

マイクロフローインジェクション分析法のシステム構築

馬 蘭・樋口慶郎・大島光子・服部隆康*・本水昌二

岡山大学理学部化学科, 〒700-8530 岡山市津島中 3-1-1

*旭テクネイオン(株)科学機器工場, 〒800-0113 北九州市門司区新門司北 1-3-8

Assembly of micro-flow injection analysis system

Lan MA, Keiro HIGUCHI, Mitsuko OSHIMA, Takayasu HATTORI* and Shoji MOTOMIZU
Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka,
Okayama 700-8530, JAPAN

*Asahi Techneion Co.Ltd., Scientific Instrument Division, 1-3-8 Shinmojikita, Moji-ku,
Kitakyushu 800-0113, JAPAN

Micro-flow injection analysis system (μ FIA) was investigated for the minimization of sample size, reagent consumption and waste. A double-cylinder and a double-plunger type micropumps were used, and μ FIA conditions were examined with double flow line systems, where 4-nitrophenol was used as an analyte and was detected at 400nm. When each flow rate of the cylinder-type pump was $50\mu\text{l min}^{-1}$ and a delivery volume per stroke was changed from 0.25 to 8 μl per stroke, the mixing of a reagent and a carrier stream became more effective at smaller delivery volume. When the delivery volume was 0.25 μl per stroke and the flow rate was changed from 10 to $50\mu\text{l min}^{-1}$, mixing efficiency was enough at every flow rates. Optimized μ FIA conditions were as follows: delivery volume, 0.25 μl per stroke; sample size, 20 μl ; inner diameter of reaction tubing, 0.1 mm; length of reaction tubing, 25 cm; the noise-level absorbance at the absorbance of 0.190 of 4-nitrophenol, 0.0001 absorbance, and the sample size for minimized μ FIA was 7 μl . The relative standard deviations (RSD) of a reproducibility test was less than 1% for 10 measurements. On the basis of μ FIA concept, a portable-type micro flow analysis system (μ PFA) was assembled for on-site chemical analysis.

1 緒 言

近年, 環境科学, 海洋科学, さまざまな製品の製造現場における品質管理・工程管理などにおける化学分析において, 分析操作の簡便・迅速化, 分析の精度・感度・正確さの向上などを志向した化学分析の高度化が重要な検討課題となっている。これらに加え, 分析

の高度化のもう一つの観点は、ゼロエミッションを念頭においた廃棄物の減量化を目指した微量試料、微量試薬、微量廃液の実現である。フローインジェクション分析法 (FIA) は、測定迅速性と簡便性が主要な利点である。また、反応試薬液、キャリア液などの流量は通常 $0.5 \sim 1.0 \text{ ml min}^{-1}$ 、試料量は $0.1 \sim 0.5 \text{ ml}$ 程度で測定を行うので、使用量・廃液量は通常のバッチ式測定法の $10 \sim 100$ 分の 1 程度で、大幅な低減化が達成される。しかも連続流れを用いるため前処理などもオンライン化し易いという利点もある。Korenaga ら¹⁾はダブルプランジャー型ポンプを用い、数 $10 \mu\text{l min}^{-1}$ の流量における混合状態を検討しているが、 μFIA (流量は数 $10 \mu\text{l min}^{-1}$ 程度、試料量は数 $10 \mu\text{l}$ 以下) の構築はなされていない。最近 Motomizu ら²⁾は現場分析 (オンサイト分析) と試薬・廃液のより少量化を目的とし、吐出量 $2.5 \mu\text{l stroke}^{-1}$ のプランジャー型ポンプを用い、流量 $50 \mu\text{l min}^{-1}$ 、試料量 $20 \mu\text{l}$ の二流路方式 μFIA を検討し、その実際的な応用性について報告した。

一方、最近ではさまざまな分析現場で化学分析のオンサイト化の要望も強い。たとえば、イオン選択性電極を用いたポータブル型 FIA システムが報告されているが、この FIA では流量 13 ml min^{-1} であり、マイクロ化は目的とされていない³⁾。このように、オンサイト分析と μFIA の両方を志向した研究はこれまでほとんどなされていない。

