

F I A のハードとソフトについて

名古屋工業大学 和田弘子

最近、F I A法は、J I Sの通則¹⁾が採用され、実用化が急速に進みつつある。従来、わが国でのF I Aに関する研究は主としてF I A用試薬、イオン選択性電極、固定化酵素などの開発及び応用、すなわちいわゆるF I Aのソフトウェア (software) の面で非常に優れた成果をあげてきた。F I Aの装置すなわちハードウェア (hardware) の面での開発は、欧米に先んじられたが、最近になってハード面での開発も盛んに行われている。

I F I Aのハードについて²⁾

初期には高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 用装置の部品や輸入品のペリスタポンプなどを組み合わせて使っていたが、多くの人々の経験に基づく助言から、最近では優れた国産 (日本製) のF I A用ポンプ、サンプルインジェクター、コネクター、検出器が市販されるようになった。また、ヨーロッパやアメリカ合衆国からの輸入品や日本製のF I A装置も容易に入手できるが、分析者の目的に合った装置を安価に自分で組み立てることが可能である。感度が高く、再現性のよい分析を行うためには、適切なポンプ、試料注入器、混合及び反応器、コネクター、抽出器と相分離器を選ぶことが大切である。

1. 送液システム

一般にポンプが用いられる。

適切なポンプを用いないとピークの再現性や感度が悪くなる。我が国では、プランジャーポンプ (reciprocating pump) とペリスタポンプ (peristaltic pump) が一般に用いられているが、欧米では主としてペリスタポンプが用いられている。

1. 1 F I A用ポンプとしては以下のような条件を満たすことが重要である。

- (a) 脈流の小さい流れ (pulse free flow)
- (b) 送液中に流量が変化しない (constant and reproducible flow-rate)

(c) 全溶媒に使用できる (use with all kinds of solvents)

プランジャーポンプとペリスタポンプの特徴を比較してみよう。

◇プランジャーポンプ (double plunger pump) の特徴

- (1) 長時間にわたって流量が一定
- (2) ほとんどの溶媒で使用できる
- (3) 流量の設定が簡単
- (4) 50 kg f / cm^2 までの耐圧性
- (5) 1~4チャンネルの送液が可能

◇ペリスタポンプの特徴

- (1) 送液チャンネル数が多い (1~16)
- (2) チャンネルによって流速を変えられる
- (3) 用いる溶媒に適したポンプチューブを選択する必要がある
- (4) ポンプチューブの寿命が短い (チューブが高価)

1. 2 ポンプの比較

私の研究室にある7種類のポンプで送液したときに生じる脈流を実験により比較した結果を以下に述べる。

用いた試薬とマニホールドをFig. 1 に示す。ポンプによりCu-TAMSMB錯体溶液とキャリアを送りM点で合流させた後、吸光度を測定した。比較に用いたポンプと混合チューブをTable 1に示す。

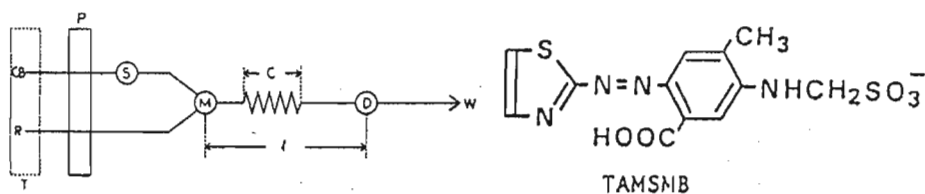


Fig. 1. Flow manifold. P, pump; S, sample injector; M, mixing joint; M-D, mixing tube ($l=75\text{cm}$); C, coil (50cm); D, detector; W, waste; CB, $0.05\text{M CH}_3\text{COOH/CH}_3\text{COONa}(\text{pH}5.0)+0.05\text{MKNO}_3$; R, $10^{-4}\text{MCu}(\text{NO}_3)_2+10^{-3}\text{MTAMSMB}+0.05\text{MCH}_3\text{COOH/CH}_3\text{COONa}(\text{pH}5.0)+0.05\text{MKNO}_3$; T, thermostat (25°C).

⑤ was not used for this experiment.

