

フローインジェクション分析法 におけるバルブの魔術

(株) 日立製作所 計測器事業部

保田和雄

(株) 日立製作所 那珂工場

テクノリサーチセンター

黒石忠文

1975年にフローインジェクション(FI)による分析の概念が発表されて以来、種々な形をとりながら発展し、日常分析に取り入れられるまでになった。Ruzickaの概念としては化学反応が完結しなくても、時間、温度を正確に保つならば反応の初期段階で測定しても何んら問題がなく、十分な分析精度、正確さが得られると考えていた。¹⁾²⁾例えばリン酸塩の分析で、モリブデンブルーの反応を用いると反応が完結するのに20分くらいはかかる。しかし、FI法を用い反応の初期で測定すると1~2分で測定できることがわかった。反応の初期段階で測定できることを前提にして装置を組立てたとしても、数分で反応が完結する場合もある。このため送液方法も精度の高いものからそうでないものまで、千差万別の方法がとられている。一方、反応速度による分析法についても0.1~1秒のオーダーの変化で測定できる場合が多い。液体クロマトグラフのポンプを用いて測定すると、これくらいのオーダーの反応速度は容易に測定できる。このため、FIにおいては反応速度法は、重要な測定法の一つであると言えよう。

FI法の大きい特長の一つは密閉系での反応である。このため、外部からの汚染が少ない、反応温度も溶液の沸点より高くとれることなどもあって、迅速で高精度の分析が可能になったことである。この特長を生かせるのがこれを支えるハードウェアである。FIはカラムのない液体クロマトグラフであるとか、否、これとは全く異なるなどの種々な論議があるが、分析の方法論を別にしてハードウェアの観点から見るとFIは次の基礎技術で構成されている。

1. FIを構成する基礎技術

1-1) サンプリング

通常、試料を導入するシングルインジェクションの他に、試料量を変えて導入するダブルインジェクション、トリプルインジェクションなどの方法がある。これは主として検量線のダイナミックレンジの拡大に用いる。³⁾しかし、チュ

ーピングを変えるだけでこの多重インジェクションは、例えば $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ とか NO_2/NO_3 , Si/P の同時分析ができるサンプリング法でもある。

一定濃度の試料を一定量サンプリングする以外に希釈して測定する方法がある。一般に希釈は簡単なことのように考えられてはいるが、1000倍以上の希釈を一回で行うことは容易なことではない。これの可能な方法がゾーン サンプリング (Zone Sampling) と呼ばれる FI 独特の方法である。

液体クロマトグラフの検出を反応速度法で行う時のサンプリング、あるいは連続モニタリングを行う場合のサンプリングは間欠的であったとしても、その間隔はできる限り小さくせねばならない。云うならば連続サンプリングと云ってもよいくらいでなければならない。このため FI ではこの様なサンプリングを連続サンプリングと云うこともある。

1-2) 流れ

最初に考えられた流れは、試薬の流れの中に試料を注入する方法だった³⁾。種々な分析手法、精度などを考えた結果、流れの方法も大別すると次の様な方法がとられている。川の流れが合流する様に、試薬、試料の流れを合流させるマージング フロー (Merging Flow) がある。この方法は発想としても容易であるし、また多く使用されている方法でもある。

これに対し、FI の基本の考えを展開した方法に試薬で試料をはさみ、これをキャリアー液で送るサンドウィッチ フロー (Sandwiched Flow) がある⁴⁾。この方法は、結果的には高精度の分析に適するものであるが、最初はどううまく使えるかと疑問視されることも多かった。この後、2種類の試薬で試料をはさむ2試薬系の反応にまで拡張されるところまで発展した。これの変形の一つがチエーシング フロー (Chasing Flow) と云われるもので、試薬、試料が並んでいる方法である⁵⁾。

1-3) 測定

測定手段としては、吸光測定以外に蛍光、電気化学的検出などの方法がある。一方どの時点で測定するか、どの様な測定方法があるのかと云う点から見ると、FI の最初の概念である反応初期での測定、反応が完結した時点での測定があり、他方では反応速度を求める方式がある。特に反応速度の遅い場合の高精度あるいは特殊な測定として、試薬と試料の混合後反応コイルの中に一定時間密閉して反応させ、その後測定する方法もとられている。吸光測定と云う観点からみると、フローセルを2連にして使用する方法は $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$; NO_2/NO_3 , Si/P などの同時分析にも応用できる。またチューピングの組み方如何によってはブランクの補

正も可能になる。

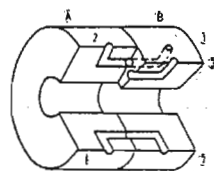
FIに吸光光度法を組み合わせた時に起る誤差の原因の一つは、キャリアー液と反応した溶液との間の密度の相異による光束のゆれがある。これによって擬似ピークやリムなどが生れる。これを防ぐ一つの方法として二波長測光があり、流れの乱れによる測光誤差を少なくできる。

