

サイクリック F I A

善木 道雄

岡山理科大学理学部化学科：〒700-0005 岡山市理大町 1-1

1. はじめに

サイクリック FIA とは、試薬溶液を循環させ、その流れの中に試料を注入して検出する、極めて簡単な FIA のことである。これが実現されると、少量の試薬で、試薬を廃棄することなく有効に利用でき、最終的に少量の廃液しか産出しない分析法となる。しかも封鎖系なので、“省エネルギー”、“低コスト”、“ゼロエミッション”あるいは“グリーンケミストリー”の構想に沿った理想的な分析法となる。また、システムが単純化されるので、迅速性、連続定量性、操作性、耐久性に優れ、特に“ルーチン分析”あるいは“モニタリング”には、最適な分析法となる。本稿では、サイクリック FIA 構築のための、基礎的な概念とその応用例について解説する。なお検出系は、汎用性を考え吸光光度検出にかぎって述べる。

2. フローシステム

図 1 のような単一流路のサイクリックフローシステムを用いる。FIA 基本構成の直列配置である。特殊な装置は一切必要ないので、誰にでも簡単にフローシステムを組むことができる。この単純性ゆえに、サイクリック FIA は、迅速性と優れた操作性、耐久性を発揮し、高い精度と再現性を持つ分析データを得ることができる。一方、不安定な試薬とか、多流路を採用しないと分析できない系には、本法は適用できない宿命にある。

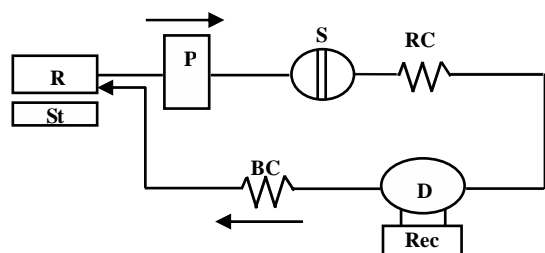


図 1 サイクリックフローシステム

R: 試薬溶液 ; St: 攪拌器 ; P: ポンプ ; S: サンプルインジェクター
RC: 反応コイル ; D: 検出器 ; Rec: 記録計 ; BC: 背圧コイル

3. 試薬再生

循環させている試薬溶液に、試料を連続して注入すると、サイクリック FIA 系内に反応生成物（負荷）が蓄積するので、バックグラウンドが上昇し、ベースラインが不安定となり、ノイズが発生して測定が困難となる。同時に循環溶液中の試薬が消費され濃度が減少するので、感度が低下して定量操作が不可能になる。したがって、反応生成物を除去し、消費された試薬は再生する工夫が必要となる。例えば、沈殿（固体）として除去する、電気分解反応を利

用して目的金属イオンを電極表面に析出させる¹⁾、寿命の短い化学発光現象を利用する²⁾など、いろいろな方法が考えられてきた。ここでは、最近筆者らが提案した“*Inhibitor*（阻害剤）”を共存させる方法と、イオン交換カラムを導入する方法の、二つのサイクリック FIA について、応用例を挙げながら解説する。

4. サイクリック FIA の概念

吸光光度検出による PAR {4-(2-Pyridylazo)resorcinol} を用いる銅(II)の定量³⁾を例に挙げて説明する(図 2)。PAR は EDTA が共存すると、銅(II)と呈色反応しない。EDTA が PAR より安定な銅(II)錯体を生成するからである。これが銅(II)の PAR を指示薬とするキレート滴定の根拠となっている。しかし、FIA では EDTA が共存しても PAR-銅(II)錯体の呈色反応は起こる。すなわち、試薬 (PAR と EDTA を含む) の流れに注入された銅(II)の試料は、プラグとしてテフロンチューブ内を移動する。そのプラグの両境界面で反応が開始されることになる。この時、分散が支配的で混合はまだ起こっていない。当然反応速度に支配されるが、PAR-銅(II)および EDTA-銅(II)錯体生成の競争反応が起こり、PAR-銅(II)錯体の生成に基づく赤色の発色が観察されることになる {EDTA-銅(II)錯体は無色}。これをすばやくフローセルに導き検出する。検出後、さらにテフロンチューブを流れていく過程で、分散に加えて混合が起こり、EDTA-銅(II)錯体の生成が優勢になり、PAR-銅(II)錯体は分解されて PAR が遊離される。この遊離した PAR を試薬だめに戻せば、再度試薬として利用でき、このサイクリックシステムは、遊離の EDTA が消費されるまで継続させることができる。