Fig. 2 に示すように、直線状75cmの反応器を用いて脈流が小さいのは、プランジャーポンプではサヌキ工業製のDM2U-1026とペリスタではTecatorのポン

Table 1. Reaction coils and pumps.

<u>Reaction coils</u>		
1	Single coil	50 cm(i.d. 2 cm) + Straight 25 cm
2	Double coil	50cm(i.d. 0.4 cm x 2) + Straight 25cm
3	Double coil	120cm(i.d. 0.4 cm x 2) + Straight 25cm
<u>Pumps</u>		
1	RP-4F	Reciprocating(4 plunger) JASCO
2	KHU-W-52	Reciprocating(2 plunger) KYOWA
3	DM2U-2044	Reciprocating(2 plunger) SANUKI (stroke 2.5 mm)
4	DM2U-1026	Reciprocating(2 plunger) SANUKI (Stroke 1.0 mm)
5	JP-4	Peristaltic ISMATEC
6	Minipuls 2	Peristaltic GILSON
7	FIA-5020	Peristaltic TECATOR

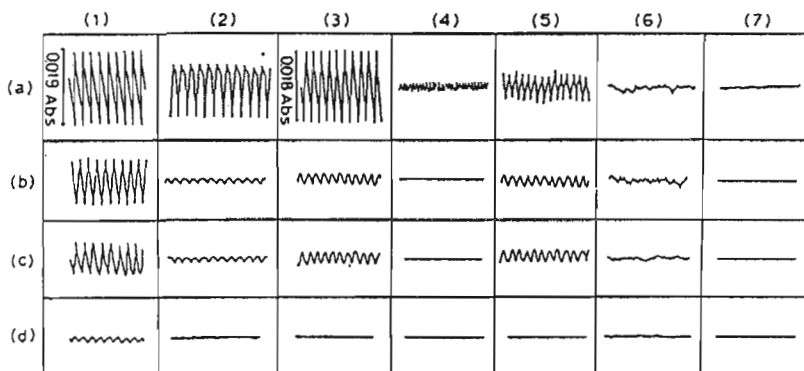


Fig. 2. Effect of flow pulsation of pump:(1-4)reciprocating pump;(5-7)peristaltic pump;the pump numbers correspond to the number given in Table 1. Mixing tube:(a) straight;(b)coiled(single);(c,d)coiled in figure-of-eight fashion. Length:(a-c)75cm(50cm coiled);(d) 145cm(120cm coiled). Helix diameter:(b)2cm;(c,d)0.4cm(x2). Flow-rate, 1.0ml/min. The piston motion of pumps 3 and 4 is different from that of pumps 1 and 2.

プである。他のポンプも8の字状にコイルを巻くと脈流は減少し、さらに120 cmの8の字状コイルを用いればほとんど問題はなくなる。ペリスタポンプの場合は、回転数が高い方が脈流は小さい。すなわち、径の小さいポンプチューブを用い、回転数を上げる方がよい。Fig. 3に示すペリスタポンプでは細いローラーの多くがポンプチューブと接触し、回転数の速い Tecatorのポンプが最も脈流が小さい。プランジャーポンプでは、Fig. 4に示す吸引、吐出モードが右の型に比べて左の型のポンプの脈流が比較的小さい。特にストロークの短いものが優れている。

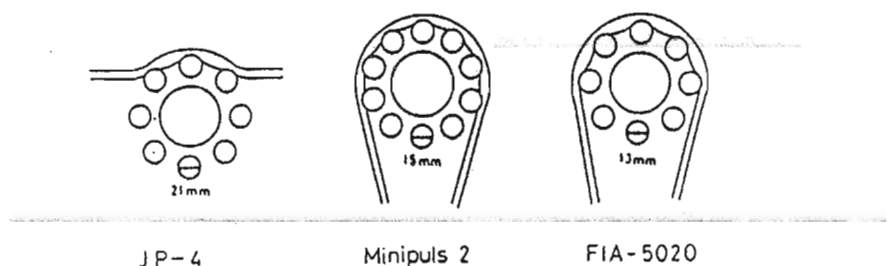


Fig. 3. Peristaltic pumps.