以上述べた様にインストルメンテーションの観点からみると、これらの要素をどの様に組み合わせると一つの分析システムを組み立てるかがキーとなる技術である。これが切替バルブである。この使い方によって分析システムが組み立てられると云っても過言ではない。此処にバルブの魔術と云われる技術が存在する。通常用いられるバルブのうち最も単純なものは6方弁を一連にしたものである。さらに複数個重ね合わせることで多連6方弁が構成できる。これとは反対に一連で弁の数を多くした16方弁などもある。このバルブの使い方如何によって各種の流路が構成できるので、次にこの構成と機能について述べる。

2. バルブの使い方と流路系

バルブの材質は耐薬品性のあるテフロンやセラミックスが使用される。

バルブの構造はFig. 1aに示す様に①から②へと連なった流路を切り替えると、②と③とが連なる。例えば16方バルブだと右側に8ヶ、左側に8ヶ流穴がある。これを切り替えるとFig. 1bに示す様に流路が変わる。



(a)



(b)

2-1) サンプルング

シングル インジェクション

ヨソ

これは最も単純な試料の導入方法である。

Fig.1 Schematic Diagram of 16 Ports Valve

Fig. 2で示される6方バルブを用いると、まず左側の状態にしておいてバルブ

を通してサンプリング
コイルに試料を導入す
る。切り替えて右側の
状態にし、試薬でもっ
て試料を押し出す。

検量線のダイナミッ
クレンジ拡大のため
のダブルインジ
ェクション

吸光光度法は発光法
に比べて検量線の直線
域が狭い。これを解決
する方法の一つとして
試料量を変えてサンプ
リングする方法がとら
れている。Fig. 3aで
はサンプリング コイ
ル S_1 とこれより多量
のサンプリングのでき
る S_2 に試料を導入す
る。バルブを切り替え
てキャリア液で試料を
押し出し、バルブを出
後で試薬と混合する。
 S_1 と S_2 の間にコイ
ルを入れるが、これは一

つは両試料の混合を防ぐためであり、他の一つは拡散をより大きくするためである。特に後者は、結果的にはより少量の試料をサンプリングしたのと等価になる。なおこの様な流路は14方バルブで組み立てられる。

Fig. 3bは上記に加えて試薬をサンプリングして反応系を組み立てる方法である。キャリア液でサンプリング コイル S_1 , S_2 に充填された試料を押し出すのと、別のキャリア液で試薬を押し出すのをうまくタイミングを合わせて合

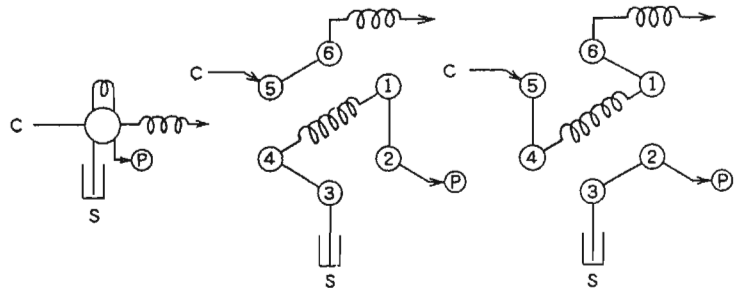
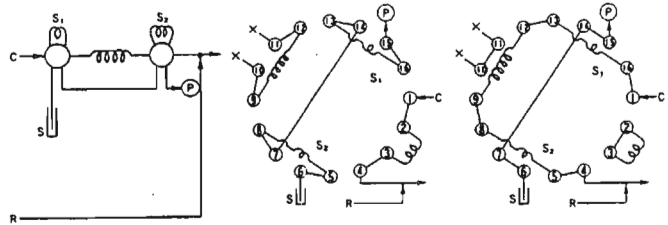
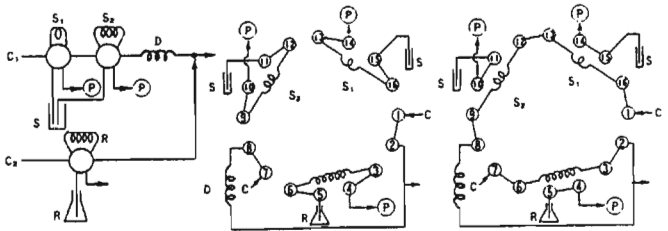


Fig. 2 Schematic Diagram of 6 Ports Valve



(a)



(b)

