

フローインジェクション分析法による 同時定量

小熊 幸一・黒田 六郎

千葉大学工学部分析化学教室
〒260 千葉市弥生町

Simultaneous Determinations by Flow-Injection Analysis

Koichi Oguma and Rokuro Kuroda
Laboratory for Analytical Chemistry
Faculty of Engineering
University of Chiba
Yayoi-cho, Chiba 260

1. 緒 言
2. 通常FIAによる同時定量
 - 2.1 複数検出器の利用
 - 2.1.1 直列配置方式
 - 2.1.2 並列配置方式
 - シングルインジェクション-試料ゾーン分割法
 - ダブルインジェクション法
 - ゾーンサンプリング法
 - 2.2 単一検出器の利用
 - 逐次注入法
 - ダブルインジェクション法及び試料ゾーン分割法
 - 試料ゾーン分割-再合流法
 - pHグラジエント法及びマスキング剤添加法
 - オンライン-カラムの利用及びHPLC-FIA
 - マルチチャンネル検出器の利用ほか
3. 反応速度差FIAによる同時定量
 - 3.1 複数検出器の利用
 - 3.2 マルチ検出器の利用
 - 3.3 単一検出器の利用
 - シングルインジェクション法
 - 試料ゾーン分割法
 - 試料ゾーン分割-再合流法
 - ダブルインジェクション法
4. 文 献

1. 緒言

フローインジェクション分析法 (FIA) は、1975年に Růžička と Hansen により導入されて以来、自動流れ分析法として著しい発展をとげてきている。その発展の根拠は、次にあげる FIA の 3 大特長に求めることができる: (1) sample injection, (2) controlled dispersion, (3) reproducible timing。以下に紹介する FIA による同時定量の諸研究は、すべてこれらの優れた特長を巧みに活用して行われたものであり、FIA にして初めて可能な同時定量法も少なくない。

FIA の適用範囲はきわめて広く、理学、工学、農学、薬学、医学とあらゆる分野に及ぶが、同時定量の研究は多数の検体を対象とし、しかも同一検体中の複数の成分を定量する必要性の高い臨床化学、環境化学、農学に関連したものが多い。特に最近では環境問題からの要請もあって、いわゆる speciation の研究が注目される。

本総説では、FIA による同時定量法を Luque de Castro らの総説¹⁾ にならい通常の FIA と反応速度差を用いる FIA とに大別し、分析システムに重点を置いて紹介したい。

2. 通常 FIA による同時定量

2.1 複数検出器の利用

分析システムにおける検出器相互の位置関係が直列か並列かによって、さらに分類することができる。

2.1.1 直列配置方式

最も簡単な例は電位差法を使う場合で、FIA システムの検出部に複数のイオン選択性電極 (ISE) を直列に配置すればよく、マニホールドは至って簡単である。Hansen ら²⁾ が血清中の Ca と pH の測定に用いたシステムではキャリアーに注入された試料は先ず流通形キャピラリーガラス電極を通して pH が測定され、次いで Ca 電極を装着したセルに送られる。本システムの分析速度は毎時 100 試料である。なお、2本の ISE を 180° より少し小さい角度で向かい合せ上下に少しずらしてセルに装着し、1本の参照電極を共用するシステムもある³⁾。本システムでは、キャリアーに注入された試料はカスケード状に 2本の電極に接触する。土壌抽出物及び血清中の Na と K の定量を目的としている。

検出器に 2台の分光光度計を用いた廃水中の COD と全リンの同時測定法がある⁴⁾。本法では、キャリアーに注入した試料水に Ce(IV) を反応させ、最初の分光光度計で残存 Ce(IV) の吸光度を測定して COD を求める。このとき同時に全リンが分解される。フローセルを通過した試料ゾーンにモリブデン試薬を反応させ第 2の分光光度計でリンを吸光定量する。本システムは連続運転が可能ないように設計、製作されており、工場廃水モニタリングへの適用が検討されつつある。

リン酸とホスホン酸を同時定量するには、試料を Mo(V)-Mo(VI) 試薬と反応させ最初の分光光度計により先ず P(V) を検出する。次いで試料-試薬の混合物に NaHSO₃ を加えて P(III) を P(V) に酸化、発色させて第 2の分光光度計により P(III) + P(V) を測定する。本システムは、液体クロマトグラフの検出器に用いると P(III) と P(V) 単位を持った種々のオキソ酸の分離、

同定に有用である⁵⁾。

分光光度計と原子吸光装置を直列に結合したシステムもあり、2つのグループがこれをFe(II)と全Feの定量に用いている^{6) 7)}。原理は簡単で、先ずFe(II)を1,10-フェenantロリン(1,10-phen)法により吸光定量し、フローセルを通った試料ゾーンを原子吸光装置に送って全Feを定量する。同様な発想で、Cr(VI)をジフェニルカルバジド(DPC)法により吸光定量し、全Crを原子吸光法により定量すればCrのspeciationが可能である⁷⁾。

2. 1. 2 並列配置方式

シングルインジェクション-試料ゾーン分割法 このタイプの例として、先ず Basson⁸⁾によるCl⁻とSO₄²⁻の定量がある。用いたシステムはFig.1に示したとおりで、Cl⁻をHg(SCN)₂法、SO₄²⁻をBaSO₄懸濁法により定量する。このシステムはオートサンプラーを備

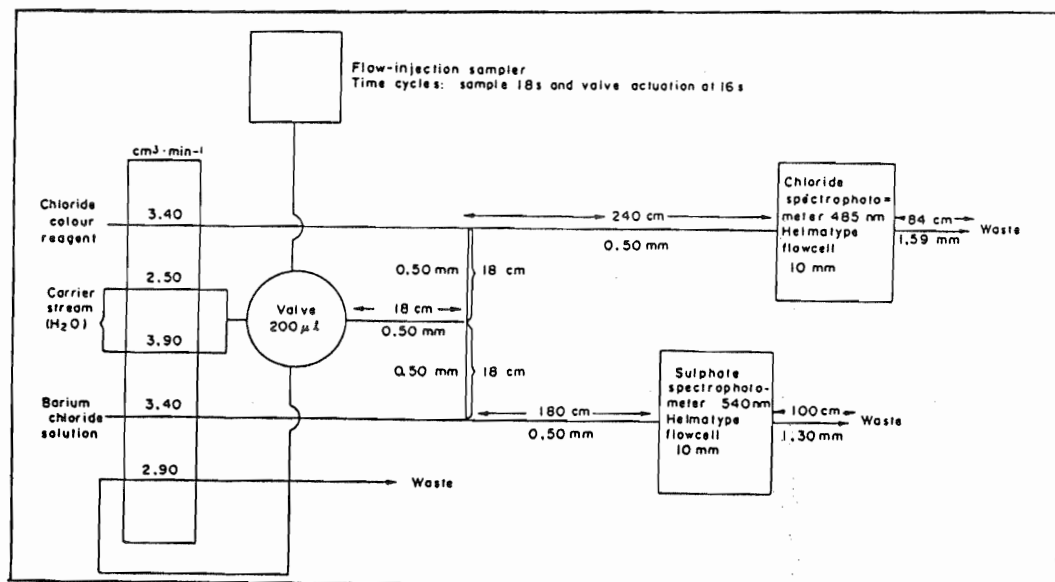


Fig. 1. Flow system for the simultaneous determination of chloride and sulphate.