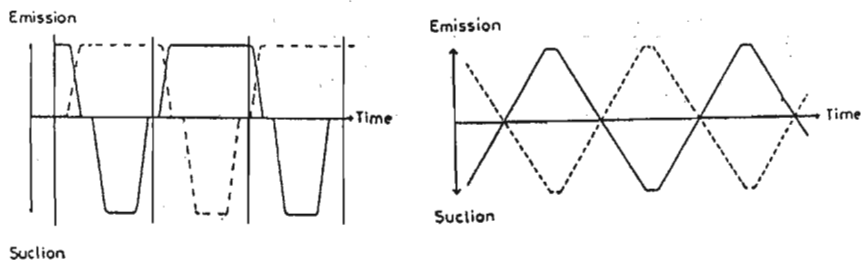


Fig.4. Reciprocating pumps.

2. サンプルインジェクター

サンプルインジェクターの条件

- (a) デッドボリウムが小さい
- (b) 注入量の再現性がよい
- (c) インジェクターからの汚染がない
- (d) 繰り返しの注入で液漏れがない

ループ式サンプルインジェクターが注入量の再現性がよい。最近、10万回以上の使用に耐えるセラミックのブロックを使用したものが市販されている。これは高濃度の塩を含む試料溶液を多数回注入しても液もれがない。テフロンやダイフロンを用いたインジェクターは液もれを生じやすい。サンプル採取時のシリンジからの金属などの汚染を防ぐためには吸入方式をとるとよい。

3. 混合および反応コイル

通常、テフロン (PTFE) 細管をコイル状に巻いたものを用いる。コイルの巻き方はピーク高さおよびピーク幅及び再現性に影響を与える。コイルの巻き方によるピークの形状の変化を実験によって調べた。Fig. 5に用いた反応コイルを示す。Fig. 6に用いたマニホールドを示す。ポンプの影響を最小限にするために検出器の後にペリスタポンプを置き吸引する方法をとった。サンプルはインジェクターの影響がないように窒素ガス圧による hidroダイナミックインジェクション法で行った。試料として反応速度の速い Cu^{2+} 及び反応の比較的遅い Ni^{2+} を緩衝液に注入し、TAMSMBと反応させ生成した錯体の吸光度を測定した。

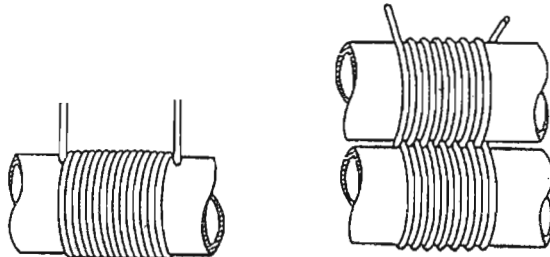


Fig. 5. Single coil Double coil wound in a figure-of-eight fashion

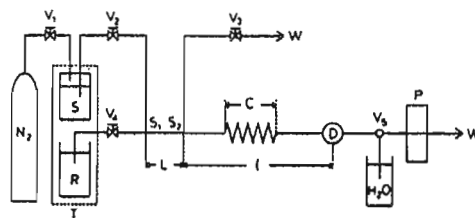


Fig. 6. Flow manifold. S_1 - S_2 , sample tube (length 15cm); S_2 -D, mixing tube (75cm); C, coiled tube (50cm); P, peristaltic pump; V_1 - V_4 , two-way valves; N_2 , nitrogen cylinder; D, detector; T, thermostat (25°C); W, waste; S, sample [$10^{-4}M Cu(NO_3)_2$ or $10^{-4}M Ni(NO_3)_2$ + 0.05M CH_3COOH/CH_3COONa (pH 5.0) + 0.05M KNO_3]; R, reagent solution [$10^{-3}M$ TAMSMB + 0.05M CH_3COOH/CH_3COONa (pH 5.0) + 0.05M KNO_3].