Fig. 3 Double Injection

流し、反応させる。この様な流路の組み立ては16方バルブまたは、多連バルブによって可能になる。

検量線のダイナミック レンジ拡大のための多重インジェクション

Fig.4 に多重インジェクションの例を示す。

S_1, S_2, S_3 にそれぞれ異なるサイズのループをおき、試料の濃度に応じてサンプリングコイルを使いわけ

る。これによって6通り、 S_2 ループが短い場合は7通りの組み合わせが可能となり、導入する試料量を変えることができる。この16方バルブに2ヶの流穴を加え18方バルブにするならば四重のインジェクションが可能になる。

2成分同時分析のためのダブルインジェクション

NO_2/NO_3 の同時分析の場合には Fig.5 の様なバルブ操作をする。試料をサンプリング コイル S_1 と S_2 に導入する。

S_1 と S_2 の間に還元カラムを置く。 S_2 の試料で NO_2 の分析をする。 S_1 の試料で NO_3 を還元して NO_2 として分析するが、結果としては $NO_2 + NO_3$ の全量を測定することになる。そして両者の差を求め、 NO_3 の量を求める。

高希釈のためのサンプリング

100倍以下の希釈ならば一回の操作で容易に行なえるが、1000倍以上の希釈で、しかも高精度を要求される場合は容易なことではない。これを可能にしたのが

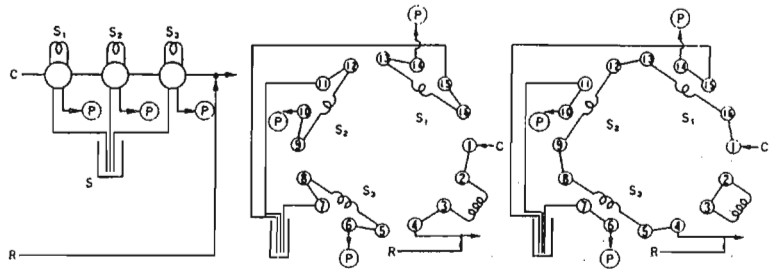


Fig.4 Multiple Injection

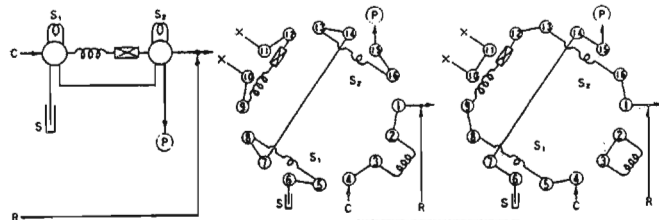


Fig.5 Double Injection

F Iにおけるゾーン サンプリングと云われるバルブ操作である。

Fig. 6に見られる様に、始めに S_1 のサンプリング コイルに試料を導入する。これをキャリア液で押し出し、分散コイルで拡散させる。分散された溶液の濃度プロファイルの中で必要とする所を切り出す。これをバル

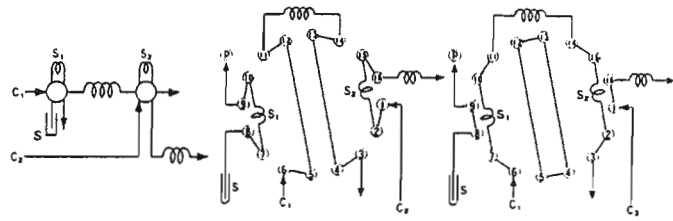


Fig. 6 Zone Sampling

ブ操作でみると左側の状態で S_1 に試料を導入する。次にバルブを切り替えて右側の状態にする。キャリア液 C_1 で S_1 を押し出すと分散された試料は S_2 に流れ込む。次にバルブを左側の状態にし、必要な濃度プロファイルの一部を切り取ると同時に C_2 で S_2 を押し出す。これによって高希釈のサンプリングができる。

連続サンプリング

液体クロマトグラフの検出手段として反応速度法を用いる場合、あるいはプラントなどで連続モニタリングする場合には、たとえ間欠的であっても頻度の高いサンプリングをしなければならない。これがFig. 7に示す方法である。サンプ

リング コイル S_1 に試料を導入し、これを分析している間に別のコイル S_2 に試料を導入する方法である。バルブ操作でみると、左側の状態で S_1 に試料を導入する。バルブを切り替えて右側の状態にする。この時 S_1 の試料はキャリヤ

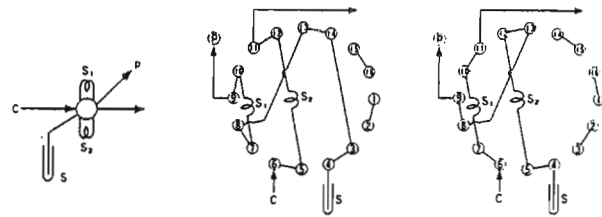


Fig. 7 Continuous Sampling

ー液で押し出されて反応系に行く。この間に S_2 に試料が導入される。次にバルブが左側の状態に戻った時に、この S_2 に導入された試料はキャリヤ液で押し出され反応系へと進む。この時に S_1 には試料が導入される。この方法によってサンプリングの間隔が2倍向上できる。