本研究では、通常の FIA (C-FIA) よりも優れた性能と分析上の利点を有し、さらに μFIA を基本とし、オンサイト分析も可能とする FIA システム開発を目指し、その構築に必要な基礎検討を行った。本研究の μFIA システムでは、試料、試薬、廃液量が C-FIA の $10 \sim 20$ 分の 1 以下に低減できた。また、オンサイト分析へも利用可能な携帯型分析システム (μPFA) とすることができた。

2 実 験

2.1 装置

サヌキ工業製ダブルシリンジ型送液ポンプ PC-5000 (流量およびストローク当たりの吐出量可変型)、旭テクネイオン製ダブルプランジャー型ポンプ (1 ストローク当たり吐出量: $2.5 \mu\text{l}$) を用いた。吸光度測定には旭テクネイオン製ポータブル LC の光源をハロゲンランプあるいは LED に交換した後、検出部を利用した。なお、フローセルには、窓直径 0.4 mm 、光路長 3 mm 、容量 $0.38 \mu\text{l}$ 、光源には、ハロゲンランプあるいは LED (450 nm) を使用し、干渉フィルターで波長を選別した。

2.2 試薬

4-ニトロフェノール (NP, 和光純薬工業製, 試薬特級) 0.14 g を蒸留水に溶かして 100 ml とした (10^{-2} M)。使用に際してはこれを適宜希釈して用いた。

反応液として、四ホウ酸ナトリウム (ホウ砂, 和光純薬工業製, 試薬特級) 0.95 g を蒸留水に溶かして 250 ml としたホウ砂緩衝液 (10^{-2} M , $\text{pH} 9.2$) を用いた。

2.3 実験操作

キャリアー (C), 反応液 (R) 流れの二流路方式とし, 流量, 吐出量可変のシリンジポンプを用いて FIA 装置を組み立てた. 流路図を Fig. 1 に示す. 流路系はすべて樹脂製 (PTFE:ポリテトラフルオロエチレン; PEEK:ポリエーテルエーテルケトン) で, 移送及び反応チューブには内径 0.10~0.30 mm の PTFE チューブを用いた. 接続にはフェラル方式 PEEK コネクターを用いた. 検出器はハロゲンランプを光源とする可視吸光検出方式 (干渉フィルター使用) である. 試料注入にはサヌキ工業製六方バルブを用いた. 試料として 4-ニトロフェノール (NP) を用い, ホウ砂緩衝液 (pH=9.2) を反応液として, NP のプロトン解離型の呈色 (400 nm) を測定した.

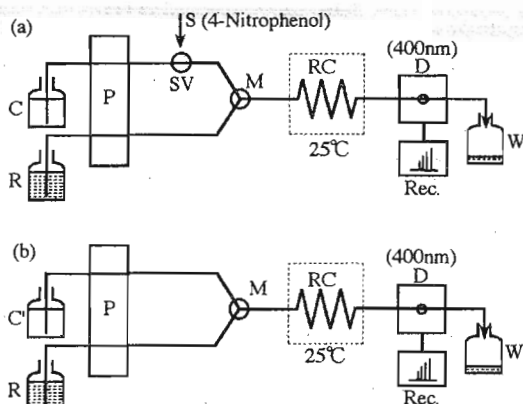


Fig. 1 Flow systems for fundamental experiments
P: micro-flow pump; M: mixing joint; D: detector (400nm);
R: 10^{-2} M borax buffer; RC: Reaction coil (25°C);
Rec.: recorder; W: waste;
(a) C: H_2O ; S: sample injection; SV: 6-way injection valve.
(b) C: 10^{-5} M 4-Nitrophenol.

