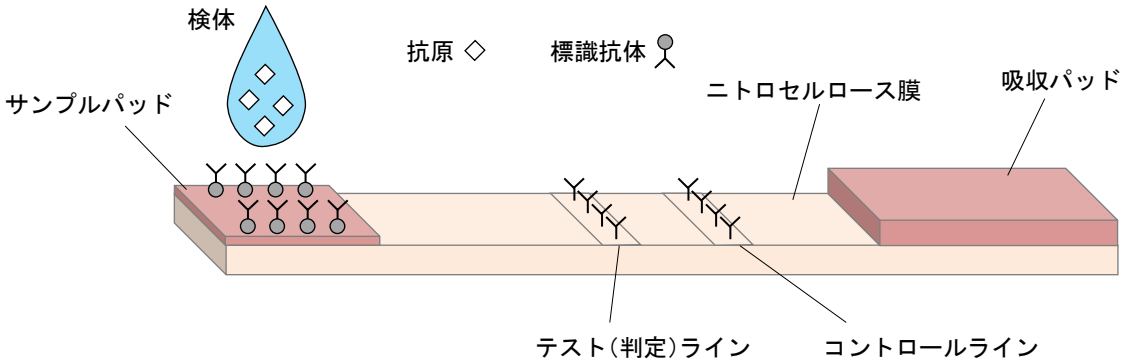
ドライケミストリーは、乾燥状態にある分析試薬に、液状の生体試料（尿、血液など）を接触させることにより、生体試料に含まれる物質を分析する方法である。ドライケミストリーは、試料の調製が不要で迅速かつ簡便に高精度の分析が可能であり、医療現場において多用されている。ドライケミストリーは、主に試験紙法、多層フィルム法、イムノクロマト法に分けられる。

（1）ドライケミストリーの特徴

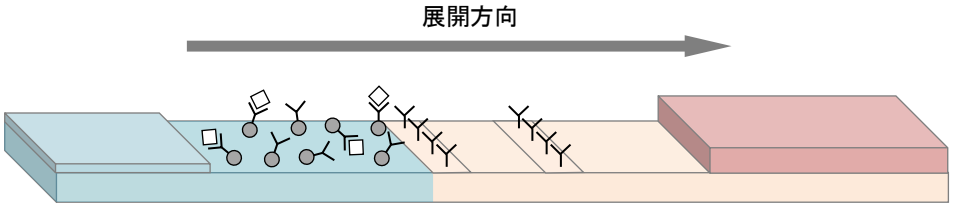
・試薬が乾燥状態で存在しており、安定である
・生体試料中の水分を溶媒とするため、溶媒を必要としない
・溶媒を使用しないことから、廃液が生じない
・わずかな試料で分析が可能である
・ベットサイドでの検査が可能である

（2）イムノクロマト法

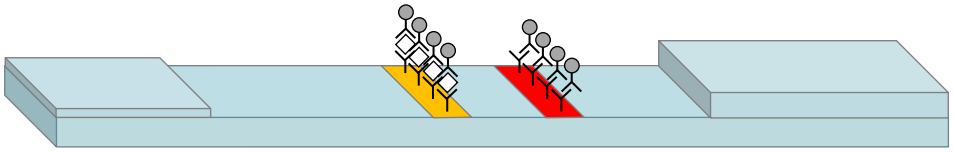
液体試料（**咽頭ぬぐい液**、**鼻腔ぬぐい液**、唾液、尿など）が毛細管現象により移動する性質を利用した免疫学的分析法である。



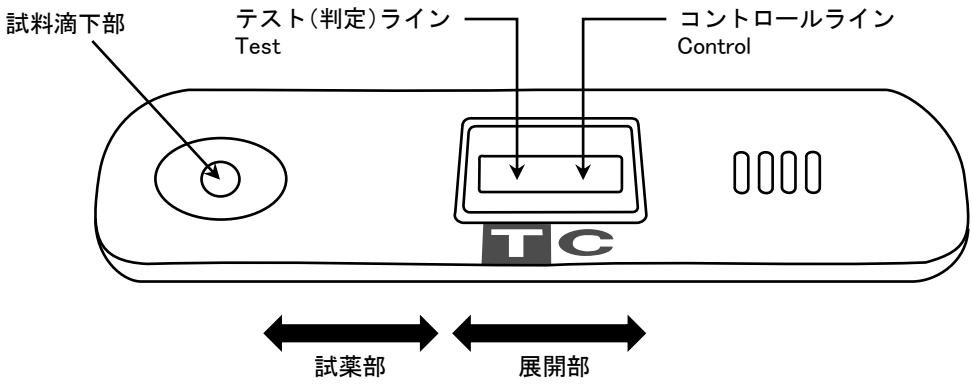
検体をサンプルパッド上に滴下すると、検体中の測定対象物質（抗原）が膜を移動しながら色素標識抗体（**金コロイド**や**酵素**により標識された抗体）と結合する。