2-2) 流路

FIの流れは大別するとマーキングフローとサンドウィッチドフローに大別できる。

マーキングフロー

Fig. 8に示す様に試料のセグメントフローと試薬のセグメントフローを合流し反応させる方法である。バルブ操作でみると、左側の状態で試料と試薬を別々のサンプリングコイルに導入する。バルブを切り替え右側の状態にし、キャリア液 C_1 と C_2 とで試料、試薬を別々に押し出し合流させる。

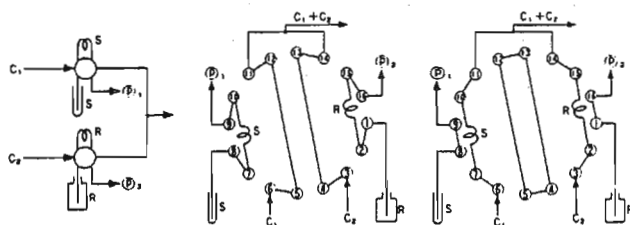


Fig. 8 Merging Flow

サンドウィッチドフロー

この方法は単なる一つの方法ではなく、Fig. 9 a/b/cに見られる様に目的に応じて変形がとられる。Fig. 9 aはもっとも簡明な方法で、試料を中間にあるサンプリングコイルに導入する。試薬はこれをはさんで両側のコイルに導入する。そして、キャリア液でこれらを押し出す。なお場合によっては試料と試薬を逆の配置にし、試料で試薬をはさむ方法もとれる。

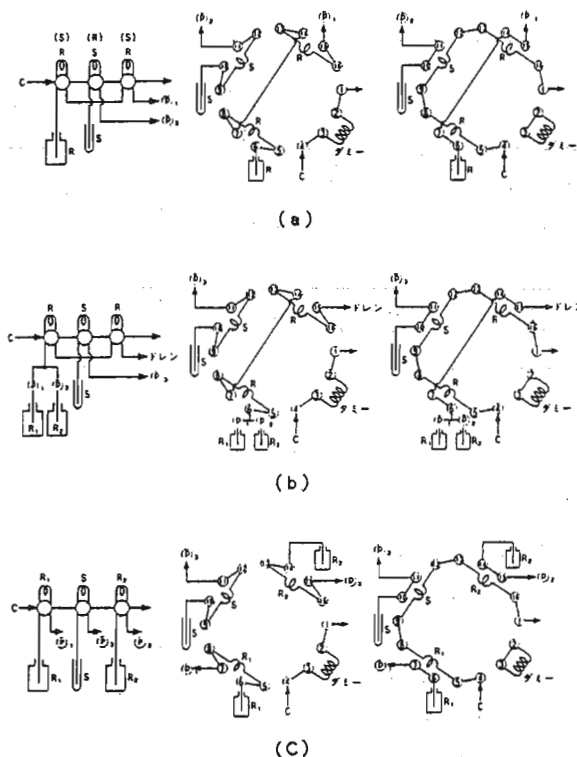


Fig. 9 Sandwiched Flow

バルブ操作についてみると、左側の状態で試料、試薬を導

入する。バルブを切り替えて右側の状態にすると、これらの試薬—試料—試薬が一連につながる。次にキャリア液で押し出し、反応系へともって行く。

Fig. 9bは試薬が不安定で反応の直前に混合しなければならない時にとられる方法である。Fig. 9cは2種類の試薬を用いる反応系で、これをサンドウィッチ法に組んだものである。

チェーシング フロー

サンドウィッチ法の変形の一つで、Fig. 10に示すように試料、試薬を直列に並べる方法である。この方法は液体クロマトグラフでよく使用される6方バルブを2連にしても使用できる。⁵⁾

