

# 膜分離を利用するフローインジェクション分析

(阪府大工) 宗 森 信

## Flow Injection Analysis with Membrane Separation

Makoto Munemori

College of Engineering, University of Osaka Prefecture

Mozu-umemachi, Sakai, 591, Japan

### 1. はじめに

微孔質膜による気体や溶質の分離は分析化学的にも広く利用されている。その一つとして、分析目的物を気体に変え（目的物が気体の場合はそのまま）、膜を透過させて母体から分離し、少量の試薬溶液の中に拡散させて検出を行なう方式がある。この方式で最もよく知られているのは溶存酸素計である。この場合には、試薬液中に集められた酸素は電気化学的な検出反応によって消費されるので、試薬溶液の組成は原理的には一定であるから問題はないが、例えばアンモニア電極の場合のように、膜を透過した物質が試薬と反応して溶液組成が変化し、検出反応によってもこれが元に戻らない場合には応答時間に遅れが生じ、特に微量定量的場合にこれが問題になる。従って、膜分離は試薬溶液が常に更新される状態で、すなわち流水方式で使うのが得策と思われる。事実、空気セグメント方式の連続分析装置で膜分離が透析の名で使われて来た。しかしながら空気セグメント方式では、空気が存在するため膜と試料液（供与液）との接触面積が減少するだけでなく、空気中の不純物（例えば二酸化炭素）が測定を妨害することもあり得る。このようなことは、Růžička と Hansen によってその著書<sup>1)</sup>のなかで述べられていて、膜分離はFIA 法にこそ最も適していると思われるが、まだ研究例はあまり多くないようである。以下に、現在までの研究例を著者の目に触れた範囲で紹介する。

### 2. 血しょう中の二酸化炭素の定量

FIA 法に膜分離をはじめて応用したのは Baadenhuijsen ら<sup>2)</sup> のようである。彼らは図1に示したような測定系を用い、硫酸キャリアー液中に50 $\mu$ lの血清（表題では血しょうとなっている）を注入し、発生したCO<sub>2</sub>を分離膜を透過させて指

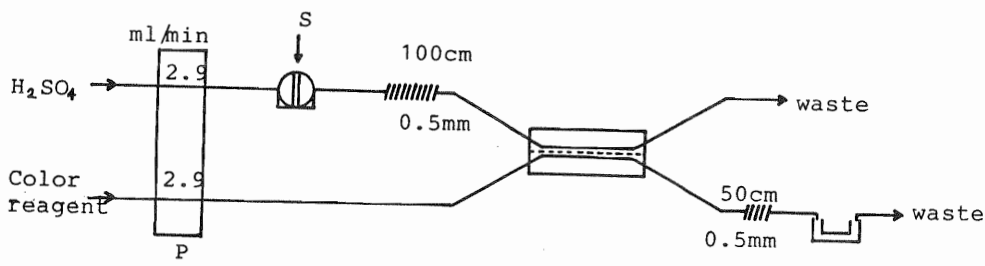


Fig.1 Flow diagram for determination of plasma CO<sub>2</sub>

示薬クレゾールレッドとpH9.2付近で反応させ、生ずる吸光度の変化からCO<sub>2</sub>を定量した。分離器は、ジメチルシリコンゴムの薄膜を、平行して流れる試料液と試薬液との間にサンドウィッチ状にはさみ、しめつけて固定したものである。この研究についてはRůžičkaらの著書に詳しく紹介されているので、ここではこれ以上述べない。

3. 酵素反応と化学発光検出を利用するグルコースの定量

Niemanら<sup>3-5)</sup>は式(1)に示すグルコースオキシダーゼによるグルコースの酵素的酸化反応を利用し、この反応で生ずるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を触媒の存在下ルミノールと反応させて化学発光(式(2))を測定することによってグルコースを定量する方法を報告している。