Fig. 7には直線状とシングルコイルの直径を3, 2, 1 cmと変えた場合のピークの形状を示す。コイルの径が小さくなるに従ってピークがシャープとなるが、流速が速いとダブルピークとなる。Fig. 8にはさらに細かく8の字に巻いた場合の結果を示すが、シングルコイルに比べて更にシャープで高いピークが得られ、ダブルピークもなくなる。径4 mmの8の字状コイルを用いると最もシャープなピークが得られた。流速が遅いと分散が大きくなりすぎてピークは低くなる。Fig. 9には比較的反応速度の小さいNi²⁺の場合のピークを示すが、遅い反応では8の字コイルを用いると非常に有利なことがわかる。

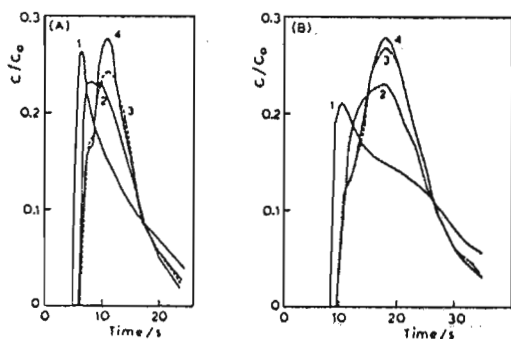


Fig.7.Effect of mixing tube on the peak profiles for Cu(II)/TAMSMB system.Flow-rate(ml/min) (A)1.0;(B)0.6.Tubing:(1)straight tube;(2)coiled tube(single) with helix diameter of 3cm;(3)as(2) with helix diameter of 2cm;(4) as (2) with helix diameter of 1cm.

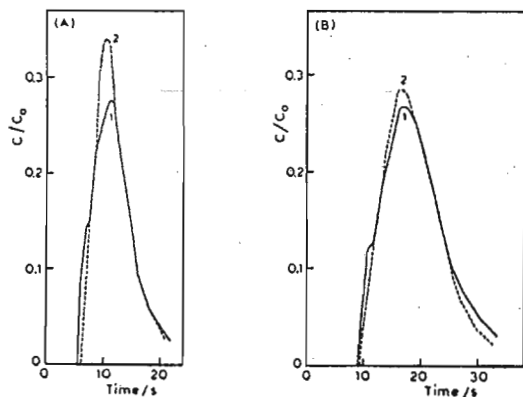


Fig.8.Flow-rate(ml/min):(A)1.0;(B)0.6. Tubing:(1)coiled tube (single) with helix diameter of 0.4cm;(2)coiled tube (figure-of-eight fashion) with helix diameter of 0.4cm(x2).

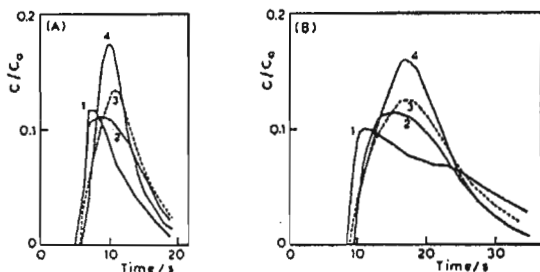


Fig.9. Ni(II)/TAMSMB system. Flow-rate(ml/min):(A)1.0;(B)0.6. Tubing:(1)straight tube;(2,3) coiled tube (single) with helix diameter of 3cm and 0.4cm, respectively;(4)coiled tube in figure-of-eight fashion with helix diameter of 0.4cm(x2).

4. コネクター（ジョイント）

コネクターには通常、フレアー型、スエージロック型、フランジ型、コレット型が用いられる（Fig. 10）。

（a）フレアー型

先端を専用のコテで広げる。耐圧性であるが細工の仕方次第でデッドボリウムが大きくなることもある。径の異なるチューブも接続ができる。

（b）スエージロック型

細工はいらない。フェラルが変形し易い。

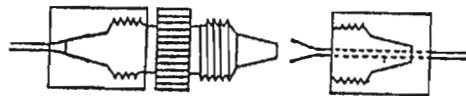
（c）フランジ型

チューブの先端を特殊な装置で広げ平にする。熟練を要する。先が切れやすい。

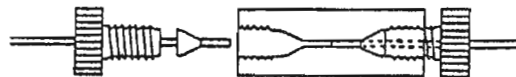
（d）コレット型

細工はいらない。径の異なるテフロン管およびガラス管を接続できる。マイクロカラムの接続に良い。

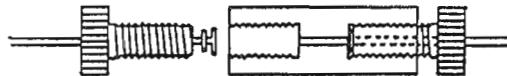
(1) Flare type



(2) Swagelok type



(3) Flange type



(4) Collet type



Fig. 10. Connectors

5. ミクシングジョイント

混合の角度が 90° より 60° 、 60° より 30° が良いと言われている。二流路が合流する角度の影響を調べるため、 90° と 60° で混合するデッドボリウムの小さい三方ジョイントについて調べた。 Fig. 11にそのつなぎ方を示す。用いたマニホールドはFig. 1と同じであるが、Sから銅（II）を注入し、M