えており、1時間当たり200試料の高速処理ができる。

2台の分光光度計を並列に配置したシステムによってもP(III)とP(V)の同時定量が可能である⁹⁾。水の流に試料を注入したのち2分割し、前述のシステム⁵⁾で用いた発色反応を各 sub-systemにおいて平行して行わせ、それぞれP(V)及びP(V)+P(III)を測定する。

FIAにおける液-液抽出は、液体クロマトグラフィーのpost column detector、原子吸光法の予備濃縮、多重抽出などに用いられているが、一般には相分離のち一方の相、主として有機相を検出器に送り込む。ところが、親水性と親油性の2種類の膜を取り付けた相分離器により両相を別個に取りだし、各相をそれぞれの検出器に導けば、親水性及び親油性成分の同時定量が行える¹⁰⁾。すなわち、pH 10においてdiphenhydramineは定量的にシクロヘキサンに抽出され、8-chlorotheophyllineは水相に残る。従って、これらの化合物を含むシクロヘキサン-水(pH 10)混合物をFig.2に示した相分離器に通すとdiphenhydramineはシクロ

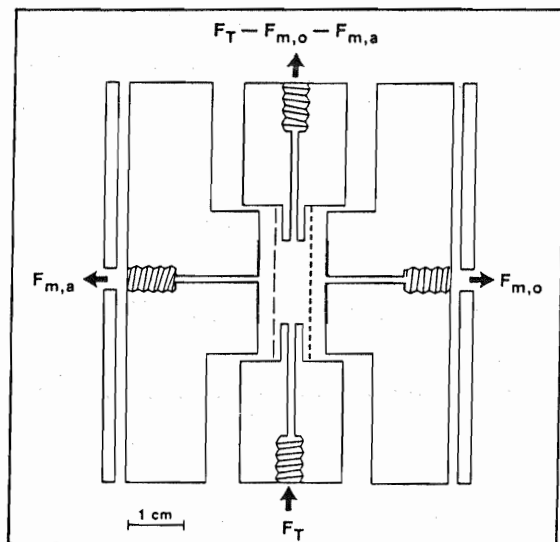


Fig. 2. Cross section of the dual-membrane phase separator. Teflon membrane (---) paper membrane (----); F_T total flow rate is the sum of F_o and F_a (organic plus aqueous); $F_{m,o}$ and $F_{m,a}$ are flow rates through the Teflon and paper membranes, respectively.

ヘキサンとともにテフロン膜を通過して一方の分光光度計に送られ、8-chlorotheophyllineは親水性のろ紙を通ってもう一方の分光光度計に送られ、それぞれの吸光度が測定される。本システムは1時間当り120試料の分析速度を持ち、錠剤中のこれら2成分の定量に適用されている。

Bassonら¹¹⁾は、フレイム光度計と原子吸光光度計を併用するFIAシステムを考案し、水試料の分析に利用している。本法では試料を水の流れに注入し、試薬溶液(Li, La, Csを含む)と合流させたのち2分割し、両検出器に送る。2チャンネル原子吸光装置によりMgとCaを定量し、フレイム光度計によりNaとKを測定する。分析速度は毎時128試料である。

ダブルインジェクション法 2台の分光光度計と選択的発色試薬を組み合わせると鉄のspeciation用システムができる¹²⁾。2つのキャリアーに試料を同時に注入、一方の流れにはKSCNを反応させてFe(III)を定量、他の流れには1,10-phenを反応させてFe(II)を定量する。本システムは、geological core samplesの塩酸抽出液中の鉄のspeciationに応用されている。

ゾーンサンプリング法 エリオクロムシアニンR法で植物試料中のAlをFIA定量するには、この方法が高感度であるため高度の分散を必要とする。一方、同試料中のFeをフレイム原子吸光法により定量する場合、酸分解した試料をなるべく希釈せずに(低分散で)測定することが望ましい。この相反する分散への要求の問題をZagattoら¹³⁾はこのゾーンサンプリング法を適用して見事に解決した。すなわち、試料溶液を水の流れ(第1のキャリアー)に注入して試料ゾーンの分散を起させる。時間 Δt 経過後このゾーンの一部を抜きとり、第2のキャリアーに導入、新たな試料ゾーンとして分散を起させたのち発色試薬を反応させ、

分光光度計に送ってAlを測定する。第1キャリアー中の試料ゾーンの残分はそのまま原子吸光装置に導きFeを定量する。本法はマーキングゾーン法の併用で試薬消費量を低減させ得る。分析速度は毎時約120試料、r.s.d.は2%以下。FIAならではの巧妙な定量法である。

2.2 単一検出器の利用

逐次注入法 本法は、同一のシステムを使いながら、目的成分のいずれかに注目してその成分に適した発色条件(試料と試薬の流路)を設定しつつ、目的成分を順次定量していくもので、1回の試料注入で目的成分の全てを同時に定量するものではない。

Fig. 3 に示した injector commutator は、Ginéら¹⁴⁾ が水試料及び土壌抽出物中の NO_2^- と NO_3^- の定量のために考案したものである。Mの先にある分光光度計でアゾ色素の吸光度を

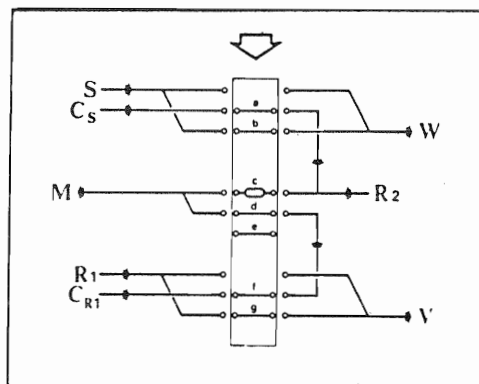


Fig. 3. Schematic diagram of the injector commutator in the position for nitrate plus nitrite analysis.

a, b: sample loops; c: reduction column; d, e: connectors;
f, g: reagent loops; M: manifold; S: sample; C_S , C_{R1} : carriers;
 R_1 : color-forming reagent; R_2 : masking, buffering and catalytic reagent; W: waste; V: reagent recovery vessel.