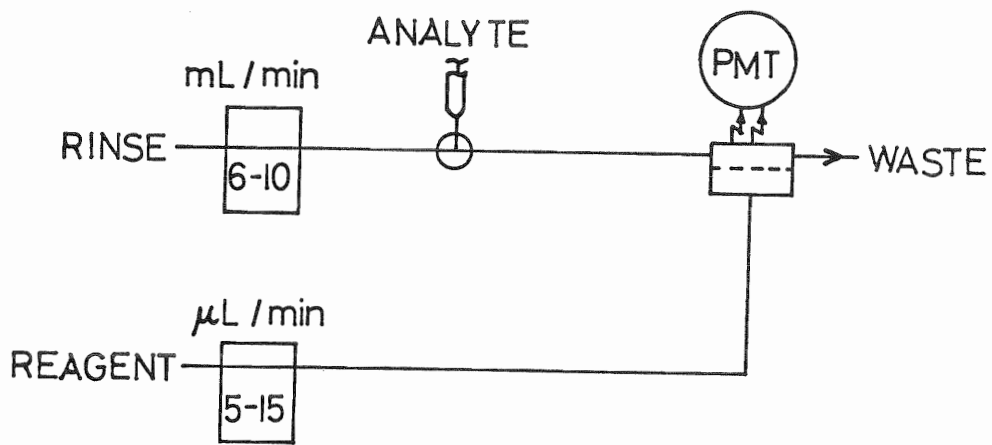
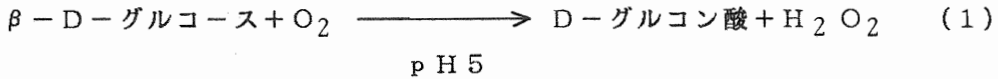


Fig.2 Microporous membrane chemiluminescence flow system

グルコースオキシダーゼ



触媒

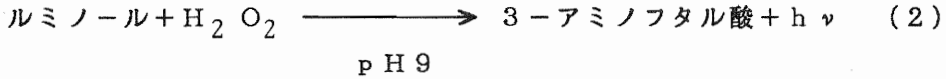


図2に示すような測定系を用いた。この方法で微孔質膜は、試料流にグルコースオキシダーゼを少量ずつ、一定の流量で供給する目的で用いられている。膜フローセルの構成は図3、構造は図4に示すようになっている。

膜として孔径  $0.2\ \mu\text{m}$  のナイロン-66と、非イオン界面活性剤を塗付して湿潤性を持たせた孔径  $0.04\ \mu\text{m}$  のポリプロピレンを用いたが、得られる信号が大きいことと目づまりがおこらないことから、前者の方が優れていた。試薬室に酵素グルコースオキシダーゼとフタル酸塩緩衝液(pH5)を含む試薬溶液を窒素で20kPa程度に加圧して送り込む。そうすると試薬が  $2\sim 5\ \mu\text{l}/\text{min}$  の流量で膜を透過して試料流中にはいる。一方、試料流は  $2\sim 10\ \text{ml}/\text{min}$  の流量で送られているので、試料に対して供給される酵素の量はごくわずかであり、これによって酵素の不必要な消費を避けることができる。試料流中には試料のほかに、ルミノール ( $2 \times 10^{-4}\text{M}$ )、トリス緩衝液(0.02M, pH9.03)、ルミノール反応の触媒セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP) (2.4単位/ml) がはいつている。さて式(1)と(2)を見て明らかかなように、酵素が触媒する酸化反応に最適なpHと、ルミノールの化学発光反

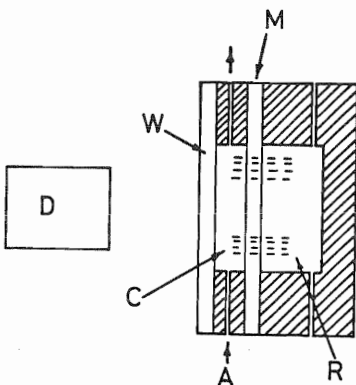


Fig.3 Schematic diagram of flow cell, A:analyte stream; B:reagent reservoir( $\sim 2\text{ml}$ ); M:membrane; W>window; C:cell( $\sim 0.4\text{ml}$ ); D:detector