No.	1	2	3	4	5	6

P:Product B:Carrier R:Reagent

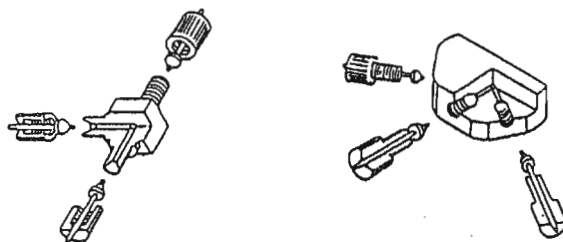


Fig. 11. Shape of mixing joint

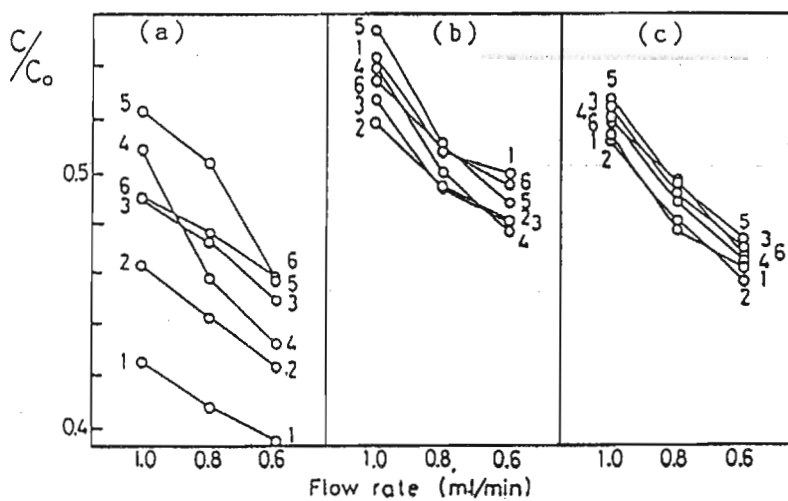


Fig. 12(A). Effect of mixing joint on peak height.
Cu(II)-TAMSMB. Pump used: (a) JP-4 (b) DM2U-2044 (c) DM2U-1026.
Reaction coil: single coil 50cm. The numbers correspond to those in Fig. 11.

のところには調べるジョイントを用いている。Fig. 12(A)の(a)は脈流の大きいポンプを用い、(c)は小さいポンプを用いた。Fig. 12(B)は(a)のポンプを用い、(a)はシングルコイル50cmを用い、(b)は8の字コイルの50cmを、(c)は120cm8の字コイルを用いている。

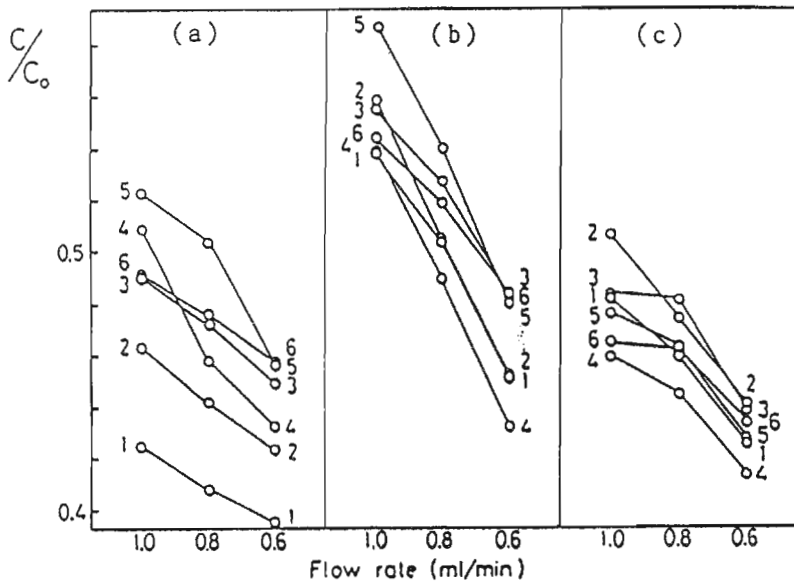


Fig. 12(B). Effect of mixing joint on peak height. Reaction coil:(a)single coil 50cm;(b)double coil 50cm; (c)double coil 120cm. Pump used:JP-4. The numbers correspond to those in Fig. 11.

