

# フィードバック制御フローレイシヨメトリーによるハイスループット滴定

田中 秀治

徳島大学大学院医歯薬学研究部 (薬学系) : 770-8505 徳島市庄町 1-78-1

## High throughput titration by feedback-based flow ratiometry

Hideji Tanaka

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University, Shomachi 1-78-1, Tokushima 770-8505, Japan

In this tutorial review, the principle of flow ratiometry and its application to flow titration are described. Throughput rate of the titration is greatly increased by combining feedback-based control and fixed triangular wave control, where the scan rate and scan range in the latter mode are respectively steeper and narrower than those in the former mode. Unprecedented high throughput rate (maximally 34 titrations per minute, corresponding to 1.76 second per titration) with reasonable precision (RSD < 0.5 %) has been achieved by this approach.

**Keywords** flow ratiometry, titration, feedback-based control, triangular wave control, high throughput

### 1. 緒言

#### 1.1 滴定法

滴定法 titrimetry (容量分析法 volumetric analysis) は、その高い精度や汎用性などの優れた長所のため、現在でも広く用いられている古典的分析法の一つである。その起源は1729年のGeoffroyによる食酢の酸塩基滴定にまで遡ることができる [1]。試料中の目的物質が標準液中の既知量の滴定剤と化学量論的に反応するならば、標準物質による検量線の作成を必要としない絶対法 absolute method である。検量線を介して定量が行われる相対法 relative method に比べて、原理的には、より正確な分析値を得ることが期待できる。しかし、物質の化学的性質 (化学反応性) に基づいているため、選択性が低く、多成分系の試料の分析にはあまり向いていない。微量成分の分析にも適していない。したがって滴定法は、常量分析 macro analysis や主成分分析 major analysis に適した分析法であると言える。筆者が属する薬学領域でも、多くの日本薬局方医薬品が滴定法によって定量されている。

#### 1.2 フロー滴定法

伝統的な滴定は、ビュレットなどのガラス器具を用いて手操作で行われる。しかし、煩雑で時間を要する作業であり、多数の試料を取り扱うことは困難である。また、比較的多量の試料と試薬を必要とする。そこで、細管内の流れを利用した自動連続滴定法、すなわちフロー滴定法が開発されてきた。フローインジェクション滴定法 flow injection titration [2,3]、シーケンシャルインジェクション滴定法

sequential injection titration [4]、試料溶液と標準液の流量比の変化に基づくフロー滴定法 [5-7] (フィードバック制御フローレイシヨメトリーの原点と言える)、流量比一定のもと標準液の濃度を变化させるグラジエント滴定法 [8-12]などである。これらについては拙著解説 [13]を参照されたい。

本稿では、筆者らが開発したフィードバック制御フローレイシヨメトリー feedback-based flow ratiometry [14,15]の発展型である、フィードバック制御と固定三角波制御の併用に基づく超ハイスループット滴定法 [16-18]について、その原理と方法論を解説する。以下では、理解を容易にするために、単純な酸塩基滴定 (水酸化ナトリウム NaOH 標準液による塩酸 HCl の滴定) を例に説明する。

### 2. システム

#### 2.1 フローシステム

Figure 1 にフィードバック制御フローレイシヨメトリーの基本的な流路構成を示す。総流量  $F_T$  一定のもと、酸塩基指示薬であるプロモチモールブルー (BTB) を含む NaOH 標準液 B (濃度  $C_B$ , 流量  $F_B$ ) を流量可変ポンプ  $P_1$  によって送液する。被滴定液である HCl 水溶液 A (濃度  $C_A$ ) は受動的に吸引され (流量:  $F_A = F_T - F_B$ ), NaOH 標準液と合流する。これを検出器 D のフローセル FC へと導く。指示薬 BTB の極大吸収波長  $\lambda_{max}$  における透過光強度をフォトダイオード PD で測定し、増幅器 Amp で増幅した後、AD/DA コンバータを介して検出信号  $V_d$  としてコンピュータ PC に取得する。BTB の塩基性色 (青色) の  $\lambda_{max}$ , すなわち 616 nm でモニターした場合、 $V_d$  は酸性領域では高く、アルカリ性