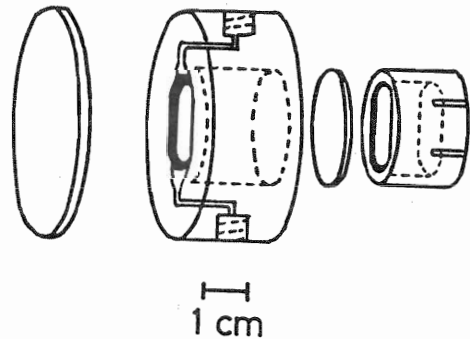


Fig.4 Construction of membrane flow cell

応に最適なpHとは異なっている。本法では膜を透過して流れ出るフタル酸塩緩衝液のために、膜の表面近くでのpHは5.0であるが、試料流母液はトリス緩衝液でpH9.03に緩衝されていて、膜表面と母液との間にpHこう配が生じている。そのために膜の表面近くで反応(1)が、母液中で反応(2)が起こる。この場合には図5に白丸でしめすように検量線は直線になるが、もしHRPを試薬溶液の側に入れると、検量線はわん曲する。これは膜の表面近くの低いpH領域で化学発光反応(2)が起こるためであり、その場合発光強度はHRPの濃度の自乗に比例するからである。滞留時間に相当する30s後に試料流の方の流れだけを止めると、検量線の高濃度側で発光強度は8倍程度強くなるが、低濃度側ではほとんど変化せず、検出限界も改良されない。そして検量線は著しくわん曲する。

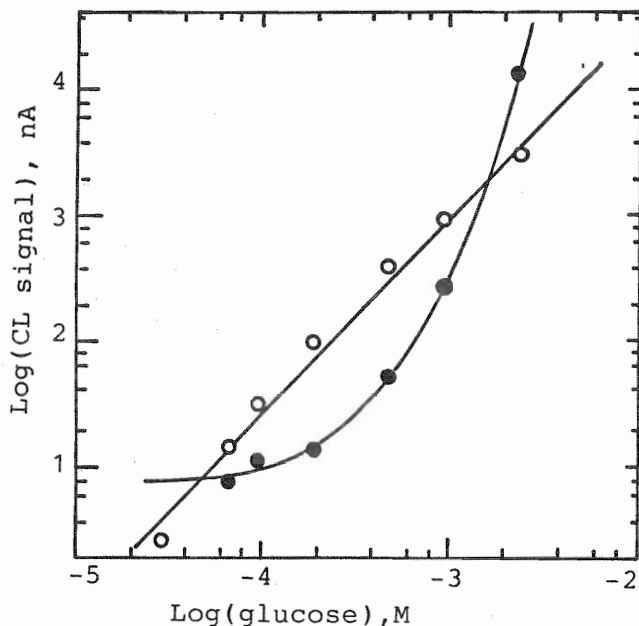


Fig.5 Glucose working curves with HRP on either side of the membrane  
 HRP:horseradish peroxidase

#### 4. 血液及び尿中のアンモニアの定量

アンモニアはOPA 試薬（*o*-フタルアルデヒドとメルカプトエタノールとの混合物）と反応して蛍光物質を生ずる。この反応は非常に鋭敏であるが図6に示すように生成物はかなり不安定である。しかしながら、流れ分析では反応時間（生成物が検出器に達するまでの時間）を厳密に一定に保つことができるので、このような反応でも流れ分析には利用できると考え、筆者らは流れ分析によって環境水中のアンモニアを定量した。<sup>6)</sup> このときの装置を一部改良して図7に示すような測定系を用い、血液および尿中のアンモニアを定量した。<sup>7)</sup>

分離管は微孔質テフロン膜管（内径1.0 mm、外径1.8 mm、長さ350 mm）の内管とガラス管（内径2.5 mm、外径4.0 mm）の外管とからなる二重管構造になっている。外管に蒸留水を満たしておき、注射器内で強アルカリ性(1M)にした試料800 μlを、外管に設けた試料注入口から注入する。遊離したアンモニアは膜を透過して内管中を流れるOPA 試薬と反応し、蛍光検出器で検出される。血液はそのまま、尿は10倍に希釈するだけで分析できる。シグナルはテーリングがはげしいので、ピークに達した時点で外管に水、内管に多量の試薬溶液を流して洗浄する。この洗浄時間を含めて一時間に15検体を分析することができた。結果の一例を表1に示す。