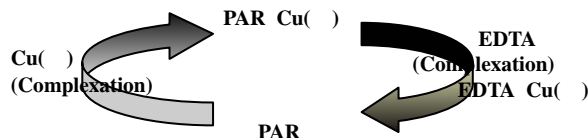


図 2 サイクリックフローシステムの原理

この概念は、FIA の大きな特徴のひとつ、“化学反応は平衡に達する必要がない”ということを利用していることに他ならない。上記の反応において、EDTA は PAR-銅(II)錯体の生成を阻害するので“*Inhibitor*”（阻害剤）として作用している。したがって、本サイクリック FIA は、“*Inhibitor*”共存下で化学反応（検出）を行なう方法と解釈することができる。この解釈を発展させれば、酸の中で塩基を、酸化剤の中で還元剤を、錯形成剤の中で金属イオンを、溶媒の中で固体（沈殿）を、あるいは、それぞれの逆を、検出・定量することができることになる。これ

はバッチ法では絶対不可能なことである。また、必然的に“可逆反応”が望ましいことも理解できる。

5. 連続定量性と感度 (試薬量, サンプルコイル長, 反応コイル長 および流速)

サイクリック FIA は、何回連続定量できるかが重要な評価ポイントである。これは循環する試薬溶液の体積と含有する“**Inhibitor**”の濃度に依存する。同時に注入される試料の濃度にも関連するが、我々の研究室では、環境への負荷を重視して、循環させる試薬量は **50~100 ml** に設定している。この体積は、フロースルー FIA では、ウォーミングアップ量に匹敵するかと思われるが、この量だけで、通常 **300** 回以上の連続定量が可能となった。試料量も連続定量性と感度に大きな影響を与えるが、できるだけ少量のほうがサイクリックには望ましい。また、1 回の試料注入によって、試薬溶液と試料溶液が置換されることになる（結果的に試薬溶液が希釈される）ので、試料注入量は、**20 μl** 前後が望ましい。反応コイルはほとんどの場合不用で、サンプルインジェクターと検出器を直結する（最低有効長 **30~40 cm** は必要、検出器によってはフローセル出入口に約 **1 m** のコイルが巻きつけてある）。流速は分析速度に関連するが、ポンプの安定する **1~3 ml/min** の流速が良い。感度についてみると、試料プラグの界面のみで反応し、“**Inhibitor**”共存下で、しかも反応コイルなしで反応を行なう条件下では、感度は多少犠牲にせざるを得ない。しかしながら、最適化を厳密に行なえば、フロースルー FIA の最適化の値の **50%** 以上の感度は確保できる。

6. 応用例

6-1 強酸・強塩基濃度の定量⁴⁾ (酸・塩基反応への適用)

一般に酸・塩基濃度の定量には、中和滴定法が用いられる。終点を求めるための操作は、時間と熟練を要し、また、かなりの体積の試料と標準溶液が必要となる。Imato ら⁵⁾ は、FIA において、pH 指示薬を含有する緩衝溶液に酸や塩基の試料を注入すると、試料の濃度に応じて pH 指示薬が変色し、検出シグナルのピーク高が酸・塩基の濃度に比例することを見出した。それまでの FIA は、小型の滴定フラスコをラインに組み込んで滴定曲線を求めていたことから比べると画期的なことであった。緩衝溶液は pH 変動に対して“**Inhibitor**”であるので、容易にサイクリック化できる。

表 酸・塩基定量サイクリック FIA の最適条件

項目	最適値
試薬溶液量	100 ml
メチルオレンジ濃度	1.5×10^{-4} M
酢酸緩衝液	0.1 M
pH	4.7
試料注入量	2 μl
流速	2.5 ml/min
反応コイル長	3 m
背圧コイル長	10 m

波長

530 nm

表 I に最適化された強酸・強塩基濃度の定量のためのサイクリック FIA 条件を示す。Imato らは、メチルレッドを検出試薬に用いたが、ここではメチルオレンジを用いている。いずれにしても緩衝液の pH に近い pKa を持つ pH 試薬を選ぶのがポイントで、ベースラインを記録計の中心へ持っていけば、酸と塩基を同時に測定できる。図 3 に水酸化ナトリウムと塩酸で作成した検量線のフローチャートの一例を示す。この場合、記録計の極性を反転してある。