モニターする。インジェクターを図に示した位置に設定するとaにある試料がキャリアー C_S に載って R_2 (マスキング剤、触媒、緩衝剤を含む)と合流、cの還元カラムを通過したのちfに担持されていた発色試薬 R_1 により発色し分光光度計に達する。これで NO_2^- と NO_3^- の含量が求まる。次にインジェクターを図の上方向に動かすとbにある試料が C_S に載り、cは単なるコネクターdに替って試料中の NO_2^- のみが定量される。

システム構成は異なるが、試料をカドミウムカラムを通すか迂回させるかにより NO_2^- と NO_3^- を分別比色定量する方法が陸水¹⁵⁾及び海水¹⁶⁾に適用されている。

Reisら¹⁷⁾は多重比例インジェクターを考案、マーキングゾーン方式で使用して植物試料中の窒素とリンの逐次定量を行った。定量はそれぞれBerthelot及びモリブドリン酸の反応による。インジェクターを一方の位置に設定するとリンの定量のための試料と試薬が分析システムに導入され、同時に窒素の定量に必要な試料と試薬がインジェクターの対応するサンプルループに担持される。インジェクターを切り替えると今度は窒素の定量が実行され、合

せてリンの定量の準備がなされる。

Fe(III)のSCN⁻による吸光定量は古くから使われているが、2チャンネル切り替えバルブの操作により、SCN⁻のみを試料に反応させることによりFe(III)を、SCN⁻とH₂O₂を反応させることによってFe(II)+Fe(III)を測定することができる¹⁹⁾。また、1,10-phenのみを反応させればFe(II)が定量でき、アスコルビン酸と1,10-phenを反応させればFe(II)+Fe(III)が測定できる¹⁹⁾。なお、後者の反応を用いるFe(II)/Fe(III)のspeciationの方法とDPC-Ce(IV)系を用いるCr(III)/Cr(VI)のspeciationを合せ報告した論文もある²⁰⁾。さらに、DPC-Ce(IV)系によるCr(III)/Cr(VI)のspeciationの方法は、合成試料及び皮革処理プラントの廃水への適用が試みられている²¹⁾。

逐次注入法によるCa/Mgの同時定量も行われている²²⁾。他金属のマスキング剤を含むpH 10のNH₄OH-NH₄Cl緩衝溶液(キャリアー)に試料を注入、2-(2-hydroxy-3,6-disulfo-1-naphthylazo)-5-(N,N-diethylamino)phenol 溶液と合流させてMgとCaを同時に発色させ530 nmの吸光度を測定する。次に、Caのマスキング剤としてBa-BGTAを加えた上記緩衝溶液をキャリアーとしてMgのみを測定、先の含量よりMg量を差し引いてCa量を求める。本法は、水道水及び血清中の両金属の定量に適用され好結果を与えている。

廃水中の汚染物質規制に対して高い関心が寄せられている折、陰イオン性²³⁾及び陽イオン性²⁴⁾汚染物質を逐次同時定量するシステムが考案されている。本システムでは試料水の流りに目的成分の発色試薬を注入するreverse FIA(rFIA)を採用、各試薬のインジェクションバルブや合流点の位置を巧みに設定して、主マニホールドを全成分に共通して利用できるようにしている。S²⁻、CN⁻及びpH測定用マニホールドをFig.4に示す²³⁾。切り替えバ

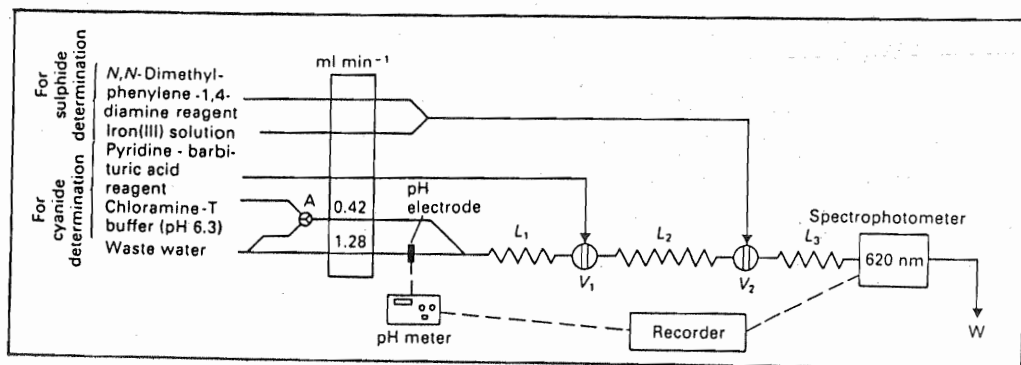


Fig. 4. Manifold for the simultaneous determination of pH, sulphide and cyanide in waste waters.

A: diverting valve; L₁, L₂, L₃: reactors; V₁, V₂: injection valves; W: waste.

ルブAは、CN⁻の定量にはクロラミンT(pH 6.3)を、S²⁻の定量には試料(廃水)を分析システムに採り入れ、各成分の発色に適した条件を作る役割を果たす。この他NO₂⁻-CN⁻-pH²³⁾並びにCu(II)-Fe(III)-Al(III)-NO₂⁻-pH²⁴⁾を測定するマニホールドが提案されており、廃水分析用FIAシステムの開発に参考となる。

森田ら²⁵⁾によれば、フローインジェクション-原子蛍光法によってHgのspeciationが可能で、無機Hgの定量にはSnCl₂を、総Hgの定量にはNaBH₄/Fe(III)を還元剤として用いる。総Hg量と無機Hg量の差から有機Hg量が求まる。

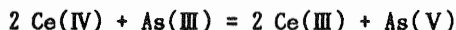
Mn(II)とFe(III)は、サリチルアルデヒドチオセミカルバゾンのH₂O₂による酸化反応を促進するが、この現象はppbレベルのこれら両元素の定量に利用することができる。ただし、目的元素ごとに最適化した試薬濃度及びpHのキャリアーに試料を注入する必要がある²⁶⁾。

B₆ピタマーの定量は臨床化学上興味を持たれている。最近Linaresら²⁷⁾はpyridoxalとpyridoxal 5-phosphateをCN⁻存在下で、それぞれに適したpH条件で酸化して生ずる物質の蛍光を測定し、ヒト血清中の両ピタマーを逐次定量している。10⁻⁶Mレベルの平均誤差は±10~15%。なお、本研究では、反応速度差法も試みられている。

rFIAをポルタンメトリーと組合せ、水栽培用水中のPO₄³⁻(0.5~50×10⁻⁶M)とNO₂⁻(0.5~5×10⁻⁶M)の逐次定量が行われた²⁸⁾。PO₄³⁻の定量には試料(脱気不要)の流れに酸性モリブデン酸塩溶液を、NO₂⁻の定量には酸性臭化物溶液を注入する。用いるグラッシーカーボン電極の電位は、PO₄³⁻に対しては+0.22 V(vs. S.C.E.)、NO₂⁻に対しては+0.30 V(vs. S.C.E.)に設定する。本法は、rFIAであるため高感度であると同時にグラッシーカーボン電極の試薬による汚染が少ない。

Feのspeciationはアンペロメトリーによっても可能で、印加電圧はFe(II)に対して0.8 V(vs. S.C.E.)、Fe(III)に対して0.2 V(vs. S.C.E.)にそれぞれ設定する。酸分解した標準岩石試料中のFe(II)とFe(III)の定量結果は、ポーラログラフィーによる結果とよく一致している²⁹⁾。

ダブルインジェクション法及び試料ゾーン分割法 SCN⁻及びI⁻は次の酸化還元反応に接触作用を及ぼす。



I⁻の触媒活性はAs(III)が存在しないとCe(IV)により死活するが、過剰のAs(III)を添加すると十分に復活する。一方、SCN⁻の活性はCe(IV)との反応により一旦死活すると過剰のAs(III)を加えても復活しない。これらの性質を巧みに利用したSCN⁻とI⁻の定量システムを示したのがFig.5である³⁰⁾。試料はダブルインジェクターにより同時に2つのキャリアーに注入し、