少し脇道にそれるが、最近Schothorst<sup>8,9)</sup>は通常のFIA法で、流路に亜鉛アマルガムカラムを組み込み、塩酸酸性の塩化クロム(Ⅲ)溶液を還元したのち、EDTAを含むpH8.6のトリス緩衝液と混合してクロム(Ⅱ)-EDTAとし、これをキャリアー液で送られて来る $\text{IO}_3^-$ 、または $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ と反応させ、この反応で試薬が酸化されて生ずるクロム(Ⅲ)-EDTAの600 nmにおける吸光度を測定してこれらのイオンを定量している。クロム(Ⅱ)-EDTAは非常に還元力が強く不安定である。しかしながらクロム(Ⅲ)-EDTAは非常に安定である。ところで著者ら

Table 1 Determination of ammonia in blood and urine

Specimen	No.	Ammonia found	
		Present	Conway-IP
Whole blood	1	215 μM	207 μM
	2	256	230
Plasma	3	113	124
	4	134	141
Urine	5	51.3mM	51.8 mM
	6	47.0	49.1

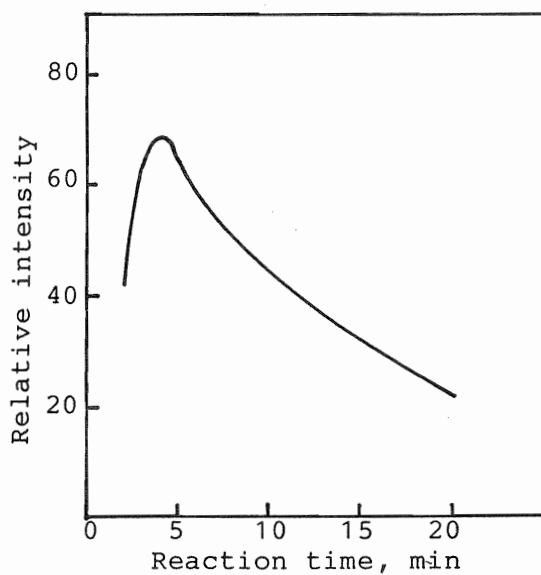


Fig.6 Change of intensity with time

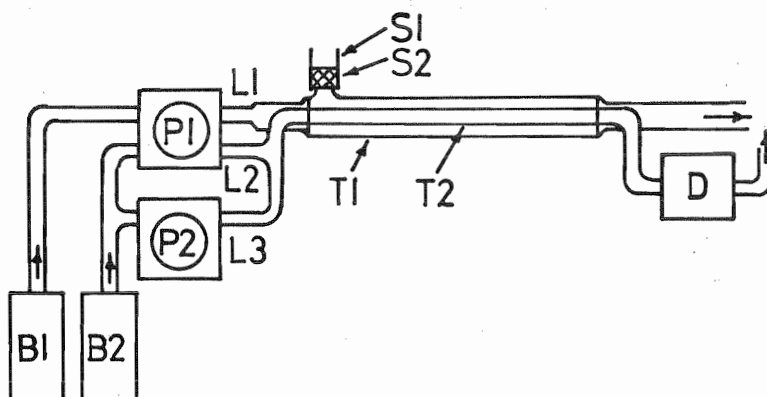


Fig.7 Block diagram of flow system  
 P1,P2:peristaltic pump; L1,L2,L3:tygon tubing;  
 T1:glass tubing; T2:microporous PTFE tubing;  
 S1:protection tubing; S2:septum;  
 B1:doubly distilled water; B2:OPA reagent;  
 D:fluorometer