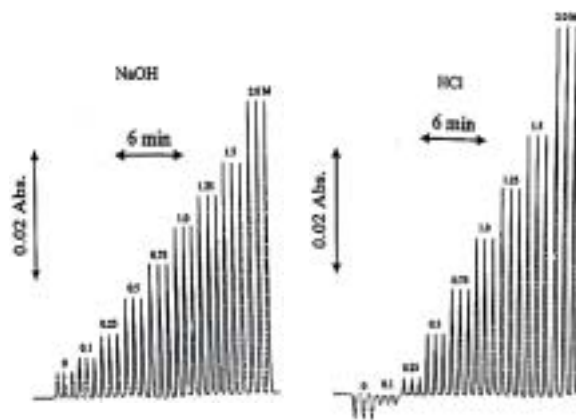
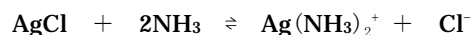


図 3 塩酸・水酸化ナトリウムのフローシグナル

6-2 塩化物イオンの定量⁶⁾ (沈殿反応への適用)

塩化物イオンの FIA 定量には、チオシアン酸水銀(II)と鉄(III)を用いる方法（内海法）と硝酸銀を用いる方法がある。いずれも不溶性沈殿の生成に基づいているので、フローセルやテフロンチューブを詰まらせる危険性を持っている。また、地球環境、廃液処理上からも、水銀化合物の使用は出来るだけ避けたい。塩化銀の沈殿は、次式に示すようにアンモニアに溶解して銀-アンミン錯体を生成する。



この反応は可逆反応であるので、サイクリック FIA が適用できる。すなわち、過剰のアンモニアを含む硝酸銀溶液（銀-アンミン錯体）を循環させる。塩化物イオンを含む試料を注入すると、上式にしたがって、試料プラグの両端で塩化銀が析出するので、この濁度を分光光度計で瞬時検出する。フローセルを通過した塩化銀の沈殿は、テフロンチューブを流れる過程で、共存する多量のアンモニアに溶解して、銀-アンミン錯体（無色）となり、試薬だめに戻り、試薬として再利用される。沈殿が溶解してリサイクルされるので、沈殿生成に伴うラインのつまりなどのトラブルは、まったく発生しない。表 II に、天然水中の塩化物イオンの定量のために最適化された FIA 条件を示す。

試薬溶液中には、銀に対してアンモニアがモル比で約 **2.7** 倍添加されている。濁度検出による感度不足を試料注入量 (**100 μl**) で補っている。そのため試薬量 (**250 ml**) も若干多い。本法は、水道水、河川水などの実試料へ適用され、イオンクロマトグラフィーの結果とも良く合致した結果を得ている。塩化物イオンは、地球上のどこにも存在するイオンで、高価な銀溶液の節約と廃液量低減を考え

合わせると、実用性の高い方法だと考えられる。

表 塩化物イオン定量サイクリック FIA の最適条件

項目	最適値
試薬溶液量	250 ml
AgNO ₃ 濃度	0.03 M
NH ₃ 濃度	0.08 M
試料注入量	100 μl
流速	2 ml/min
反応コイル長	0(有効長 1 m)
背圧コイル長	10 m
波長	500 nm

6-3 亜鉛イオンの定量⁷⁾ (錯生成反応への適用)

前述の発色試薬 PAR に変えて、さらに水溶性と高感度性を付加した 5-Br-PAPS を用い、“Inhibitor”に EDTA を用いて、亜鉛の連続定量サイクリック FIA が検討された。

表 亜鉛のサイクリック FIA 最適条件

項目	最適値
試薬量	100 ml
5-Br-PAPS 濃度	2.5×10^{-5} M
EDTA 濃度	1.5×10^{-5} M
ホウ酸緩衝液	0.04 M
pH	8.7
試料注入量	20 μl
反応コイル長	0 cm(有効長 40 cm)
背圧コイル長	2 m
流速	1.2 ml / min
波長	552 nm

最適化された FIA 条件を表 III に、100 回連続定量のフローシグナルとその前後に作成した検量線を、EDTA 添加しない時と、添加した時を比較しながら図 4 に示す。

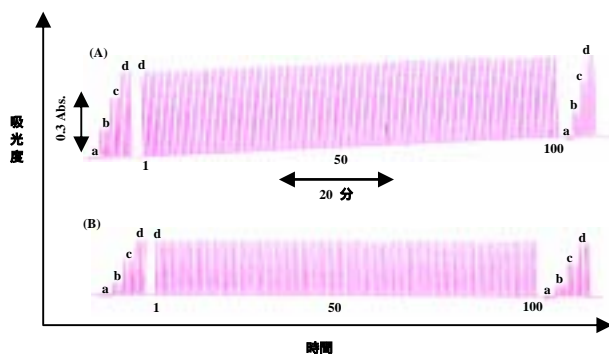


図 4 100回連続定量のフローシグナル
(A):EDTAなし, (B):EDTA(5×10^{-5} mol dm⁻³); 亜鉛濃度(ppm) : (a) 0; (b) 1.0; (c) 2.0; (d) 3.0.

