

フローインジェクション分析法の超微量化

(熊本工業大学) 石井 大道

フローインジェクション分析法 (FIA) は 極めて迅速なレスポンスが得られることにその特長があり、反応管コイルには 内径 0.25 ~ 1.0 mm 長さ 0.5 ~ 5 m の PTFE チューブが主として使用され、キャリアー液と 反応試薬液の全流速は 0.5 ~ 2.0 ml min⁻¹、試料の注入体積は 20 ~ 200 μ l、検出器用フローセルの光路長 1cmでその体積は 5 μ l 程度が通常に採用されている実験条件である。最近、FIA の実験条件を微量化(マイクロ化)することによって、試料溶液や試薬の使用量および実験廃液などの発生量を減少するとともに、装置を軽量化してオンサイト分析にも利用可能な携帯型の FIA システムの開発が、岡山大学の本水先生の研究グループによって活発に行われ¹⁾その実用化が進められている。この Portable Micro Flow Analyser (μ PFA)では例えばその反応管として内径0.25mmで長さ0.75 m 程度の PTFE チューブが 使用され キャリヤー液と反応試薬液の各流速は 50 μ l min⁻¹ で、試料注入体積は 20 μ l、吸光度検出器フローセルの体積は 0.38 μ l (光路長0.3cm)の各実験条件が採用されている。このシステムでは通常のFIA の約10分の1のサイズにその微量化が達成された。

一方、FIA の超微量化に関しては 1983 年にRuzicka²⁾ によって、集積マイクロ流路FIAシステム(Integrated Microconduit FIA System) が提案されている。これはプラスチックの小型ブロック上にマイクロチャンネルを作るために溝を掘り、これに平らなプラスチックシートをカバーして、FIA に適した流路を形成し、これに試料溶液注入用バルブと送液用ポンプを連結するとともに検出器のフローセルをブロック中に形成したものである。このような集積マイクロ化は FIA のみではなく、最近の高度に進歩したマイクロマシーニングの技術を応用することによって、マイクロ総合分析システム(μ -TAS : micro total analysis system) が提案され、クロマトグラフィーや電気泳動などに活用されるとともに、同一のマイクロチップ上での複数の分析測定法や試料の前処理法などを組み合わせて、総合した分析システムの開発へと発展している³⁾。我が国では徳島大学総合科学部の伊永先生や同大学薬学部の馬場先生の研究グループによりこの分野の研究が活発に進められている。また、東京大学の澤田先生と北森先生や北海道大学の喜多村先生の各研究グループとその他の数グループによって各種分析システムの集積化をはじめマイクロリアクターとして有機合成などへも利用され、マイクロ化学に関する研究が新しい展開をしている⁴⁾。マイクロチップでの流路は幅 0.05 ~ 0.2mm、深さ 0.1mm 程度で 長さは数cmのサイズが FIA に採用されている。そしてこれらに適したマイクロポンプやマイクロバルブ、マイクロ検出などのための新しい技術開発が進められている。

私達のグループではこの μ -TAS に近いサイズの分析システムを、初心者の学生でも容易に自作して実験できるようにするため、現在市販されている機器や材料のみを用いてこれらを簡単に加工して、通常の FIAを千分の一程度に超微量化することを目指

して実験的に検討した。その結果、内径 0.20mm, 外径 0.35mm で長さ 3~10 cm の熔融シリカキャピラリー(ジーエルサイエンス)を反応管とし、試料溶液とキャリア液および反応試薬液(例えば2種類)はそれぞれ適した各サイズ(例えば 500, 50, 50 μl)のマイクロシリンジ(Hamilton)を一台のデジタルシリンジポンプ(Kd-Scientific)に装着して、適当な流速(例えば 2.5, 0.25, 0.25 $\mu\text{l min}^{-1}$)でそれぞれ送液できるようにした。そして、発色した溶液は反応管キャピラリー先端部のポリイミド樹脂の被覆を剥がしてマイクロフローセル(体積 0.025 μl , 光路長 0.2mm)としてキャピラリー電気泳動用紫外可視検出器(日本分光)を使用してその吸光度変化を測定した。この場合試料溶液またはキャリア液は、反応管の下流に連結した吸引方式のマイクロシリンジ(例えば 500 μl)ポンプによって、内径 0.10mm 外径 0.20mm 長さ1cm の熔融シリカキャピラリーを通じて任意の体積(0.1 ~ 3.0 μl)を任意の時間(3 ~ 90sec)毎に交互に反応管の中に送液するようにした。FIA に必要な反応試薬液や pH 緩衝液などは、それぞれ適当な流速になるようにマイクロシリンジを選択(例えば50 μl と50 μl)して吐出方式でポンプに装着し、内径0.1mm のキャピラリーを通じて反応管中に送液した。これら内径0.1mmのキャピラリーは内径0.19mm 外径2.00mm 長さ1cmのタイゴンチューブ(IsmaTec)を介して反応管に連結した。この FIAではその全流速は吸引方式マイクロシリンジのサイズで定まり、反応試薬液などの流速は吐出方式マイクロシリンジのサイズで決まる。そのため試料溶液またはキャリア液の流速はこの吸引と吐出との流速差によって定まることになる。試料溶液とキャリア液は体積 1ml程度の細口試料瓶にそれぞれ分けて入れ、水の表面張力によってその口を下に向けても流出しない状態で、内径0.1mmのキャピラリーの上を向いた吸引口に直接浸す方法を工夫した。そして、試料瓶の交換は手動によって0.2sec程度の速度で実行することができた。

この超微量フローインジェクション分析法(UMFIA:Ultra Micro FIA)によって得られる応答曲線は正規分布に近く、その広がり体積は標準偏差値(σ_v)として 0.1 μl 程度が容易に得られ、そのため試料溶液注入量が 1 μl 程度で定常状態(分散度=1)を示すシグナルが 1min 以内の短時間で得られ、そしてこの条件下ではピーク高は試料溶液注入量に関係なく一定となる。また、UMFIA では試料溶液注入の前後にキャリア液を流入して毎回ベースラインのシグナルを測定する必要はなく、試料溶液のみを順次交換すれば階段状の正確な応答曲線を得ることができる。このことは UMFIA が超微量連続フロー分析法(CUMFA: Continuous Ultra Micro Flow Analysis)として利用できることになる。つまり、この手法では試料溶液を吸引方式によって反応管に送るので、その吸引口を連続測定をしようとする試料水の流れの中に直接入れれば環境試料などでの連続計測法としても容易に利用できる。将来、超微量の送液ポンプ技術の改良などによってその実用化が期待される。

文献

1. L. Ma, T. Tsuboi, T. Hattori, M. Oshima, T. Takayanagi, S. Motomizu, J. Flow Injection Anal., 16, 79(1999)
2. J. Ruzicka, Anal. Chem., 55, 1040A(1983)
3. Y. Baba, J. Flow Injection Anal., 14, 131(1997)
4. 化学 54巻 10号(1999)化学同人