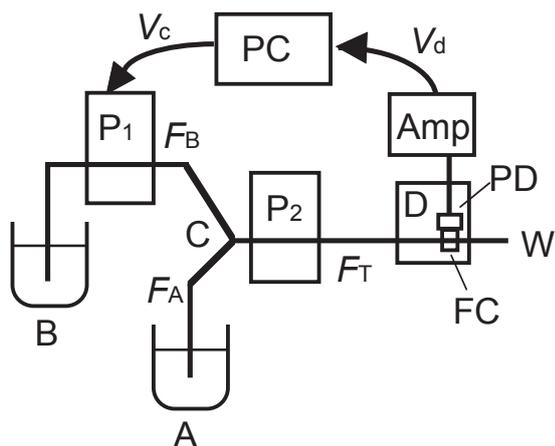


Fig. 1 Flow system of feedback-based flow ratiometry  
 A, acid solution; B, base solution containing acid-base indicator; W, waste; P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub>, peristaltic pump; C, confluence point; D, spectrophotometer; FC, flow cell; PD, photodiode; Amp, current amplifier; PC, laptop computer with A/D-D/A converter; V<sub>c</sub>, control voltage; V<sub>d</sub>, detector output voltage. F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> and F<sub>T</sub> are flow rates of acid, base and mixed solutions, respectively.

領域では低い値を示す。制御信号 V<sub>c</sub> による P<sub>1</sub> の制御，データの取得と解析，図表のモニター表示は，Excel VBA による自作プログラムを用いて自動化した。

## 2.2 装置およびプログラム

送液には，Rainin 製ペリスタポンプ Dynamax RP-1 を用いた。同ポンプでは，背面の外部制御端子から 0～5 V の制御電圧 V<sub>c</sub> を入力することにより，V<sub>c</sub> に比例した速度でヘッドを回転させることができる。前面パネルで 40 rpm (上限は 48 rpm) に設定した場合，2 V の V<sub>c</sub> が入力されたなら，40 rpm × 2 V / 5 V = 16 rpm で回転することになる。頑丈で耐久性に優れた 10 個のステンレス製ローラーをもつ優れた製品であったが (ローラー数が多いため，脈流の発生が低減される)，現在では販売されていない。数万円ほど高価にはなるものの，Gilson 社から，同程度の機能を有するペリスタポンプ MINIPULS-3 が 30 万円台前半で入手できる。

アナログ信号とデジタル信号との変換には Measurement Computing (以下，MC 社) 製のカード型 AD/DA コンバータ PC-CARD-DAS16/12-AO を使用した。入力チャンネル数は最大 16，出力チャンネル数は 2 である。これも現在では販売されておらず，代わりに USB 接続の AD/DA コンバータが入手可能である。制御・計測プログラムの作成については，筆者はコンピュータやプログラミングに明るくないので，正確かつ詳細に説明することは難しい。基本的には，MC 社のソフトウェア "Universal Library" の下層に，

同ソフトウェアの関数や Microsoft Excel のコマンドを用いて，分析パラメータの読み込み，制御信号の出力，検出信号の取得，解析，表作成，グラフ作図などのプログラムを，Visual BASIC の言語で書き加えている。日本のメーカーの製品なら，同程度の機能を有する AD/DA コンバータを半額程度で入手できる。筆者は CONTEC 社製品を現有している。しかし，メーカー特有のコマンドを理解し，覚えなければならない煩雑さを恐れ～実はそれほど大変ではないのかもしれない～いまだに MC 社の製品を使用している。

本稿で紹介する実測データは，島津 UV-120-02 型単光束分光光度計を用いて得た。実際には，同分光光度計の光源と分光部しか活用していない。そのセル室に浜松ホトニクス S2281 型フォトダイオードを設置し，透過光強度を測定した。同ダイオードからの信号を同社製 C2719 型電流増幅器によって増幅したのち，検出信号 V<sub>d</sub> としてコンピュータに取得した。フローセルは自作のもので，内径 1 mm の石英管を用い，光軸を横切るように垂直方向に配置した。流れの中の微小領域を観察できる上，気泡が混入してもすぐに抜けるメリットもある。しかし，光路長が短いため感度の面では妥協せざるを得ない。紫外可視検出器に自作フローセル等を取り付ける場合，洗練された最新機種ではセル室もコンパクトであり，細かな手作業が難しい (それに，標準装備品を取り外すのはもったいない)。上記分光光度計は，機種更新のために廃棄処分される古い学生実習用機器を引き取ったものである。そこまで古くなくても，型遅れの検出器が科学機器リサイクル業者から販売されており，新品定価の 4 分の 1 程度で入手できる。安物買いの銭失いになりはしないかという不安はつきまとうが，筆者がこれまで購入した限りでは，いずれもメンテナンスの行き届いたものであった。中古品ゆえのリスクもあるので積極的にはお勧めしないが，限られた研究費を有効に活用するための一方法かとも思う。