図 4 に見られるように、100 回連続定量によるフローシグナルは、極めて精度・再現性とも優れたものが得られる。これは、すべてのサイクリック FIA に共通しており、その原因は、フローシステムの単純性に基づいている。また、長時間 (9 時間) の連続運転でも、再現性の良い検量線が得られ、いつ何時の分析にも対応できる。5-Br-PAPS は亜鉛ばかりでなく、Cu(II)、Ni(II)、Co(II)などと高感度に呈色反応することが知られている。本法は、これら重金属イオンのモニタリング法、例えば廃水処理場の末端におけるセンサーとして応用できると考えられる。

6-4 アスコルビン酸の定量⁸⁾ (酸化還元反応への適用)

図 5 のような酸化還元反応系を用いて、アスコルビン酸定量のサイクリック FIA が検討された。

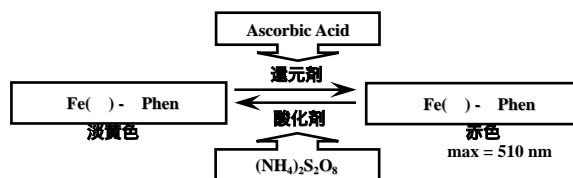


図 5 サイクリックフローシステムの原理

試薬溶液には、フェナントロリン-鉄(III)錯体に、“Inhibitor”として過硫酸アンモニウムを多量に共存させている。フェナントロリン-鉄(III)錯体は、ほとんど無色に近く、アスコルビン酸によりフェナントロリン-鉄(II)錯体となり、赤色に発色するのでこれをモニターすれば良い。最適化された FIA 条件を表 IV に示す。鉄：フェナントロリンは 1：3 の理論値通りに調製されている。過硫酸アンモニウムの濃度が鉄(III)の濃度の約 100 倍にもかかわらず、アスコルビン酸の還元反応が進行するのは驚異である。明らかに反応速度の違いによるものと推察される。また、過硫酸アンモニウムによる鉄(II)→鉄(III)の酸化反応も遅いので、50 m もの時間延長コイルを取り付けている。このように反応速度差を巧みに活用すれば、可逆的な反応も多くのもが知られているので、サイクリック FIA の適用範囲も広がっていくと考えられる。

表 アスコルビン酸のサイクリック FIA 最適条件

項目	最適値
試薬量	50 ml
Fe() 濃度	3.0×10^{-4} M
フェナントロリン濃度	9.0×10^{-4} M
過硫酸アンモニウム	5×10^{-2} M
酢酸緩衝液	0.2 M
pH	4.5
試料注入量	20 μl
反応コイル長	0 cm(有効長 80 cm)
背圧コイル長	50 m
流速	1.0 ml / min
波長	510 nm

7. イオン交換カラムの導入^{10), 11)}

上で述べたような“**Inhibitor**”を共存させる方法を“化学的”とすれば、反応生成物を“物理的”に取り除く方法も考えられる。例えば、沈殿として除去する、あるいは、吸着体に反応生成物のみを吸着除去する⁹⁾などが考えられるが、これらの方法は、化学反応系になら影響を及ぼさず、簡単、平易で推奨できる。しかし、これらの方法を採用する場合には、試薬は無色透明のものに限定され、試薬溶液を比較的高濃度に調製でき、試料との反応による試薬の消費を無視できるものでなくてはならない。

フローセルの後に、イオン交換樹脂を充填したミニカラムを装着するのは、応用範囲も広く非常に有力な方法であるので紹介しよう(図6)。

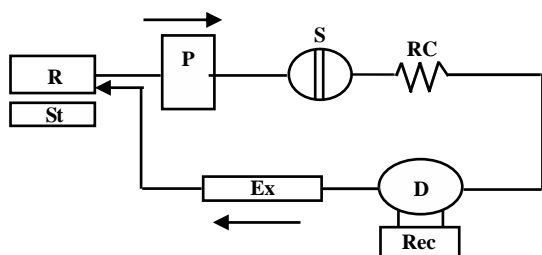
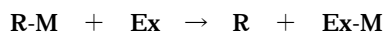


図6 サイクリックフローシステム

R: 試薬溶液; St: 攪拌器; P: ポンプ; S: サンプルインジェクター
RC: 反応コイル; D: 検出器; Rec: 記録計; Ex: イオン交換カラム