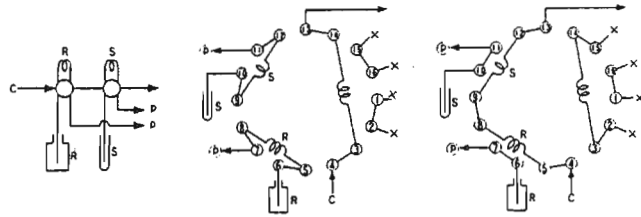


Fig. 10 Chasing Flow

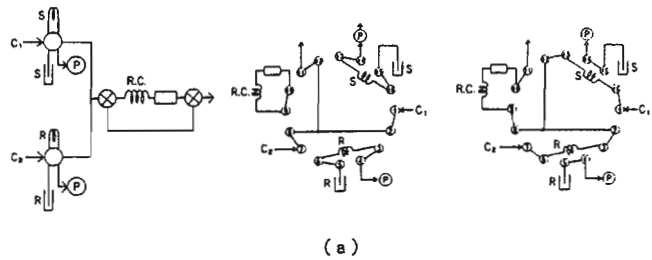
2-3) 測定

FIの測定は吸光光度法以外に電気化学的方法、蛍光光度法などがあるが、此处でバルブ操作に関係の深いのは通常の測定のほか反応速度法と、正確に一定時間反応させた後に測定する方法との3通りになろう。このうち最初のは既に随所に述べているので、後の2者について述べる。

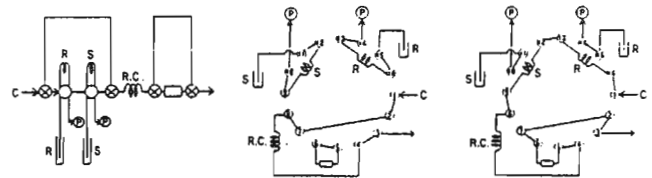
ストップド フロー

既に述べた様に秒のオーダーで測定できる反応速度法は多い。丁度FIによる混合、反応はこの反応時間とうまく対応する。

このため Fig. 11a/bに示す様なストップドフロー方式がとれる。Fig. 11aはマーキングフロー方式によるものである。



(a)



(b)

左側の状態で試料、試

Fig. 11 Stopped Flow

薬をそれぞれのサンプリング コイルに導入する。次にバルブを切り替え右側の状態にする。この状態で試薬と試料は混合し、フローセルに導かれる。

次にバルブを切り替え左側の状態にする。フローセルとミキシング コイルの両端はクリップされ反応溶液はフローセルの中に閉じ込められる。反応速度法で正確な測定をしようとする、このフローセルの両端をクリップすることが大切である。ポンプの所でいくら液体の流れを止めたとしても、流れの揺らぎがフローセルのところで認められるのでどうしても誤差が入り込んで来る。

Fig.11bはチェーシング フローの方法で、かつ、フローセルの両端をクリップする方法である。この両者は目的によって使い分けられている。

遅い反応の測定

FIは反応の初期段階で測定できると云われても、それに伴う装置が適確に作製されないと精度のよい測定はできない。このため、試料、試薬の混合した溶液を反応コイルの中に閉じ込め、一定時間反応させたところでフローセルに送り込む方法である。Fig.12a/bにこの流路を示す。

Fig.12aについてみると、左側の状態で試料、試薬をそれぞれのサンプリング コイルに導入する。バルブを切り替え右側の状態にし、反応コイルの両端をクリップして反応溶液の動きを止める。一定時間後に右の状態にもどし、キャリア液を送ると反応コイルに閉じ込められていた溶液はフローセルに導かれる。Fig.

12bの方法は上記の変法である。この変法は数種類も

あり、目的によって選択することになる。

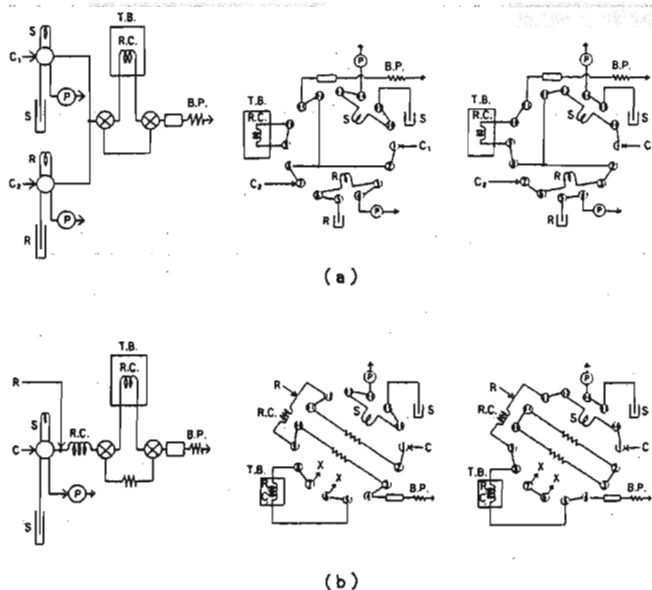


Fig 12 Flow Diagram of Measurement for Slow Reaction

3. 流路系の特長を生かした分析

3-1) ダブルインジェクションによる検量線のダイナミックレンジの拡大。

水道水中の鉄、河川水中の鉄の濃度は、対象物によって相違しているので、広い範囲の濃度で測定されることが要求される。この目的に合った分析法は開発されているが⁶⁾、特にサンプリングにダブルインジェクション法やトリプルインジェクション法を用いると、必要とする範囲の選択が容易である。