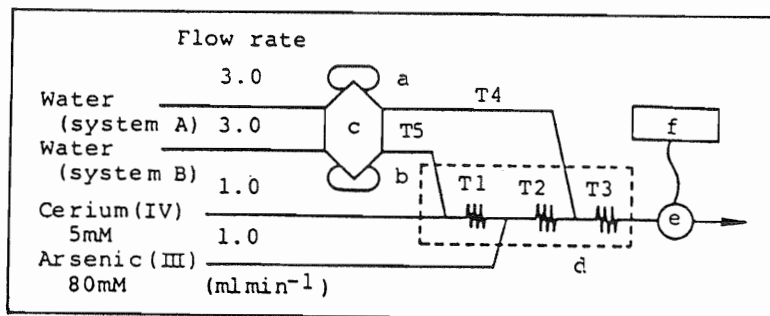


Fig. 5. Block diagram of FIA for simultaneous determination of thiocyanate and iodide.

a, b: sample loops; c: switching valve; d: thermostated water bath; e: spectrophotometer; f: recorder; T1, T2, T3: 2 m × 1 mm i.d. PTFE tubings; T4, T5: 30 cm × 1 mm i.d. PTFE tubings.

Ce(IV)の黄色の退色を254 nmでモニターする。SCN⁻とI⁻の含量はシステムAにより求まり、システムBではI⁻のみが求まる。検出感度は、SCN⁻ 0.2 ppm、I⁻ 0.1 ppmである。

Cu(II)とHg(II)の同時定量は、それぞれジピリジルケトンフェニルヒドラゾン及び2,2'-ジピリジルケトンヒドラゾンの酸化反応を促進することに基づきダブルインジェクション法により定量することができる³¹⁾。感度改善のためマイコン制御のstopped flow modeを用い、2種の酸化反応生成物の蛍光をモニターし、2本の連続したシグナルを得る。なお、Cu(II)はHg(II)の定量を妨害するので、エチレンジアミンの添加によりマスクする必要がある。

FIA研究の初期に、Stewartら³²⁾は、試料ゾーン分割方式により植物試料中の窒素とリンの定量に成功した。すなわち、希硫酸の流れに注入した試料ゾーンを2分割し、一方の流れはフェノール-次亜塩素酸法による窒素の定量に、他の流れはモリブデン青法によるリンの定量に用いる。発色した試料ゾーンは、同一光路上に設置した2個のフローセルにそれぞれ送られるが、滞在時間が異なるのでリンと窒素のシグナルは重なることはない。

Fig.6に示すシステム(2チャンネル吸光モニターを含む)を用いれば、Shinn法によりNO₂⁻とNO₃⁻を同時定量することができる³³⁾。本システムは、ほぼ等しい2つのsub-systemより成るが、上のsub-systemでNO₂⁻の定量が行われる。また、下のsub-systemでは還元カラムにより80-90%の効率でNO₃⁻が還元され、NO₂⁻とNO₃⁻の含量が測定される。海水の分析に適用する際の問題点が若干検討されているが、実際の定量値は示されていない。

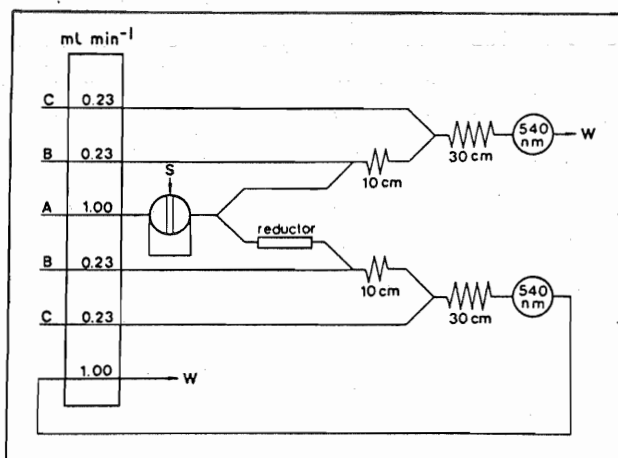


Fig. 6 Flow diagram for the determination of nitrite and nitrate.

A: carrier stream; B: sulfanilamide solution; C: diamine solution;
S: sample; W: waste.

試料ゾーン分割-再合流法 Fig.7に示したシステムは、Fe(II)と全Feの定量用に考案されたものである³⁴⁾。キャリアーに注入された試料は2分割され、一方のsub-bolusはJones還元カラムを通ったのち1,10-phenと反応、全Feのシグナルを与え、他方のsub-bolusは1,10-phenと反応してFe(II)のシグナルを与える。両sub-bolusはシステム内滞在時間が異なり、2本の連続したピークが検出される。

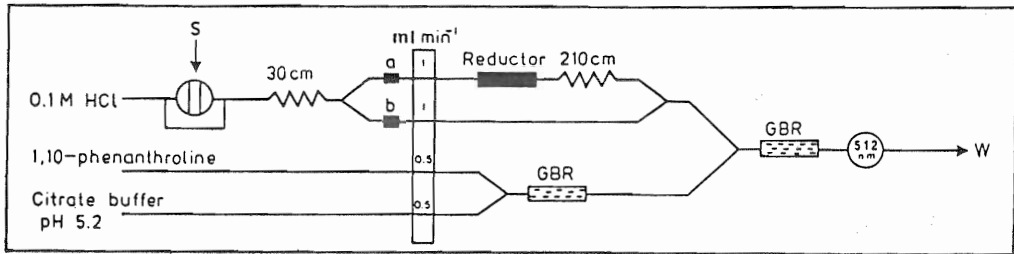


Fig. 7. Manifold for the simultaneous determination of iron(II) and total iron.

S: sample; a, b: pulse suppressors; GBR: glass beads reactor; W: waste.

河川水中の無機三態窒素の同時定量も同方式で行われている³⁵⁾。NO₂⁻-Nはそのままよいが、NO₃⁻-NはCu-CdカラムによりNO₂⁻-Nに還元、NH₄⁺-NはNaClOによりNO₂⁻-Nに酸化したのち3つの流れを再統合し、ジアゾ色素に転換する。流路が複雑で測定条件を一定に保つのがやや難しい。

異なる酵素を用いながら、NADHやH₂O₂を共通の生成物として生ずる反応系を利用すると、1台の検出器を用いて複数の基質を定量することができる。森下ら³⁶⁾はこの点に着目、NADをキャリアーとし、3つの脱水素酵素(lactate dehydrogenase, glucose dehydrogenase, glycerol dehydrogenase)をそれぞれ固定化した3本の反応管を並列に組み入れたシステムを用い、NADHをモニターしてL-乳酸、β-D-グルコース、グリセロールの同時定量に成功した。この場合、反応管のサイズを変えてシステム内滞在時間に差を生じさせ、連続する3本のピークを観測する。本法はFIA系の適切な設計によりピーク間の分離の調節が可能で、酵素反応系を液体クロマトグラフィーと組み合わせるよりも簡便である。