3 結果及び考察

3.1 送液ポンプの吐出量の最適化

Fig. 1 (b)のシステムを用い, 発色試薬液 (C'), 反応液 (R) の流量を各々 $50 \mu\text{l min}^{-1}$ に固定し, 吐出量の変化 ($0.25 \mu\text{l} \sim 8 \mu\text{l}$) による混合の状態について検討した. 反応コイルは, 内径 0.25 mm, 長さ 25 cm と 75 cm について検討した. 各々のバックグラウンドのノイズレベルの吸光度値をまとめて Table 1 に示す. これから分かるように, C-FIA で通常用いられている $5 \sim 8 \mu\text{l}$ より吐出量を減少させた場合, 吐出量が少ないほど混合は速やかに行われる. $1 \mu\text{l}$ の場合, 反応コイル長 25 cm でノイズレベルは 2.5×10^{-4} Abs であり, ほぼ完全に混合されていると考えてよい (2.5×10^{-4} Abs は 0.19 Abs の約 0.1% に相当する). バックグラウンドの安定性, ノイズレベルの低さから, 高感度測定に十分使用できることが分かった. さらに, ポンプの吐出量を改良して, 四分の一に減少させて検討した. $0.25 \mu\text{l}$ の場合では, ノイズレベルはさらに小さくなり, 0.00017 Abs. であった. この吐出量では, 内径 0.25 mm, 長さ 25 cm の反応コイルで, ノイズレベルは小さく, 高感度測定には最適な条件であることが分かった. しかし, ポンプの二つのシリンジの圧力は不均衡で, バックグラウンドが全体的に周期的に波打っていた. 吸光度フルスケールを拡大して調べたところ, 波形は周期的であり, ポンプ性能が原因と分かった. 従って, 現

Table 1 Effect of delivery volume on mixing of a reagent and a carrier stream

Delivery volume ($\mu\text{l stroke}^{-1}$)	Noise level absorbance/ 10^4 *1	
	Reaction tubing length/cm	
	25	75
0.25	2.2	2.3*2
0.25	2.0	1.9*3
0.25	1.7	1.6
1	2.5	1.8
2	3.6	1.9
3	6.8	2.0
4	22	2.2
5	44	2.4
6	55	2.7
7	84	3.3
8	99	4.0

Total flow rate : $100 \mu\text{l min}^{-1}$; inner diameter of reaction tubing : 0.25mm.

*1 Mean absorbance of NP at 400nm : 0.190 (ref, water).

*2 Inner diameter of the reaction tubing (silica tubing) : 0.05mm.

*3 Inner diameter of the reaction tubing : 0.10mm.

反応コイルでよいことが分かった。

3.2 反応コイルの内径と長さの検討

反応コイルとして、内径 0.10~0.30 mm のチューブを用い、内径 0.25 mm、長さ 25 cm の反応コイルと内容量が同じになる条件下で、チューブ内径が混合に及ぼす影響を調べた。吐出量を変化させて検討した結果を Table 2 に示す。内径 0.10 mm (長さ 156 cm) のチューブは混合し難く、ノイズレベルは三つの中で最も大きくなった。吐出量を 0.25 μl とする時、バックグラウンドのノイズレベルはいずれのチューブでも $0.2\sim 0.3 \times 10^{-3}$ Abs 程度に低減できた。Fig.1 (a) の系で、ポンプの総流量を $100 \mu\text{l min}^{-1}$ に固定し、内径 0.10 mm、チューブ長 156 cm の反応コイルを使って、吐出量の変化 (1, 2 μl) によるピーク形状について検討した。結果を Fig. 2 に示す。吐出量を 1 μl とする時、混合は実用上十分であり、ベースラインノイズも小さく、安定であった。これらの結果から、内径 0.10 mm のチューブも反応コイルとして、実用上使用できることが分かった。

時点では $1 \mu\text{l stroke}^{-1}$ が実用的であると思われる。内径 0.05 mm (シリカチューブ) および 0.10 mm の反応コイルについても検討した結果、0.25 mm よりもむしろ、ノイズレベルは大きくなった。また、バックグラウンドも同様に周期的に波打っていた。流量の変化により、波の幅も変わったことより、これもポンプ性能が原因と考えられる。内径 0.25, 0.10, 0.05 mm と細くなるにつれて、ノイズはより大きくなっている。これはチューブ内径が小さいために分散が起りにくいことによる。しかも内径 0.05 mm チューブの場合には、抵抗が大きすぎて流量 20 μl 以上を流すことができなかった。これらの結果から、 μFIA システムには内径 0.05 mm という細いチューブは好ましくないことが分かった。