Fig.13に示すように試料を2つのサンプリング量の異なるコイルに導入する。キャリア液を両者の間に入れることによって、2つの試料に試薬を供給す

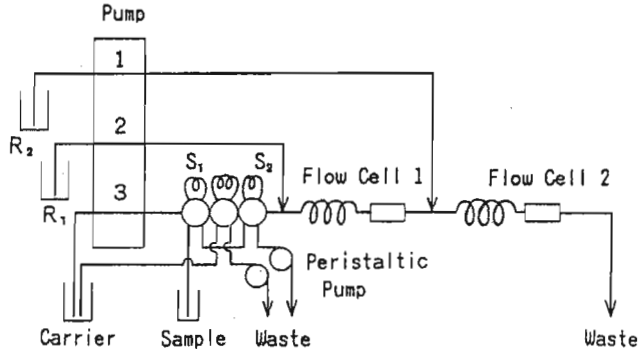


Fig.13 Flow Diagram of Double Injection for Fe Analysis

ると同時に試料間の混合も防いでいる。この例では Fe^{2+} の他に Fe^{3+} も同時に測定する必要があったため、ダブルフローセル方式をとり Fe^{2+}/Fe^{3+} の同時分析も行なっている。測定例を

Fig.14に示す。一つの試料について上側に2ケ、下側に2ケのデータが出ているが、上側は Fe^{2+} であり、下側は Fe^{3+} である。

3-2) スプリット法による高倍率希釈

Fig.15に上記方法による希釈の概略を示す。 V_1 のところで試料をサンプリングし、 S_1 に導入する。次にキャリア液 C_1 を流すと分散コイル L_1 の中では図に見られる様な濃度

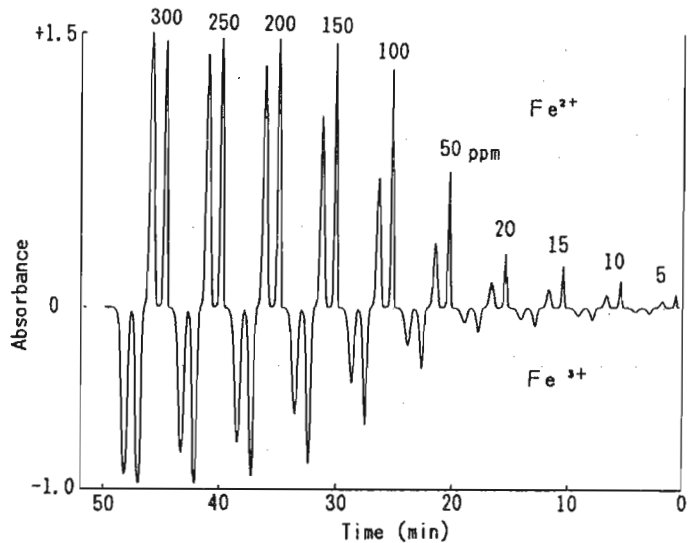


Fig.14 Recording of Fe Analysis

勾配を持った溶液が、 V_2 を通り S_2 に流れ込む。ここでサンプリングしたい部分をタイミングを合わせて切り取る。この様になると、目的とする部分のみが切り取られているので、ドレインに行く溶液の濃度のプロファイルは一部が抜き取られた形になっている。キャリア液 C_2 を流し、 S_2 にサンプリングされている試料を送り出す。この方法は Fig. 6 に示す方法でもよいし、6方バルブを2連にしたものでもよい。

サンプリングの位置と再現性を Fig. 16 に示す。濃度プロファイルの上部の位置でサンプリングした方が再現性が高い。しかし、後方にテイリングした所でも良好な再現性を示していることがわかる。ここで注目したいのは、溶液の流れの前方でのサンプリングの再現性が意外とよくないことである。高希釈は後方にテイリングした所でサンプリングする。Fig. 17 に 37000 倍の希釈の再現性を示すデータを示す。少なくとも C.V. で 1% より良い