H₂O₂をアンペロメトリーによりモニターする例としてMasoomら³⁷⁾のサッカロースとグルコースの同時定量がある。Invertase/mutarotaseカラム(I)及びglucose oxidaseカラム(II)の双方を通ったsub-bolusはサッカロースとグルコースの含量を、カラム(II)のみ通ったsub-bolusはグルコースのみに対応するシグナルを与える。原理的に本法と全く同じ定量法が八尾ら³⁸⁾によって独立に報告された。ただし、固定化酵素カラムの配列は若干異なり、アスコルビン酸を含む実試料への適用を配慮し、ascorbic acid oxidaseのカラムをシステムに追加してある。

pHグラジエント法及びマスキング剤添加法

試料の体積が十分に大きければ、試料ゾーンが検出器に達したとき、試料ゾーンとキャリアーの界面に試料ゾーン中心部とは異なるpHを持つ都合2つのゾーンが存在する。これら領域のpH特性を活用するのがpHグラジエント法である。例えば、4-(2-ピリジルアゾ)レゾルシノール(PAR)によるPb(II)とV(V)の同時定量の場合³⁹⁾、NH₄OH-NH₄Cl緩衝液(pH 9.7)で調製したPAR溶液の流れにPb(II)-V(V)の0.025 M HCl溶液を注入すると、試料ゾーンが検出器に達したときpHグラジエントが得られ、Fig. 8に示すようにV(V)-PAR錯体を挟んで前後にPb(II)-PAR錯体が検出される。

pHグラジエントは酸性のキャリアーにアルカリ性の溶液を注入しても実現することができる。Betteridgeら⁴⁰⁾は、PAR-金属(II)錯体の生成、解離を巧みに利用して、Co(II)/Mn(II)

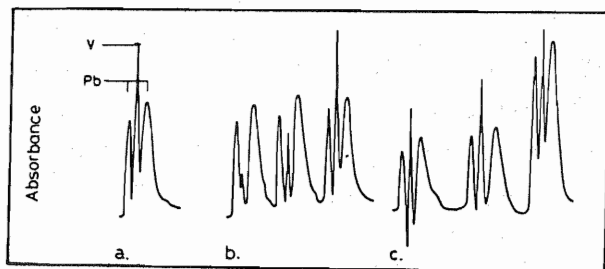


Fig. 8. Peaks obtained from one sample containing a mixture of Pb(II) and V(V) injected into a solution of PAR.

(a) General shape of curve. (b) Increasing concentration of V(V) while that of Pb(II) is held constant. (c) Increasing concentration of Pb(II) while that of V(V) is held constant.

及び同量のCo(II)存在下のNi(II)/Cu(II)の同時定量を達成している。この他、Bi, Th, Cuの定量の可能性も示唆されている⁴¹⁾。

Fe(III)とAl(III)を含む非常に大体積(6.3 ml)の試料溶液をキシレノールオレンジと反応させ両金属を発色させる。次に、この試料ゾーンの中央にマーキングゾーン方式によりEDTA-アスコルビン酸を添加するとFe(III)はマスクされて脱色する。よって、Fe(III)とAl(III)の含量に相当する台形ピークとその中心部にFe(III)に相当する谷が観測される。Fe(III)とAl(III)の同時定量が可能となるが⁴²⁾、本法はpHグラジエント法よりも安定した方法と言えよう。

——— オンラインカラムの利用及びHPLC-FIA ——— 本法は、FIAシステムに組み入れたカラムへの吸着性を制御し、目的成分を逐次検出系に導入して定量する。例えば、Zn/Cdの同時定量⁴³⁾では、0.1 M HCl-0.5 M NaClの流れに試料を注入し、イオン交換カラム(Amberlite IRA-400, Cl⁻, 3 mm i.d. × 20 mm)に両金属をクロロ錯体として一旦吸着させる。まず 2 M NaOH-0.5 M NaCl(500 μl)を注入してZnを、次いで 1 M HNO₃-0.5 M NaCl(500 μl)を注入してCdをカラムから溶離する。溶離した両金属は、ルミノール-H₂O₂系化学発光への抑制作用を利用して高感度で定量することができる。分析時間は1試料につき3分である。

Cu(II), Fe(III), Co(II)を酒石酸系陽イオン交換法でオンラインで相互分離し、フェノールフタリンのH₂O₂酸化反応に対する接触作用を利用して定量する方法⁴⁴⁾、Mn(II)とCo(II)を同様なイオン交換系で分離しプロトカテキユ酸-H₂O₂系反応に及ぼす接触作用を利用して定量する方法⁴⁵⁾も報告されている。また、Cu(II)及び[CuEDTA]²⁻の同時定量は、サリチル酸基を持つキレート樹脂のカラムで相互分離し、検出器に原子吸光装置を用いて行うことができる⁴⁶⁾。

オキシアニオンに強い吸着性を示す酸性活性アルミナカラムもFIAシステムに導入され、ICPと組み合わせてCr(III)/Cr(VI)の同時定量に使用されている⁴⁷⁾。NBS及び英国地質調査所の標準水試料への適用が試みられている。

リンのオキシ酸類の定量には、高速液体クロマトグラフ(HPLC)分離とFIAによる検出の組合せはきわめて有効である。Hiraiら⁴⁸⁾によるオルトリン酸、二リン酸、三リン酸の

定量法は、HPLCにオートアナライザーを接続した場合と比較して分析時間が短く、分解能、感度ともに優れている。また、同グループのYozaら⁵⁹⁾は、HPLC-FIAを無機ポリリン酸塩の酵素による加水分解のキャラクタリゼーションに用いている。さらに鎖状リン酸のみならず環状縮合リン酸の定量も可能で、赤リン及び黄リンの燃焼により生成したエロゾルの分析に適用され、P₁。ポリマーまでのリン酸塩が検出されている⁵⁰⁾。

その他、還元糖類⁵¹⁾、アミノ酸⁵²⁾を対象としたLC-FIAシステムも報告されている。

マルチチャンネル検出器の利用ほか マルチチャンネル原子吸光装置やICPにより少量の試料を分析する場合、フローインジェクション法により微量の溶液をネプライザーに導入すると都合がよい。例えば、血清中のCaとMgは、マーキングゾーン法による緩衝剤の添加法と2チャンネル原子吸光装置を組み合わせ良好な精度と正確さで定量することができる⁵³⁾。

FIAとマルチチャンネルICPの結合はJacinthoら⁵⁴⁾により初めて詳しい基礎的検討が行われ、NBSの標準物質Orchard Leaves中の10元素の分析値は保証値とよい一致を示している。また、FIA-ICP法は血清中の電解質の分析に好適で、これに関する2編の報告がある⁵⁵⁾ ⁵⁶⁾。なお、低濃度の金属を定量する場合には、Chelex 100の小型カラムをマニホールドに導入し、試料中の金属を一旦樹脂に吸着、濃縮したあと希硝酸で溶離ICPに送ると20倍以上の感度改善が達成できる⁵⁷⁾。