反応コイルを8の字状に巻き、脈流の小さいポンプを用いれば、ミクシングジョイントの形状はほとんどピーク高さに影響しないことがわかる。(a)、(b)は再現性がよくない。

II FIAのソフトについて

FIAに関する公刊論文のうちで吸光光度検出によるものが約50%を占めているといわれている。ここでは、主として金属イオンの定量に用いられる呈色試薬(有機試薬)について述べる。それらの研究の多くは、従来のバッチ法をそのままあるいは多少発色条件を変えてFIAに応用している。従来のバッチ法では非常に厳密な条件設定が必要な方法でもFIA法で行うことによって改善できる場合がある。例えば、発色試薬の試薬ブランクが高い場合、発色試薬と試料との反応速度が比較的小さいので一定時間放置する必要がある場合、発色試薬自身や反応生成物が不安定であるような場合でもFIAを行うことによって良い結果が得られる場合が多い。FIAに用いる発色試薬はバッチ法で必ずしも良い試薬でなくてもよい。

1. 従来からバッチ法で用いられている発色試薬のFIA法への応用

(I) o-クレゾールフタレインコンプレクソン (PC)

マグネシウムを8-キノリノールでマスクし、血清³⁾、ミルク⁴⁾、ケイ酸塩⁵⁾中のカルシウムを定量した。

(II) 1,10-フェナントロリン

1,10-フェナントロリンを用いる鉄の定量では通常、発色を完全にするために30分程度放置してから吸光度を測定するが、FIA法では短時間に定量することができる。Fe(II)とFe(III)の分別定量に種々の方法が用いられている。サンプルを注入したキャリアーにアスコルビン酸を導入し、まず全鉄の濃度を測定したのち、アスコルビン酸の導入を止め次のサンプルを注入してFe(II)のみを定量する。⁶⁾あるいは、注入されたサンプルを二流路に分け、一方はそのままFe(II)のみを発色させて定量し、他方は流路中に組こんだジョーンズの還元器を通してFe(III)を還元して全鉄を定量する。⁷⁾

(III) 4-(2-ピリジルアゾ)レソルシノール (PAR)

PARは、一般にpH4~6以下でプロトン付加錯体を生成し、pHが高くなるにつれてプロトン解離が起こるため錯体の吸光度はpH変化に鋭敏であるが、FIA法ではpHを一定に保つことができる。また、選択性に乏しいので、マスク剤の使用が必要であるが、PAR溶液にピロリン酸ナトリウムを加え鉄をマスクして、ニッケル-鉄合金中のニッケルが定量された。⁸⁾また、PARは、マグネシウム共存中のカルシウムの定量にも用いられた⁹⁾。PARの存在下でカルシウムは亜鉛-EGTAと置換反応によりZn(PAR)₂を生成し、その吸光度はカルシウムの濃度に比例する。

(IV) エリオクロムシアニンR (ECR)

アルミニウムはECRとpH3で反応するが、試薬ブランクが大きいのでバックグラウンドを下げるために、反応後pHを6にする必要がある。AlとECRを反応させたのち下流で緩衝液と合流させてpHを6に調整したのち検出する。土壌や植物中のAlの定量に応用されている。¹⁰⁾

(V) キシレノールオレンジ (XO)

XOはキレート適定の指示薬として広く用いられているが、pH及び金属イオンの濃度によって生成する錯体の組成が異なるため比色分析にはあまり用いられていなかった。亜鉛¹¹⁾、アルミニウム¹²⁾、ベリリウム¹³⁾などのFIAに応用された。

(VI) アリザリンコンプレクソン (ALC)