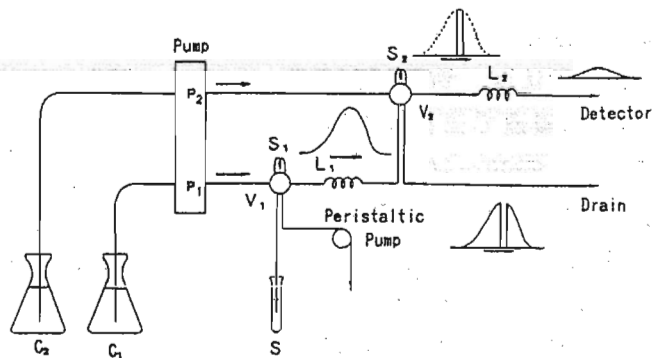


Fig. 15 Dilution by Split Method

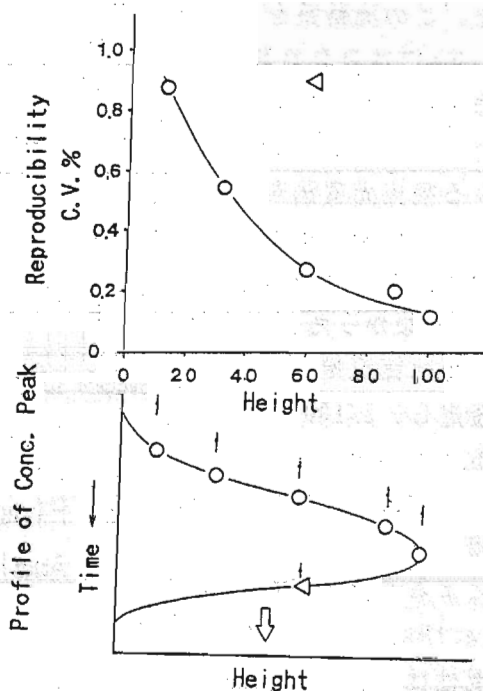


Fig. 16 Relationship between Sampling Position and Reproducibility

再現性が得られる。

この方法は、例えばビタミンB₂の製造で工程管理に 응용され、6000~10000倍の希釈を一度で行ない日常分析に使用されている。

3-3) 高精度の分析

エレクトロニクス部品の一つである機能性薄膜合金中のFe, Niの分析は、ある場合には、C.V.で0.1%より良い再現性が要求される。

このため、試料、試薬の混合のタイミングのずれないサンドウィッチフローを応用した。この流路系をFig.18に示す^{7, 9)}。Ni²⁺の分析はPARによる吸光光度法を、Fe³⁺はDPPSによる方法を用いた。特に後者についてはフェナントロリンによる吸光光度法を調べたが発色液の安定度が悪く、再現性がC.V.で0.1%を切れなかった。DPPS法では恒温槽を95℃に設定し、1/100℃に制御することによって、C.V.で0.1%より良い再現性が得られた。

内挿法によるFe²⁺の測

定例をFig.19に示す。標準液 0.98 mg/ml で検量線を作成している。この例における再現性はC.V.で 0.06 %であった。

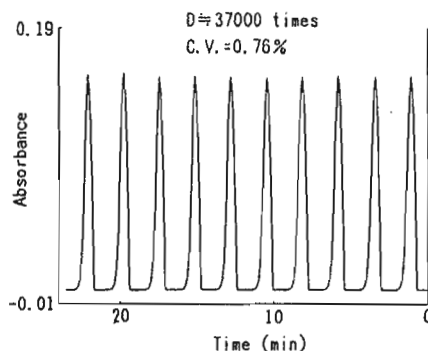


Fig.17 Recording and Reproducibility at 37000 Times Dilution

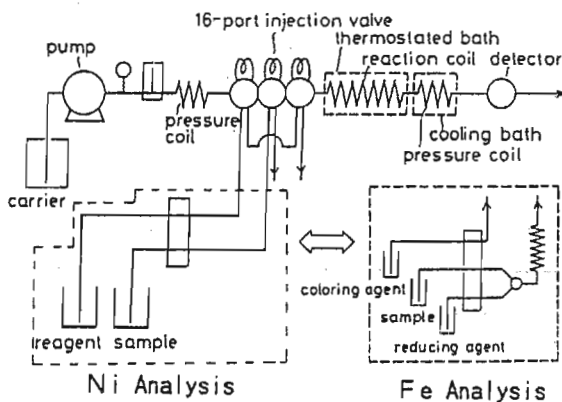


Fig.18 Flow Diagram for Fe and Ni Analysis

3-4) 液体クロマトグラフの検出器としてのF Iによる反応速度分析

酵素の分離を液体クロマトグラフで行なう場合には活性値の測定が必要になる。

この測定は反応速度法によるのが最適である。

このため液体クロマトグラフとストップフローを組み合わせた概略図をFig.20に示す^{9,10)}。

液体クロマトグラフからの流出液を6方バルブVsでサンプリングする。一方他の6方バルブVaで試薬をサンプリングする。

キャリアー液はバルブVcを通して流れる。混合された反応溶液はD₁のフローセルに流れ込む。ここで3つの6方バルブを切り替えフローセルの入口と出口の両方をクリップする。この様にして活性値を測定し、これを縦軸にとった液体クロマトグラフが得られる。