## 3. 原理

### 3.1 フロー滴定における遅れ時間

Figure 1 に示した流路構成のもとでは，当量点組成を与える試料溶液と標準液の流量比 R<sub>f</sub> が必ず存在する。この R<sub>f</sub> を求めれば，通常のパッチ滴定における体積比 (量り取った試料の体積 / 滴加した標準液の体積) と同様に考え，定量分析が行える。しかし，フロー滴定がパッチ滴定と異なる点は，合流点における両液の混合と，下流に設置した検出器によるその観察との間に遅れ時間 lag time (t<sub>lag</sub>) が存在することである。この t<sub>lag</sub> は，主として合流点から検出器までの液の移動時間に相当する (その他，検出器の応答に要する時間もわずかに含まれると考えられる)。したがって，現在観察している現象は，過去に起こった (制御された) できごとと言える。R<sub>f</sub> を変化させるごとに，しばらくその

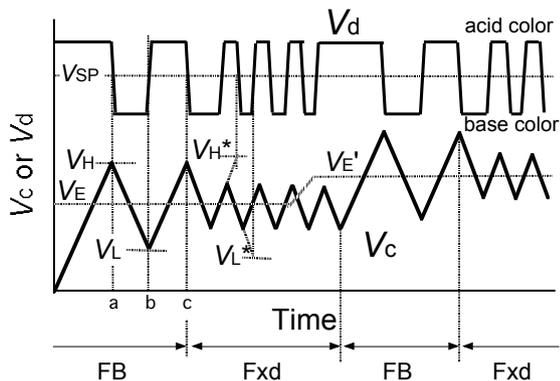


Fig. 2 Principle of feedback-based and subsequent fixed triangular wave controlled flow ratiometry

$V_c$ , control voltage;  $V_E$  and  $V_{E'}$ , control voltages that give the equivalence composition at the confluence point;  $V_H$  and  $V_L$ , maximum and minimum  $V_c$  in feedback-based mode;  $V_{sp}$ , set point (approximate  $V_d$  at the equivalence point); FB, feedback-based control mode; Fxd, fixed triangular wave control mode.

値を維持し、これに対応する検出信号  $V_d$  が下流で得られるまで待てば、バッチ滴定と同様の滴定曲線を作成することができる。しかし、この方法では、測定に時間を要する。Blaedel と Laessig [5,6]は、標準液流量を変化させつつ電位差検出を行い、 $V_d$  があらかじめ求めておいた当量点シグナルに許容誤差範囲内で一致するよう、標準液流量の値を収束させた (1 滴定あたり約 5 分を要する)。筆者も、フロー滴定の研究開始当初は、温度制御などに用いられる PID コントローラを使って、フィードバック制御により  $R_f$  を当量点組成を与える値に収束させようとした [14]。しかし、数秒の  $t_{lag}$  があるためにオーバーシュート (たとえば、下流での検出において当量点を行き過ぎているため上流の制御において標準液流量を下げようとする、今度は下げすぎてしまう) が起こり、当量点を与える  $R_f$  に完全に収束させることは困難であった。

### 3.2 フィードバック制御と固定三角波制御を併用したフローレイシヨメトリーによる滴定

そこで、流量比  $R_f$  を当量点を与える値に収束させることは断念し、 $R_f$  を連続的に変化させつつ当量点を見出すことにした。筆者が提案したフィードバック制御と固定三角波制御を併用したフローレイシヨメトリーによる滴定法 [16,17]の原理を Fig. 2 に示す。制御信号  $V_c$  を直線的に増大 (NaOH 流量が増加) させつつ、下流で検出信号  $V_d$  をモニターする。試料溶液と標準液の合流点 (Fig. 1 の C) において当量点組成を与える  $V_c$  を  $V_E$  とする。 $V_c$  が  $V_E$  に達しても、その瞬間には  $V_d$  は当量点信号  $V_{sp}$  を示さない。これは、 $V_c$  が決定するのは両液の合流点における組成であり、混合された液が下流の検出器で測定されるためには、上で述べた