ALCのランタン錯体はフッ化物イオンの定量に用いられているが、反応が遅く試薬ブランクも大きい欠点がある。FIA法では、5mの反応コイルを60°Cに加熱して迅速に定量できる。¹⁴⁾

その他、バソクプロインによる銅¹⁴⁾、クロロフォスフォナゾⅢによるカルシウムの定量¹⁶⁾、ピロカテコールバイオレットによるビスマスの定量¹⁷⁾、ジチゾンによるカドミウムの定量¹⁸⁾、ジフェニルカルバジドによるクロムの定量⁶⁾、ジアンチピリルメタンによるチタン¹⁹⁾の定量などの報告がある。

2. 新しいFIA用呈色試薬の設計と合成

FIAの迅速性、マニホールドやシステムの簡単化などを考慮して種々のFIA用試薬の設計と合成が行われている。

FIA用呈色試薬の望ましい性質として以下のことがあげられる。

(1) 高感度であること

高感度な呈色試薬を用いると、注入する試料量を小さくできる。また、バッチ法のように完全に平衡に達した後で吸光度を測定するのではなく、反応の途中で測定される場合が多いので、呈色試薬の感度が高いと有利である。

(2) 試薬及び錯体が水溶性であること

FIAではポンプチューブの材質の問題や溶媒抽出における相分離器の開発が遅れたこともあって、従来ほとんど水溶液が用いられてきた。水溶性試薬を用いて水系で行うことができれば、複雑なFIAシステムを用いる必要がないため、分析条件の設定が簡単で、迅速である。

(3) 選択性が高いこと

FIAの迅速性という特徴から前処理に時間がかからない方法が望まれるから、用いる呈色試薬は選択性に優れているものがよい。

(4) 反応速度が大きい

反応速度が大きいと長い反応コイルを使用したり、加熱する必要がない。

このような条件を満たすにはどのように試薬を設計すればよいか。アゾ系試薬 (Fig. 13) を例にとると、アゾ基のp-位に強い電子供与性を有するアルキルアミノ基を導入することによって感度が著しく増大する。例えば、3, 5-di Br-PAESPAP²⁰⁾はアルキルアミノ基のないPANなどに比べて3倍位感度が高い。

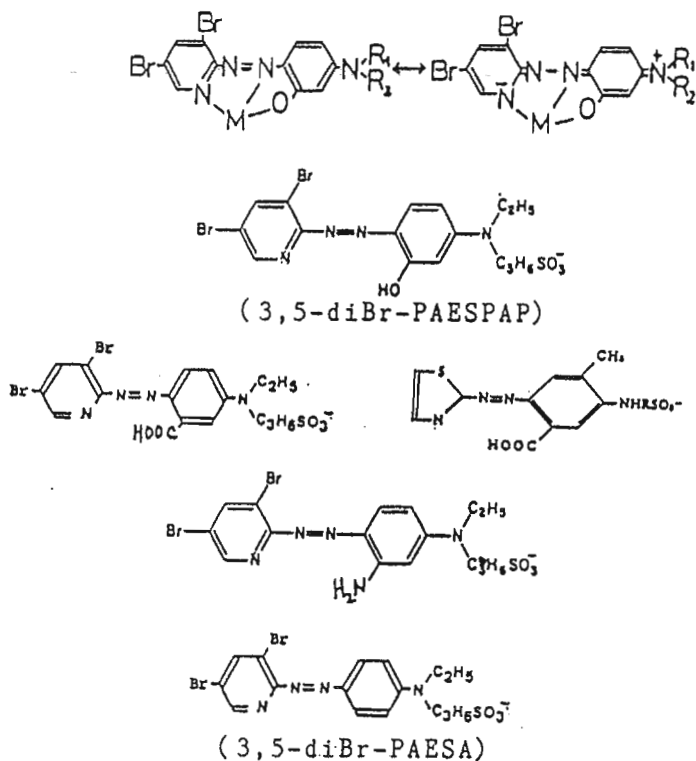


Fig. 13

試薬を水溶性にするためには、ベンゼン環やナフタレン環に直接スルホ基を導入する方法が一般的であるが、上記の試薬のアルキルアミノ基の末端にスルホ基を導入して、試薬の高感度性を保ったまま水溶性にすることができる。