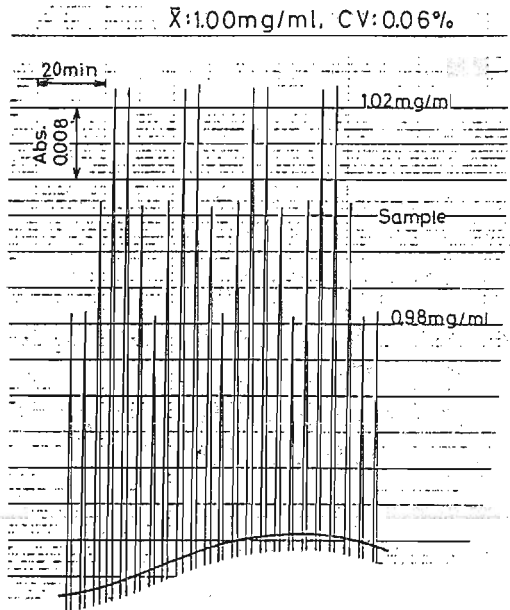


Fig.19 Recording of Fe²⁺ Analysis

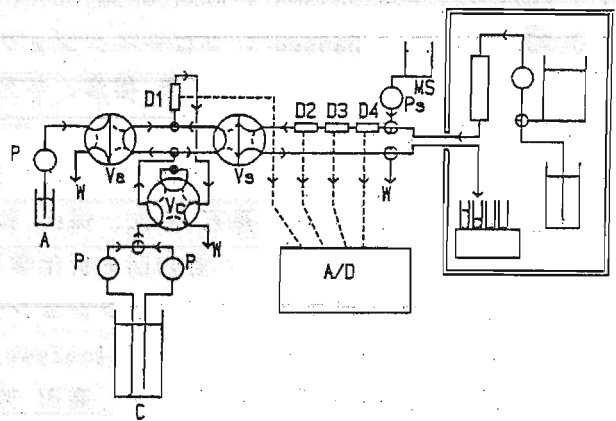


Fig.20 Schematic Diagram of Hyphenated LC-FIA

この例を Fig.21 に示す。
特に Vs は F I で云う連続
サンプリングでサンプリング
の間隔を短くしている。

4 おわりに

以上述べた様に F I 分析
法を支えるハードウェアの
中で流路系を組み立てる鍵
になるものが多方バルブで
ある。これの使い方によっ
て精度の高い分析とか、高
倍率希釈などが容易に行な
える様になった。ここに

F I におけるバルブの魔術があると云っても過言ではない。

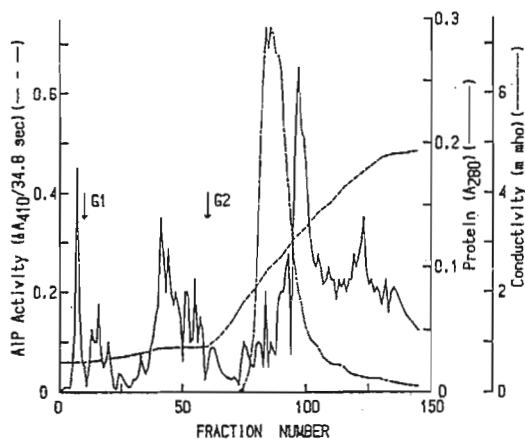


Fig.21 Chromatogram of Activity of
Calf Bone Alkaline Phosphatase

参考文献

- 1) J. Růžička, E.H.Hansen ; Anal.Chim.Acta, 78, 145 (1975).
- 2) J. Růžička, E.H.Hansen ; フローインジェクション分析法
石橋 信彦、与座 範政 訳、化学同人 (1983).
- 3) 上野 影平、喜納 兼勇 ; フローインジェクション分析法入門
講談社サイエンティフィック (1983).
- 4) 合田 淳子、打木 英夫、黒石 忠文、保田 和雄 ;
第44回分析化学討論会、於長崎 (1983).
- 5) J.Möller ; 第4回フローインジェクション分析研究会講演会 於千葉 (1985).
- 6) R.Kuroda, T.Nara and K.Oguma, ; Analyst, 113, 1557 (1988).
- 7) 白土 房男、岡島 義昭、黒石 忠文、高田 芳矩 ;
分析化学, 36, 515 (1987).
- 8) 白土 房男、岡島 義昭、黒石 忠文、高田 芳矩 ; ibid., 36, 233 (1987).
- 9) K.Takahashi, T.Kuroishi, K.Yasuda, T.Sano and S.Taniguchi ;
Anal. Chim. Acta., に投稿中。
- 10) 高橋 浩二郎、谷口 茂彦 ; 日立 S.I.News, 32, No.1, 10(1989).