FIAへ用いられる発色試薬は、分子内にスルホン酸基を導入して、水溶性を付与したものが多用されている。これらは陰イオン性であるので、陽イオン交換樹脂には吸着されず排除される。この点に着目して、次の配位子交換反応を組み込めば、サイクリックFIAが完成する。



ここでRはスルホン酸基を持った発色試薬、Mは金属イオン、Exは陽イオン交換樹脂を表す。この場合、イオン交換樹脂は“**Inhibitor**”と考えることもできるが、試薬を再生する“**Releaser**”でもあり、金属イオンを捕集・回収する“**Accumulator**”でもある。

この方法を用いて、アルセナゾⅢを発色試薬とする鉛(Ⅱ)の連続定量法が検討された。サイクリックFIA条件を表Vに示す。アルセナゾⅢは砒素を含有する試薬であるので、したがって、用いる試薬、試料共どちらも有害元素というモデルとして検討されている。用いるイオン交換樹脂(市販)の交換容量に大きく依存すると考えられるが、300回の鉛溶液の連続定量においても、ベースライン、シグナル強度ともまったく変動しない良好な連続定量性を得ている。

表 V 鉛(Ⅱ)のサイクリックFIA最適条件

検討項目	最適値
試薬量	50 ml
アルセナゾ-	1.0×10^{-4} M
酢酸緩衝液	0.1 M
pH	4.7
試料注入量	20 μ l
反応コイル長	0 cm(有効長 100cm)
流速	1.5 ml / min
波長	655 nm
樹脂種類	Amberlite IRC-748
樹脂重量	0.5 g

カラム長 7×0.4 (i.d.) cm

イオン交換カラムの使用は、濃縮、マトリックス除去、妨害イオン除去に用いられる有力な手法である。FIAに導入すると、オンライン前処理法と定義づけることができ、普通、サンプルインジェクターと組み合わせて、フローセルの前に装着される。本法は、フローセルの後にイオン交換カラムを導入する例としてもめずらしいが、有害な鉛(試料と共存するその他の住金属イオンも)をカラム内に濃縮・回収することになり、オンラインで廃水処理の工程を同時に行なっていると解釈することもできる。また、同時に背圧コイルの役割も担っており、本サイクリックFIAは、イオン交換樹脂の持つ機能を十分に発揮させている。

8 おわりに

サイクリックFIAすなわち循環式FIAについて、著者らの最近の研究を中心に解説した。試薬を繰り返し利用し、廃液を最小限にしか排出しないサイクリックFIAは、スケールのにはマイクロ(チップ)化されたものには敵わないが、それでも“ゼロエミッション”を志向した分析法開発の近道にいと確信する。FIAの特徴を最大限取り込んで発揮させ、それを簡単、単純、無駄のない分析法へ仕上げていく努力を積み重ねていけば、“**Clean Analytical Method**”への道は、かならず開けてくると思う。読者のサイクリックFIAへの理解と、今後の研究・開発に何かの参考になれば幸いである。

参考文献

- 1) S. M. Ramasamy, H. A. Mottola: *Anal. Chim. Acta*, **127**, 39 (1981).
- 2) 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **36**, 316 (1987).
- 3) M. Zenki, Y. Iwadou, T. Yokoyama: *Anal. Sci.*, **18**, 1077 (2002).
- 4) 善木道雄, 中北吉彦, 小松愛可, 横山 崇: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **49**, 121 (2000).
- 5) T. Imato, N. Ishibashi: *Anal. Sci.*, **1**, 481 (1985).
- 6) M. Zenki, Y. Iwadou: *Talanta*, **58**, 1055 (2002).
- 7) M. Zenki, M. Ideshima, M. Taniguchi, A. Katoh, T. Yokoyama: *Anal. Sci.*, **21**, 517 (2005).
- 8) M. Zenki, A. Tanishita, T. Yokoyama: *Talanta*, **64**, 1273 (2004).
- 9) 南澤一慶, 横山 崇, 善木道雄: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **53**, 1021 (2004).
- 10) M. Zenki, T. Masutani, T. Yokoyama: *Anal. Sci.*, **18**, 1137 (2002).
- 11) 善木道雄, 南澤一慶, 横山 崇: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **52**, 1131 (2003).
- 12) M. Zenki, K. Minamisawa, T. Yokoyama: “13th International Conference on Flow Injection Analysis”, Las Vegas, USA, (2005).

(Received June 20, 2005)