以上の結果から、流量 50 μl の場合には吐出量は 0.25 μl 、内径 0.25 mm、長さ 25 cm の

Table 2 Effect of inner diameter of reaction tubing on mixing of a reagent and a carrier stream

Delivery volume ($\mu\text{l stroke}^{-1}$)	Noise level absorbance/ 10^3 *1		
	Inner diameter/mm (length/cm)		
	0.30 (17)	0.25 (25)	0.10 (156)
0.25	0.3	0.2	0.2
1	0.5	0.3	0.4
2	0.9	0.4	4.9
3	1.9	0.7	10.1

Total flow rate : $100 \mu\text{l min}^{-1}$.

*1 Mean absorbance of NP at 400nm : 0.190 (ref, water).

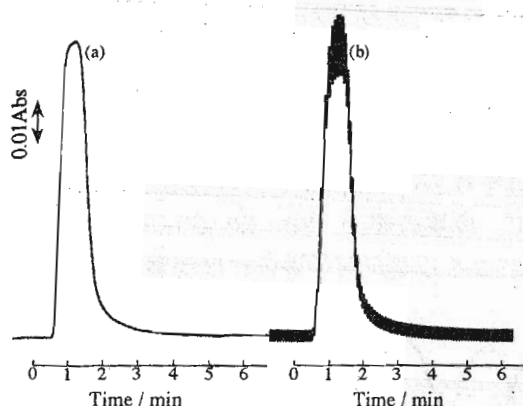


Fig. 2 Effect of pump stroke volume on the peak profiles

(a) 1 μl stroke⁻¹; (b) 2 μl stroke⁻¹

Reaction coil : 0.10 mm i.d. \times 156 cm ; total flow rate : 100 μl min⁻¹ ; sample volume : 24 μl ; sample : 10⁻⁴M 4-Nitrophenol.

いて検討した. 結果を Table 3 に示す. チューブ長 50 cm 以上ではノイズレベルは 0.0002 程度以下となりほぼ完全に混合されていることが分かった.

Table 3 Effect of length of reaction tubing on mixing of reagent and carrier streams (syringe type pump)

Delivery volume (μl /stroke)	Noise level absorbance/ 10^4				
	Reaction tube length (cm)				
	15	25	50	75	100
1	4.8	2.5	2.0	1.8	1.6
2	9.9	3.6	2.2	1.9	1.7
3	16.1	6.8	2.3	2.0	1.8

Total flow rate : 100 μl min⁻¹ ;
Inner diameter of reaction tube : 0.25mm.

逆に内径 0.30 mm (長さ 17 cm) のチューブでは, 短かすぎて混合が不十分となり, バックグラウンドのノイズが大きくなったものと考えられる. 前述のように内径 0.05 mm では細すぎて, 非常に流れ難く, ポンプの総流量を 40 μl min⁻¹ 以上にはできなかった. 以上のように, 内径 0.25 mm の場合に最も二液の混合はよくなり, 若干ノイズは大きい内径 0.10 mm のチューブも実用上使用できることが分かった.

更に, Fig. 1 (b) のシステムを用い, ポンプの吐出量を 1~3 μl と変化させ, 反応コイル長が混合状態に及ぼす影響について検討した. チューブ内径 0.25 mm のものを用い, 15, 25, 50, 75, 100 cm の長さにつ

Table 4 Effect of length of reaction tubing (0.25mm i.d.) on mixing of reagent and carrier streams (plunger type pump)

Reaction tubing length / cm	Noise level / Absorbance
30	4.3×10^{-4}
50	1.1×10^{-4}
75	0.9×10^{-4}
100	0.3×10^{-4}
150	0.3×10^{-4}
200	0.3×10^{-4}

Mean absorbance of background : 0.190 (ref, water)
Delivery volume : 2.5 μl stroke⁻¹.