水溶性試薬の場合とくに選択性が高いことが重要である。

例えば、TAMS・MBは3,5-diBr-PAESPAPなどのアゾのo-位のOH基をCOOH基に変えることによって錯形成能を低下させ、銅に対する選択性を向上した試薬である。²¹⁾また、NH₂基に変えた試薬はCoに対して選択性が高い。

3,5-diBr-PAESAは3,5-diBr-PAESPAPのo-位のOH基を除いた二座配位子であるため、水溶液中では銀と銅とわずかに反応するが、陰イオン性界面活性剤の存在下で銅及び銀と鋭敏に反応し選択性が高い。²²⁾

反応速度の向上は、例えば、ポルフィン化合物のN-CH₃TSP (Fig. 14)に見られる。ポルフィン系試薬は一般に金属イオンとの反応速度が極めて小さくFIAには殆ど用いられていない。N-CH₃TSPはCu(II)との反応速度がメチル基の無いものに比べて1000倍大きいのでFIAに用いることができる。²³⁾

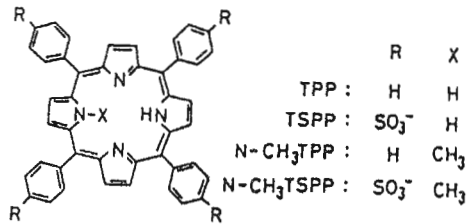


Fig. 14

文献

- 1) フローインジェクション分析法通則 J I S K O 1 2 6 - 1 9 8 9
- 2) H. Wada, Y. Sawa, M. Morimoto, T. Ishizuki, G. Nakagawa, Anal. Chim. Acta, 220, 293(1989).
- 3) E. H. Hansen, J. Ruzicka, Anal. Chim. Acta, 100, 419(1979).
- 4) W. D. Basson, J. P. van Staden, Analyst(London), 104, 419(1979).
- 5) 小熊幸一、加藤康彦、黒田六郎、分析化学 34, T98(1985).
- 6) R. A. Leach, J. Ruzicka, J. M. Harris, Anal. Chem., 55, 1669(1983).
- 7) A. T. Faisullah, A. Townshend, Anal. Chim. Acta, 167, 227(1985).
- 8) 白土房男、岡島義昭、黒石忠文、高田芳矩、分析化学 36, 233(1987).
- 9) G. Nakagawa, H. Wada, C. Wei, Anal. Chim. Acta, 145, 135(1983).
- 10) B. F. Reis, H. Bergramin F., E. A. G. Zagatto, F. J. Krug, Anal. Chim. Acta, 107, 309(1979).
- 11) R. Kuroda, T. Mochizuki, Talanta, 28, 389(1981).
- 12) T. Mochizuki, Y. Toda, R. Kuroda, Talanta, 29, 659(1982).
- 13) T. Mochizuki, R. Kuroda, Fresenius' Z. Anal. Chem., 305, 277(1981).
- 14) H. Wada, H. Mori, G. Nakagawa, Anal. Chim. Acta, 172, 297(1985).

- 15) A. T. Faisullah, A. Townshend, anal. Chim. acta, 172, 291(1985).
- 16) Y. Yauxian, Anal. Chim. Acta, 212, 291(1988).
- 17) D. Betteridge, Chem. Br. 16, 646(1980).
- 18) J. L. Burguera, M. Burguera, Anal. Chim. Acta, 153, 207(1983).
- 19) T. Mochizuki, R. Kuroda, Analyst(London), 107, 1255(1982).
- 20) H. Wada, G. Nakagawa, K. Ohshita, Anal. Chim. Acta, 153, 189(1983).
- 21) 立花賢治、今村寿明、斉藤幹彦、喜納兼勇、分析化学 32, 776(1983).
清水博司、村上 学、第8回フローインジェクション分析研究会講演要旨集、
1(1988). H. Wada, T. Ishizuki, G. Nakagawa, Mikrochim. Acta,
1983III, 235.
- 22) K. Ohshita, H. Wada, G. Nakagawa, Anal. Chim. Acta, 176, 41(1985);
182, 157(1986).
- 23) S. Funahashi, Y. Ito, H. Kakita, M. Inamo, Y. Hamada, M. Tanaka,
Mikrochim. Acta, 1986I, 33.