はこれらの論文で、FIA 法では試薬は滞留時間（通常20~30s）の間だけ安定であればよいので、クロム（Ⅱ）やバナジウム（Ⅱ）のような不安定な試薬でも使うことができ、このような不安定な試薬の使用がFIA 法に新しい未来をひらくであろうという見解を述べている。しかしながら筆者は、試薬が安定であるか不安定であるかはあまり問題でなく、問題とすべきは測定の対象になる化学種、すなわち反応生成物であると考えており、回分法での測定で常に問題になる反応生成物の安定性が流水分析では重要な問題にならず、ここにもFIA 法の特長の一つがあるのではないかと考えている。したがって将来、非常に鋭敏ではあるが生成物が不安定な反応がFIA 法で活用され、FIA 法でなければできないような分析も可能になるのではないかと考えている。

### 5. 膜分離を利用するFIA 法の理論的研究

膜分析がFIA に利用された例は以上で述べた程度であるように思われ、非常に少ないが、膜分離を利用するFIA 法についての理論的研究はvan der Lindenによってすでになされている。<sup>10)</sup>彼は槽列モデルに基づき、分離膜を介して接するキャリアー流と試薬流との間の物質収支から、キャリアー流と試薬流の流量が等しい場合には、試薬流中の分析種の反応生成物濃度（たとえば膜を透過する分析種がNH<sub>3</sub> の場合にはNH<sub>4</sub><sup>+</sup> 濃度）C<sub>p,n</sub><sup>\*</sup> は式(3) で表され、そのピークは式(4) で表される滞留時間t<sub>max</sub> に現われることを理論的に導いた。

$$C_{p,n}^* = \frac{1}{(n-1)!} (f_V t / \Delta V)^{n-1} \exp(-f_V t / \Delta V) \{1 - \exp(-kt / \Delta V)\} C_0 \quad (3)$$

$$t_{\max} = (n-1) \Delta V / f_V \quad (4)$$

ただし、n は槽の数、f<sub>V</sub> は流量、t は滞留時間、ΔV は分離器のキャリアー流および試薬流のそれぞれの体積、k は透過係数（溶液内と膜内との全体の）、C<sub>0</sub> は分析種の濃度である。

式(4) からf<sub>V</sub> t<sub>max</sub> / ΔV は一定であるから、kt / ΔV が小さい場合、すなわち膜自身の透過率が小さいか、あるいは膜を透過する化学種のキャリアー流中の溶解度が高い場合、t<sub>max</sub> において式(3) は式(5) になる。

$$(C_{p,n}^*) t_{\max} \propto (kt_{\max} / \Delta V) C_0 \quad (5)$$

再び式(4) から滞留時間t<sub>max</sub> は流量f<sub>V</sub> に逆比例するので、式(5) は、ピーク

ク高さは濃度に比例し、流量に逆比例することを示している。

一方、 $Kt / \Delta V$  が大きい場合には式(3) は式(6) になり、

$$(C_{p,n}^*) t_{\max} \propto C_0 \quad (6)$$

ピーク高さは流量に依存せず、濃度のみ比例し、検量線は膜の種類によらず一定である。

#### 引用文献

- 1) J. Růžička, 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”、p 81~85、化学同人(1983)。
- 2) H. Baadenhuijsen, H. E. H. Seuren-Jacobs: Clin. Chem., 25, 443(1979) .
- 3) D. Pilosof, T. A. Nieman ; Anal. Chem. , 54, 1698(1982).
- 4) N. L. Malavolti, D. Pilosof, T. A. Nieman; Anal. Chem. , 56, 2191(1984).
- 5) V. Nau, T. A. Nieman; Anal. Chem. , 51, 424(1979).
- 6) T. Aoki, S. Uemura, M. Munemori; Anal. Chem. , 55, 1620(1983).
- 7) 青木豊明、植村 哲、宗森 信；分化、33, 505(1984).
- 8) R. C. Schothorst, J. M. Reijn, H. Poppe, G. den Boef; Anal. Chim. Acta, 145, 197(1983).
- 9) R. C. Schothorst, G. den Boef; Anal. Chim. Acta, 153, 133(1983).
- 10) W. E. van der Linden; Anal. Chim. Acta, 151, 359(1983).

筆者連絡先；〒591 堺市百舌鳥梅町4丁804  
大阪府立大学工学部 環境化学講座