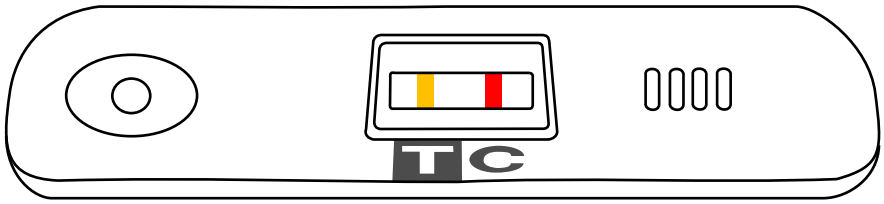
この抗原－色素標識抗体複合体はテスト（判定）ラインまで移動して、**膜状に固定化した抗体（抗原に特異的な抗体）で補足されサンドイッチ型複合体を形成し、呈色**する。検体中の**抗原と反応しなかった色素標識抗体はコントロールラインまで移動して固定化抗体（色素標識抗体に特異的な抗体）と反応し呈色**する。これをもって、測定が正常に行われたことを確認する。



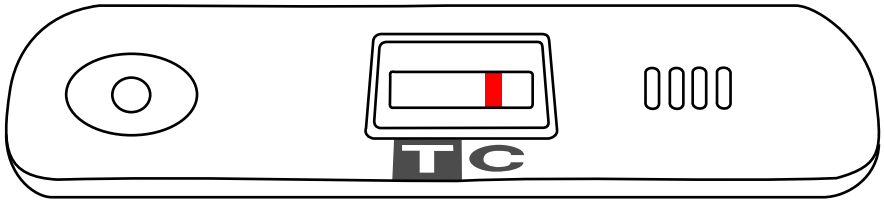
＜検査キットの判定の基準＞



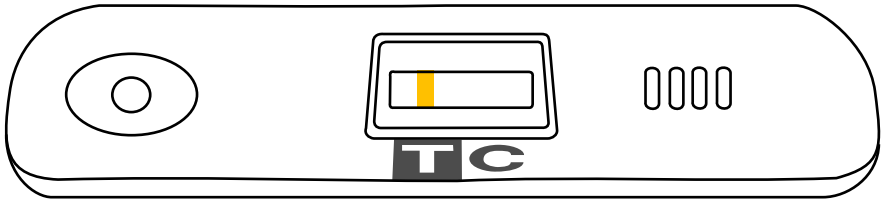
① テスト（判定）ラインとコントロールラインに発色が認められる場合、陽性となる。



② コントロールラインのみ発色が認められる場合、陰性となる。



③ テスト（判定）ラインのみ発色が認められる場合、陽性とはいえず、再測定する必要がある。



２） 酵素法

酵素法とは、酵素反応を利用して目的物質（血糖値、血中 Mg など）を定量する方法である。

（１）酵素法による血糖測定

酵素法による血糖測定には、グルコース酸化酵素（GOD）やグルコース脱水素酵素（GDH）、ヘキソキナーゼ（HK）が用いられる。血糖測定に用いられる酵素は様々で、**マルトースやガラクトースなどの糖が測定の妨害となる場合がある。**

① グルコース酸化酵素（GOD）を用いる方法

血液試料中のグルコースが、GOD により酸化され、同時に**過酸化水素（H_2O_2）を生じる。**生成した過酸化水素を利用して酵素電極法または酵素比色法により測定する。

$$\beta\text{-D-グルコース} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{GOD}} H_2O_2 + \text{グルコン酸}$$

・酵素電極法の場合

生成した過酸化水素が**白金電極**で酸化される際、電流が発生する。この際の電位差変化を検出し、血中グルコース濃度を測定することができる。

$$H_2O_2 \longrightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$$

・酵素比色法の場合

生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼ（POD）の作用により発色試験液中のフェノールと 4-アミノアンチピリンと酸化縮合し、赤色キノン色素を生成する。この赤色の吸光度を測定することにより、血中グルコース濃度を測定することができる。

$$H_2O_2 + \text{フェノール} + \text{4-アミノアンチピリン} \xrightarrow{\text{POD}} \text{赤色キノン色素} + 4H_2O$$

② グルコース脱水素酵素（GDH）を用いる方法

血液試料中のグルコースは NAD^+ の存在下で GDH により D-グルクノ-δ-ラクトンに酸化され、その際に NAD^+ は NADH に還元される。生成した **NADH の 340 nm における吸光度の変化**により血中グルコース濃度を測定することができる。また、生成した NADH を利用して酵素電極法または酵素比色法により測定することもできる。

$$\beta\text{-D-グルコース} + NAD^+ \xrightarrow{\text{GDH}} \text{D-グルクノ-}\delta\text{-ラクトン} + NADH + H^+$$

③ ヘキソキナーゼ（HK）を用いる方法

血液試料中のグルコースは ATP の存在下で HK によりグルコース-6-リン酸と ADP になる。グルコース-6-リン酸は、$NADP^+$ 共存下、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G-6-PDH）により、6-ホスホグルコン酸になり、同時に $NADP^+$ は NADPH に還元される。生成した **NADPH の 340 nm における吸光度の変化**により血中グルコース濃度を測定することができる。

$$\text{グルコース} + ATP \xrightarrow{\text{HK}} \text{グルコース-6-リン酸} + ADP$$

$$\text{グルコース-6-リン酸} + NADP^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-ホスホグルコン酸} + NADPH + H^+$$