高速走査型モノクロメータとデータ記憶装置付きオッシロスコープを組み合わせたフレーム分析装置により、Li, Na, K, Caの同時定量が試みられている⁵⁸⁾。本法では、「分散」の進行した試料ゾーンの異なる部分につき350~800 nmにわたって走査し、得られたスペクトルをもとに定量に適するスペクトル強度の範囲が求められている。さらに、多元素同時定量用の新標準添加法が提案され、土壌抽出物及び水道水の分析例もあって、本法は適用性の広い方法と言える。

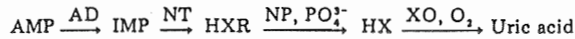
Slaninaら⁵⁹⁾は、マルチインジェクション法とマルチチャンネル分光光度計を併用し、雨水中のCl⁻, NH₄⁺, NO₃⁻の同時定量を行った。3個のインジェクションバルブにより水(キャリア)の流れに同時に注入された試料は、それぞれ所定の試薬と合流、発色ののち分光光度計に送られる。NH₄⁺はフェノール-次亜塩素酸法、Cl⁻はHg(SCN)₂法によりそれぞれ定量、NO₃⁻は発色反応を行うことなく紫外外部吸収により定量する。なお、システムはコンピュータにより制御され、分析速度は毎時18~35試料。

多波長分光光度計を用いると、吸収極大波長が適度に離れている呈色成分の同時定量はスペクトル解析により行うことができる。宮路ら⁶⁰⁾は、Cu-パソクプロインニスルホン酸錯体とFe-2,4,6-トリス(2-ピリジル)-s-トリアジン錯体を例に取りあげており、環境水中のCuとFeの同時定量を目標としている。

分子発光キャピティ検出器を利用すると、S²⁻, SO₃²⁻, SO₄²⁻が発する特有のS₂発光ピーク(384 nm)のt(試料をキャピティに導入してから最大の発光強度が得られるまでの時間)が相互に異なることに基づいて、これら陰イオンの同時定量が可能である⁶¹⁾。分析速度は毎時100試料、検出限界(2σ)は3 μl試料中0.06 ng S(Na₂S), 0.15 ng S(Na₂SO₄), 0.09 ng S

(Na_2SO_3)である。同様にリンのオキソアニオン及び有機リン化合物も HPO の発光を利用して同時に定量することができる⁶²⁾。毎時20試料の分析速度で、検出限界(2σ)は5 μl 試料中0.4 ng $\text{P}(\text{H}_2\text{PO}_2)$, 5.0 ng $\text{P}(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 等である。

魚肉中のヌクレオチド含有量は肉の鮮度の尺度であり、adenosine-5'-phosphate(AMP), inosine-5'-phosphate(IMP), inosine(HXR), hypoxanthine(HX)を迅速に測定できる方法があれば好都合である。よって、Watanabeら⁶³⁾はこれらの化合物が酵素の存在で次のよう



(AD: AMP deaminase, NT: 5'-nucleotidase, NP: nucleoside phosphorylase, XO: xanthine oxidase)

に反応することに着目し、新検出器による同時定量を試みた。すなわち、XO, XO-NP, XO-NP-NT 及び XO-NP-NT-AD をそれぞれ酸素電極に固定化した4種のセンサーを作製、これらを1個のフローセルに組み込んで検出器とした。計5種の魚介類の抽出物に関する定量結果は、いずれも各ヌクレオチド専用のセンサーを用いた結果とよい一致が見られ、しかも1試料当りの測定時間は5分以内である。

イオン選択性電界効果トランジスター(ISE)によるpH, Ca, Kの同時定量が研究されている⁶⁴⁾。ISEは小型化が可能であり、従って試薬の消費量を少なくし、検出時点での分散を抑えることができる。さらに、本センサーはS/N比が良く応答速度が速いためFIA検出器として好適であるが、FIAへの適用例はまだ少ない。

ストリッピングボルタンメトリーは、元来高感度な分析法であるが、フローインジェクション法との結合により前濃縮過程と異なる溶液(キャリア)中でストリッピングを行うことができ、選択性を高めることができる。地下水中のPb, Tl, Cd, Bi, Cu, Snの定量⁶⁵⁾や栄養剤中のZnとCuの定量⁶⁶⁾に関する研究が報告されている。

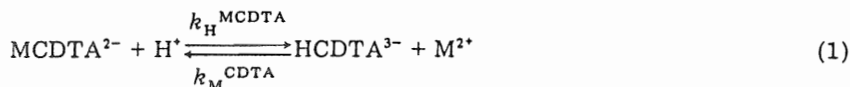
3. 反応速度差FIAによる同時定量

反応速度差分析法(differential kinetic analysis methods)が平衡状態を利用する分析法に優る点の一つは、共通の試薬との反応速度の差を利用して同時定量を行うことができることである。一方、FIAは手分析と比較して種々の技術的強みを持ち、短い半減期(1-10 s)の反応系に適用できるので、反応速度差法の開発に適している。しかし、反応速度差FIAはまだ報告が少なく、本法による実試料の分析例がほとんど見られないことから、学術的興味は持てるものの実用分析への適用性には欠けるように思われる。

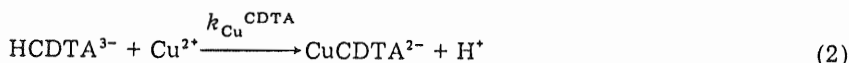
3.1 複数検出器の利用

本法では、反応生成物のシグナルを、流れ方向に対し直列に配置した二つの検出器により、それぞれ異なる時間 t_1 と t_2 において測定する。Jensenらが提案した2例⁶⁷⁾ ⁶⁸⁾では、錯体の配位子置換反応が利用されている。

最初の例⁶⁷⁾は、次式で示されるMgとSrのCDTA錯体の解離反応の速度差に基づく。



ここで、Sr錯体の解離はMg錯体のそれより100倍近く速い。もし溶液中にCu(II)が存在すると、これが次のようにスキベンジャーとして働く。



Cu(II)濃度が十分に高ければ、 $k_{\text{Cu}}^{\text{CDTA}}[\text{Cu}^{2+}] \gg k_M^{\text{CDTA}}[\text{M}^{2+}]$ となる。

反応(1)はoverallの反応速度を支配し、その速度はCu-CDTA錯体の吸収(320 nm)をモニターして求めることができる。キャリアーに注入されたMgとSrのCDTA錯体混合物(CDTA過剰)はCu(II)溶液と合流する。短いコイルを経た反応混合物が第1の検出器に達する時間 t_1 では、最初に生成した錯体の解離が始まっておらず、得られるシグナルは初めに存在した遊離の配位子(過剰分)から生成したCu-CDTA錯体に基づく。MgとSrの含量は、最初に加えた配位子の全量とここで求めた遊離の配位子の量の差から算出される。試料は次いで長い(1130 cm)反応管を通り、時間 $t=t_2-t_1$ のち第2の検出器に達する。この時点でもMg-CDTA錯体はほとんど解離せず、一方、Sr錯体は50%解離するので、時間 t の間に生成したCu-CDTA錯体の量をSrの量に直接関係づけることができる。