吐出量固定 (2.5 μl stroke⁻¹) 型のプランジャー型ポンプを用い, 反応コイル長による混合の状態について検討した. 結果を Table 4 に示す. シリンジ型ポンプと大体同じ結果が得られた. チューブ長 50 cm 以上で, ノイズレベルは 0.0001 以下となった. 従って, 反応コイル長を 50 cm 以上にすると, 実用上混合は充分である. また, Fig. 1 (a) の系でピーク形状についても検討した. 内径 0.25 mm の反応コイルを用いて長さ 30, 50, 75, 100 cm で検討した. 30 cm では若干混合不十分な面もあるが, 迅速性の点からは好ましい. 100 cm では混合は十分であるが, ピークがブロードとなり, 1 ピーク当たり 1.5 分を要する. これらの結果から, 混合と時間を考慮すれば, 長さ 50 cm または 75 cm の反応コイルが実用的であると思われる.

以上の検討結果から、各々の流量 $50 \mu\text{l min}^{-1}$ の場合には、吐出量 $0.25 \mu\text{l}$ 、内径 0.25 mm 、長さ 50 cm 以上の反応コイルで十分な混合が行われることが分かった。また、場合によれば、内径 0.10 mm のチューブも使用できる。

3.3 送液ポンプの流量の最適化

Fig. 1 (a) のシステムを用い、ポンプの吐出量を $0.25 \mu\text{l}$ に固定し、内径 0.10 mm 、チューブ長 25 cm と 50 cm の反応コイルを使って、流量の変化 ($20 \sim 50 \mu\text{l min}^{-1}$) による混合の状態とピーク形状について検討した。反応コイル長が同じ場合には流量を増加させると、バックグラウンドのノイズレベルもわずかずつ大きくなった。また、流量が小さいほどピーク高は大きいですが、ブロードなピークが得られた。1 時間当たりの試料処理数を 60 サンプルとすれば、良好なピークを得ることができる総流量の最低量は内径 0.10 mm 、チューブ長 50 cm の反応コイルを用いたとき $80 \mu\text{l min}^{-1}$ であり、チューブ長 25 cm を用いた場合は $60 \mu\text{l min}^{-1}$ であった。また、長さ 25 cm 、内径 0.10 mm の反応コイルを用いて、検討した結果を Fig. 3 に示す。1 分間当たり 1 サンプルを測定しようとする、総流量の最低値は $60 \mu\text{l min}^{-1}$ となる。

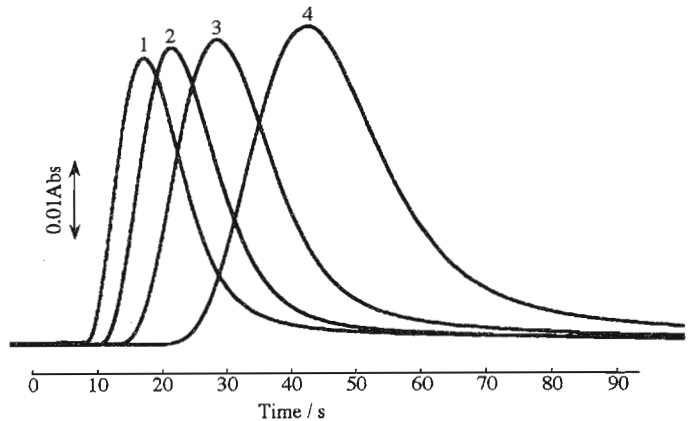


Fig. 3 Effect of total flow rate on the peak profiles

1, $100 \mu\text{l min}^{-1}$; 2, $80 \mu\text{l min}^{-1}$; 3, $60 \mu\text{l min}^{-1}$; 4, $40 \mu\text{l min}^{-1}$
 Reaction coil : $0.10 \text{ mm i.d.} \times 25 \text{ cm}$; stroke volume : $0.25 \mu\text{l stroke}^{-1}$;
 sample volume : $7 \mu\text{l}$; sample : $10^{-4} \text{ M 4-Nitrophenol}$.