Mg/Caの同時定量のFIAシステムは上述のシステムと類似しており、配位子としてクリプタント[2.2.1]を、スキベンジャーとしてNaを使用している⁶⁹⁾。

3.2 マルチ検出器の利用

最近、HooleyとDessy⁶⁹⁾は、エレクトロニクスを駆使したFIAシステムを発表した。本システムでは、試薬と試料の送液に加圧方式を採用、電磁流量計と自動バルブの併用及びフィードバック制御により流速が厳密にコントロールされる。また、発光ダイオードと光センサーを対にした検出ユニット(8組)を石英管(500 mm×1 mm i.d.)に添って取付け検出器としている。なお、各検出ユニットの相互の位置関係は、対象成分の流速や反応速度を考慮して決定する。試料ゾーンは各検出ユニットを異なる時間に通過するが、そこで得られるシグナルはコンピュータに取り込み処理する。Hg/Znの同時定量が例示されているが、本システムは反応速度定数を測定する装置としても優れている。

3.3 単一検出器の利用

シングルインジェクション法 最近、Kagenowら⁷⁰⁾は、配位子置換ストップフロー法でCa/Mgの同時定量を行った。本法では、緩衝溶液の流れにCaとMg並びに配位子クリプタント[2.2.2]を含む試料溶液を注入する。他のチャンネルを構成する試薬溶液にはスキベンジャーとしてのKとo-クレゾールフタレインコンプレキソン(CPC)が含まれている。試料ゾーンは試薬の流れと合流ののち吸光検出器に入り、MgとCaのCPCキレートが検出される。ただし、Mgは試料ゾーンがフローセルに達したとき配位子置換が完結しており、

すべてCPCキレートになっているが、Ca-CPCキレートはフローセル内で遅延時間中に形成され検出される。

試料ゾーン分割法 BetteridgeとFields⁷¹⁾は、CoとNiのクエン酸錯体の配位子置換反応の速度差を利用する両金属の同時定量法を提案した。試料の金属クエン酸錯体を含む流れは、スクャベンジャーPARの流れと合流させたのち2チャンネルに分割する。一方のチャンネル側では、分割後間もなく、反応の停止と他金属のマスキングのためEDTAを加える。他のチャンネル側では、45℃に加熱した約3mのコイルを通して反応を完結させたのちEDTAを加える。その後、各流れを同一光路上に置かれた別々のフローセルに送り吸光度を測定するが、1回の試料注入ごとに二つのピークが観察される。通常の比例法を適用してNiとCoの濃度を求める。誤差は10%以下、分析速度は30試料である。

試料ゾーン分割-再合流法 本法は、試料ゾーンを分割し、各流れを異なる幾何学的特性を持った反応管に通したのち再び合流させ、1台の検出器に送って二つの連続したピークを得るもので、同時定量法として広い適用性を持つと思われる。

このタイプのシステムの特長については、Fernándezら⁷²⁾により詳しく論じられている。また、同グループは、CoとNiの2-hydroxybenzaldehyde thiosemicarbazoneによる同時定量を取りあげ、次の3種のシステムを比較検討している⁷³⁾：(1) 試料の流れを試薬の流れと合流させたのち2分割、それぞれ幾何学的に異なる反応管を通してから再度合流させて1個のフローセルに送る、(2) (1)と同様に分割した試料-試薬混合物の流れを合流させずに各流れをダブルビーム分光光度計の別々のフローセルに送る、(3) 試料の流れを試薬の流れを合流させたのち、ダブルビーム分光光度計内の、流れに対して直列に接続した2個のフローセルに続けて通す。システムの最適化にはmodified simplex法が適用されている。結論として、原著者らは、再現性の良いことを理由に(1)のシステムを推奨している。

なお、2.2の逐次注入法で述べたMn(II)とFe(III)の定量²⁶⁾については、このタイプの定量法も試みられている。

ダブルインジェクション法 KagenowとJensen⁷⁴⁾が、Mg/Sr及びCa/Srの同時定量に本法を用いたときの分析システムのブロックダイアグラムをFig. 9に示す。この定量

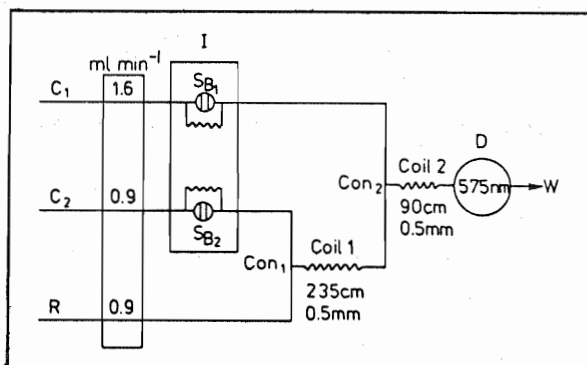


Fig. 9. Manifold for the determination of magnesium (or calcium) and strontium ions.

C₁, C₂, carrier streams; R: reagent stream; S_{B1}, S_{B2}: points of injection; I: double injector; Con₁, Con₂: confluence points; D: detector; W: waste.

法の化学的根拠は、Mg及びCaのクリプタント[2.2.2]錯体の解離速度がSrのそれに比較して速いことである。S_{B1}より試料溶液を、S_{B2}から試料とクリプタント[2.2.2]の(1+1)混合溶液をダブルインジェクションバルブにより同時に注入する。なお、混合溶液中のクリプタント[2.2.2]は金属イオンに対し常に過剰になっている。S_{B2}で注入された試料がCoil 1内を移動している間に、S_{B1}からの試料は検出器(D)に達する。このゾーンの金属イオンはクリプタントと錯形成していないため、Con₂で発色試薬CPCと合流しCoil 2の中で完全に発色する。よって、最初に観察されるピークはSrとMg(又はCa)の含量を与える。一方、S_{B2}からのゾーンはCon₁でCPCと合流し、Coil 1とCoil 2を通過する間に金属クリプタント錯体の解離が起きる。しかし、Con₁とDの間の滞在時間が短いためSr-クリプタント錯体の解離は無視することができ、Dで得られる第2のピークはMg(又はCa)の濃度に関係づけられる。サンプルリング速度は毎時40である。