3.4 試料注入量の影響

試料のキャリアー液への注入は、六方バルブにより行った。用いた六方バルブの空容積は $5 \mu\text{l}$ であり、ループ内容積を加えた試料注入量の最低量は $7 \mu\text{l}$ である。吐出量固定 ($2.5 \mu\text{l stroke}^{-1}$) のダブルプランジャー型ポンプを用い、Fig. 1 (a) の系で、反応コイルに内径 0.25 mm 、長さ 50 cm を用い、総流量 $100 \mu\text{l min}^{-1}$ として、試料注入量を $10, 15, 20, 25, 35 \mu\text{l}$ と変化させて、そのピーク形

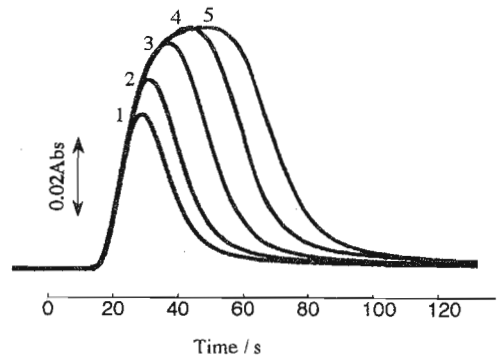


Fig. 4 Effect of sample volume on peak profiles

Injected volume : 1, $7 \mu\text{l}$; 2, $10 \mu\text{l}$; 3, $15 \mu\text{l}$; 4, $20 \mu\text{l}$;
 5, $25 \mu\text{l}$; reaction coil : $0.10 \text{ mm i.d.} \times 25 \text{ cm}$; stroke
 volume : $0.25 \mu\text{l stroke}^{-1}$; total flow rate : $60 \mu\text{l min}^{-1}$;
 sample : $10^{-4} \text{ M 4-Nitrophenol}$

状について調べた。試料注入量が 20 μl 以上になると、分散度はほぼ一定となり、ピーク高さはあまり変わらない。これらの結果から、ピーク高と時間を考慮すると、試料注入量は 20 μl が望ましい。

また、シリンジ型ポンプを用い、吐出量 0.25 μl 、全流量 60 $\mu\text{l min}^{-1}$ 、反応コイル内径 0.10 mm、長さ 25 cm とし、試料注入量を 7, 10, 15, 20, 25 μl と変化させてその影響

について検討を行った。結果を Fig. 4 に示す。また、ピーク高さ及び面積と試料注入量との関係を Fig. 5 に示す。試料注入量が 20 μl 以上になると、ピーク高さはあまり変わらず、ピーク形状はブロードとなった。予想通り、ピーク面積と試料注入量は良好な正比例の関係であった。1 時間当たりの試料処理数を 60 サンプルとすれば、試料注入量の最大量は 10 μl であった。

これが現段階での μFIA における流量、試料量の最低量であり、感度・精度の点でも現在用いられている C-FIA に劣ることはない。

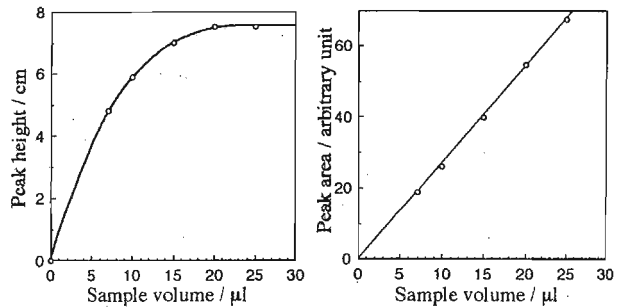


Fig. 5 (a) Effect of sample volume on peak height

(b) Effect of sample volume on peak area

Reaction coil : 0.10 mm i.d. \times 25 cm ; stroke volume : 0.25 $\mu\text{l stroke}^{-1}$; total flow rate : 60 $\mu\text{l min}^{-1}$; sample : 10^{-4} M 4-Nitrophenol .

3.5 μFIA システムの基礎構築

1 分間当たりの処理数を 1 サンプルとする場合に、最もマイクロ化できる条件を Table 5 にまとめた。この条件で NP を用いて測定した検量線用シグナルを Fig. 6 に示した。パツ

Table 5 Experimental conditions for most minimized micro-flow injection analysis system at the sampling rate of 60 samples h^{-1}

Pump	double-cylinder alternative delivery
Flow rate	30 $\mu\text{l min}^{-1}$ (total flow rate : 60 $\mu\text{l min}^{-1}$)
Delivery volume	0.25 $\mu\text{l stroke}^{-1}$
Reaction coil	0.10 mm i.d. \times 25 cm
Sample size	7~10 μl
Flow cell	ϕ 0.4 mm \times 3 mm path length (volume: 0.38 μl)
Sample throughput	60 samples h^{-1}
Noise level absorbance	0.0003 Abs. for 0.019 Abs. of back ground
Detection limit	1×10^{-8} M ($\epsilon = 1 \times 10^4$; back ground: 0.002 Abs.; noise level: 0.00003 Abs. ; S/N = 3)

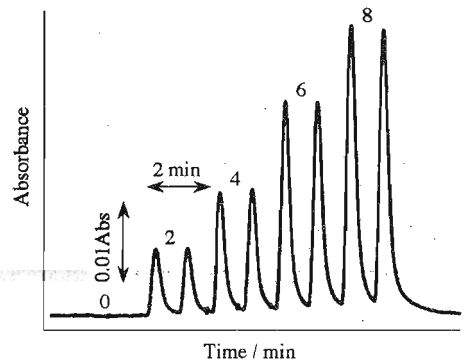


Fig. 6 Flow signals obtained with μFIA

Sample : 10^{-5} M 4-Nitrophenol ; sample volume : 7 μl ; total flow rate : 60 $\mu\text{l min}^{-1}$; stroke volume : 0.25 $\mu\text{l stroke}^{-1}$; reaction coil : 0.10 mm i.d. \times 25 cm ; detector : 400nm .

クグラウンドは非常に安定で、検量線も良好な直線性を示した。

このようにして構築した μ FIA システムでは、ポンプの吐出量 $0.25 \mu\text{l}$ 、総流量 $60 \mu\text{l min}^{-1}$ で、内径 0.10 mm 、長さ 50 cm の反応コイルを用い、サンプル注入量 $7 \mu\text{l}$ として、1 時間当たりの試料処理数を 60 とすることができた。

シリンジ型送液ポンプを用いれば、ほぼ期待した μ FIA システムの構築は可能となったが、装置的に大型となり、携帯に不便で、電力消費量も大きく、オンサイト分析には不向きであった。オンサイト分析を目指した携帯型 μ FIA システムには、小型、コンパクト化、軽量化が容易なダブルプランジャー型ポンプの方が有利である。プランジャー型ポンプを用いる μ FIA では、安定した送液と保守管理の容易さから、吐出量は $2.5 \mu\text{l}$ 程度が良いことが分かった。そこで、ポータブル LC の吐出量を $2.5 \mu\text{l stroke}^{-1}$ に変え、更に FIA 用にプランジャーヘッドをはじめ全てを樹脂仕様に代えた。また、光源も電力消費の小さい LED、容量 $0.38 \mu\text{l}$ のフローセルに改造し、オンサイト測定が可能なポータブル型 μ FIA システム (μ PFA) とした。この μ PFA により、1 時間当たりの試料処理数を 60 サンプルとすれば、総流量 $100 \mu\text{l min}^{-1}$ の時、反応チューブは内径 0.25 mm 、長さ $50\sim 75 \text{ cm}$ 、試料注入量は $20 \mu\text{l}$ 以下、とすればよいことが分かった。

今後更にこの μ PFA の改良とオンサイト分析に利用できる反応系、 μ PFA に対応できる様々なオンライン前処理装置を開発することにより、実際の分析現場における迅速測定を行うつもりである。

本研究は、財団法人 中国電力技術研究財団・平成 9 年度試験研究助成金により行われた。ここに深謝する。

(1997 年 5 月、第 58 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) T. Korenaga, M. Izawa, T. Fujiwara, T. Takahashi, H. Muraki, S. Sanuki : *Anal. Sci.*, **7**, 515 (1991).
- 2) S. Motomizu, M. Oshima, L. Ma : *Anal. Sci.*, **13**, (Supplement), 401 (1997).
- 3) T. Dimitrakopoulos, P. W. Alexander, D. B. Hibbert, L. Cherkson, J. Morgan : *Electroanalysis*, **7**, 1118 (1995).

(Received May 8, 1998)

(Accepted May 18, 1998)