4. 文 献

- 1) M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, **109**, 413 (1984).
- 2) E. H. Hansen, J. Růžička, A. K. Ghose, *Anal. Chim. Acta*, **100**, 151 (1978).
- 3) J. Růžička, E. H. Hansen, E. A. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, **88**, 1 (1977).
- 4) 伊永隆史、岡田公子、森分俊夫、高橋照男、日本分析化学会第33年会講演要旨集、p. 571 (1984).
- 5) Y. Baba, N. Yoza, S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **318**, 319 (1985).
- 6) J. L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, **161**, 375 (1984).
- 7) T. P. Lynch, N. J. Kernoghan, J. N. Wilson, *Analyst*, **109**, 839 (1984).
- 8) W. D. Basson, J. F. van Staden, *Water Research*, **15**, 333 (1981).
- 9) Y. Baba, N. Yoza, S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **295**, 153 (1984).
- 10) L. Fossey, F. F. Cantwell, *Anal. Chem.*, **55**, 1882 (1983).
- 11) W. D. Basson, J. F. van Staden, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **302**, 370 (1980).
- 12) T. P. Lynch, N. J. Kernoghan, J. N. Wilson, *Analyst*, **109**, 843 (1984).
- 13) E. A. G. Zagatto, A. O. Jacintho, L. C. R. Pessenda, F. J. Krug, B. F. Reis, H. Bergamin F^o, *Anal. Chim. Acta*, **125**, 37 (1981).
- 14) M. F. Giné, H. Bergamin F^o, E. A. G. Zagatto, B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **114**, 191 (1980).
- 15) J. F. van Staden, *Anal. Chim. Acta*, **138**, 403 (1982).
- 16) K. S. Johnson, R. L. Petty, *Limnol. Oceanogr.*, **28**, 1260 (1983).
- 17) B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, A. O. Jacintho, F. J. Krug, H. Bergamin F^o, *Anal. Chim. Acta*, **119**, 305 (1980).
- 18) 黒石忠文、打木英夫、保田和雄、第45回分析化学討論会講演要旨集、p. 215 (1984).
- 19) 黒石忠文、打木英夫、保田和雄、日本分析化学会第33年会講演要旨集、p. 557 (1984).
- 20) B. P. Bubnis, M. R. Straka, G. E. Pacey, *Talanta*, **30**, 841 (1983).

- 21) J. Carlos de Andrade, J. C. Rocha, N. Baccan, *Analyst*, 110, 197 (1985).
- 22) H. Wada, G. Nakagawa, K. Ohshita, *Anal. Chim. Acta*, 159, 289 (1984).
- 23) A. Ríos, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 109, 1487 (1984).
- 24) A. Ríos, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 110, 277 (1985).
- 25) 森田秀芳、増田恵子、下村 滋、池田昌彦、日本分析化学会第33年会講演要旨集、
p. 558 (1984).
- 26) F. Lazaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 169, 141 (1985).
- 27) P. Linares, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 57, 2101 (1985).
- 28) A. G. Fogg, N. K. Bsebsu, *Analyst*, 109, 19 (1984).
- 29) J. W. Dieker, W. E. van der Linden, *Anal. Chim. Acta*, 114, 267 (1980).
- 30) A. Tanaka, M. Miyazaki, T. Deguchi, *Anal. Lett.*, 18, 695 (1985).
- 31) F. Lázaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*,
320, 128 (1985).
- 32) J. W. B. Stewart, J. Růžička, *Anal. Chim. Acta*, 82, 137 (1976).
- 33) L. Anderson, *Anal. Chim. Acta*, 110, 123 (1979).
- 34) A. T. Faizullah, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 167, 225 (1985).
- 35) 大島文男、有中雅章、日本分析化学会第34年会講演要旨集、p. 580 (1985).
- 36) 森下富士夫、西川泰彦、小島次雄、日本分析化学会第34年会講演要旨集、p. 598 (1985).
- 37) M. Masoom, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 171, 185 (1985).
- 38) 八尾俊男、赤坂玲奈、松本義宏、和佐 保、日本分析化学会第34年会講演要旨集、
p. 600 (1985).
- 39) D. Betteridge, B. Fields, *Anal. Chem.*, 50, 654 (1978).
- 40) D. Betteridge, B. Fields, *Anal. Chim. Acta*, 132, 139 (1981).
- 41) S. Baban, *Anal. Proc.*, 17, 535 (1980).
- 42) 田中 明、深見なおみ、出口俊雄、第45回分析化学討論会講演要旨集、p. 209 (1984).
- 43) J. L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, 127, 199 (1981).
- 44) 前小屋千秋、水庭文雄、八野耕明、第45回分析化学討論会講演要旨集、p. 211 (1984).
- 45) 山根 兵、野沢保彦、第46回分析化学討論会講演要旨集、p. 89 (1985).
- 46) E. B. Milosavljević, J. Růžička, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 169, 321 (1985).
- 47) A. G. Cox, I. G. Cook, C. W. McLeod, *Analyst*, 110, 331 (1985).
- 48) Y. Hirai, N. Yoza, S. Ohashi, *Anal. Chim. Acta*, 115, 269 (1980).
- 49) N. Yoza, H. Hirano, Y. Baba, S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, 325, 385 (1985).
- 50) R. S. Brazell, R. W. Holmberg, J. H. Moneyhun, *J. Chromatogr.*, 290, 163 (1984).
- 51) D. Betteridge, N. G. Courtney, T. J. Sly, D. G. Porter, *Analyst*, 109, 91 (1984).
- 52) J. B. Kafil, C. O. Huber, *Anal. Chim. Acta*, 139, 347 (1982).
- 53) 内田哲男、C.-S. Wei、飯田忠三、和田弘子、名古屋工業大学学報、33, 97 (1981).

- 54) A. O. Jacintho, E. A. G. Zagatto, H. Bergamin F², F. J. Krug, B. F. Reis, R. E. Bruns, B. R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, 130, 243 (1981).
- 55) P. W. Alexander, R. J. Finlayson, L. E. Smythe, A. Thalib, *Analyst*, 107, 1335 (1982).
- 56) C. W. McLeod, P. J. Worsfold, A. G. Cox, *Analyst*, 109, 327 (1984).
- 57) S. D. Hartenstein, J. Růžička, G. D. Christian, *Anal. Chem.*, 57, 21 (1985).
- 58) F. Zhaolun, J. M. Harris, J. Růžička, E. H. Hansen, *Anal. Chem.*, 57, 1457 (1985).
- 59) J. Slanina, F. Bakker, A. Bruyn-Hes, J. J. Möls, *Anal. Chim. Acta*, 113, 331 (1980).
- 60) 宮路敏彦、和田明生、第3回フローインジェクション分析研究会講演会講演要旨集、p. 43 (1985)。日本分析化学会第34年会講演要旨集、p. 584 (1985)。
- 61) J. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, 157, 177 (1984).
- 62) J. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, 170, 331 (1985).
- 63) E. Watanabe, S. Tokimatsu, K. Toyama, I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 164, 139 (1984).
- 64) A. U. Ramsing, J. Janata, J. Růžička, M. Levy, *Anal. Chim. Acta*, 118, 45 (1980).
- 65) A. Hu, R. E. Dessy, A. Granéll, *Anal. Chem.*, 55, 320 (1983).
- 66) J. Wang, H. D. Dewald, *Anal. Chem.*, 56, 156 (1984).
- 67) J. H. Dahl, D. Espersen, A. Jensen, *Anal. Chim. Acta*, 105, 327 (1979).
- 68) D. Espersen, A. Jensen, *Anal. Chim. Acta*, 108, 241 (1979).
- 69) D. J. Hooley, R. E. Dessy, *Anal. Chem.*, 55, 313 (1983).
- 70) H. Kagenow, A. Jensen, *Anal. Chim. Acta*, 145, 125 (1983).
- 71) D. Betteridge, B. Fields, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 314, 386 (1983).
- 72) A. Fernández, M. A. Gómez-Nieto, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 165, 217 (1984).
- 73) A. Fernández, M. A. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 56, 1146 (1984).
- 74) H. Kagenow, A. Jensen, *Anal. Chim. Acta*, 114, 227 (1980).