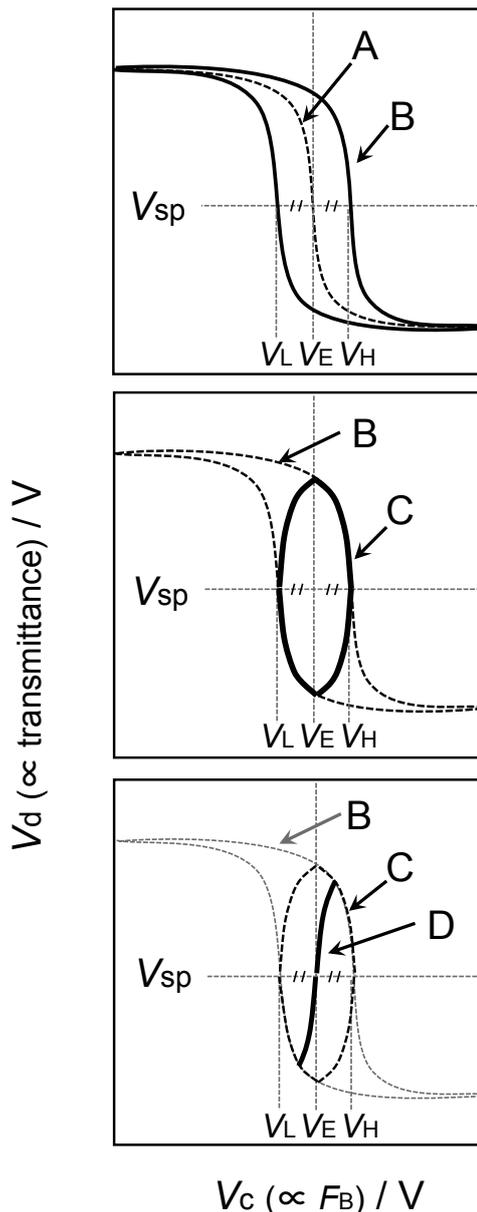


Fig. 3 Titration curves of flow ratiometries

(A) Conventional flow ratiometry, (B) Fixed triangular wave controlled flow ratiometry, (C) Feedback-based flow ratiometry, (D) Fixed triangular wave controlled flow ratiometry following to feedback-based flow ratiometry.

時間の遅れ  $t_{lag}$  が存在するためである (総流量  $F_T$  が一定なので、 $t_{lag}$  はほぼ一定とみなせる)。 $V_c$  が  $V_E$  を通過したのち、 $t_{lag}$  遅れて  $V_d$  が  $V_{sp}$  に達した瞬間に  $V_c$  走査を下降方向に転じ、次に  $V_{sp}$  が検出されたとき再び上昇方向に転じる (フィードバック制御: FB)。このような操作を繰り返すと、 $V_c$  は周期  $4 t_{lag}$  の三角波の形状を示す。隣り合う  $V_c$  の極大値  $V_H$  と極小値  $V_L$  を平均することで  $t_{lag}$  の影響が相殺され、 $V_E$  が求められる。こうして、一旦  $V_E$  の位置が決定されると、これを中心として  $V_L \sim V_H$  よりも狭い範囲で、かつより高い走査速度で  $V_c$  を固定三角波制御 (Fxd) する。この場合、当量点

信号  $V_{sp}$  の検出を待つことなく  $V_c$  走査は逆方向に転ずる。しかし、走査方向を反転させる前の  $V_c$  を、 $V_{sp}$  が検出された時刻まで外挿することで、上述の  $V_H$  と  $V_L$  に相当する値 (それぞれ  $V_H^*$  および  $V_L^*$ ) を得ることができる。隣り合う  $V_H^*$  と  $V_L^*$  を平均することで、 $V_E$  が求められる。なお、 $V_H^*$  と  $V_L^*$  の高さが  $V_H$  と  $V_L$  の高さそれぞれ異なっているのは、フィードバック制御よりも固定三角波制御の方が、ハイスループット化のためにより高い  $V_c$  走査速度を採用していることによる。もし試料濃度が変化して、固定三角波制御では当量点をカバーできなくなったなら、 $V_d$  は高値あるいは低値に留まり、 $V_{sp}$  に達することはない。所定の時間内に  $V_{sp}$  が検出されなかった場合は、適切な方向に再びフィードバック制御が開始され、新たな当量点  $V_E'$  が決定されるようプログラムしている。

### 3.3 滴定曲線

本法の原理を滴定曲線から考える。Figure 3 に各種フローレイシヨメトリーによって得られる滴定曲線を模式的に示す。制御信号  $V_c$  によって試料溶液と標準液の流量比  $R_f$  を変えるごとに、これに対応する検出信号  $V_d$  が得られるまでしばらく  $V_c$  を維持すれば、一つの  $V_c$  に一つの  $V_d$  が対応することになる (A)。したがって、滴定曲線はバッチ滴定における滴定曲線と同様に、1本の曲線となる。もし、 $V_c$  を一定値に維持することなく、広い固定範囲を直線的かつ連続的に走査したならば (固定三角波制御フローレイシヨメトリー fixed triangular wave controlled flow ratiometry [14]), 遅れ時間  $t_{lag}$  の存在のために滴定曲線はループ状 (B) になる

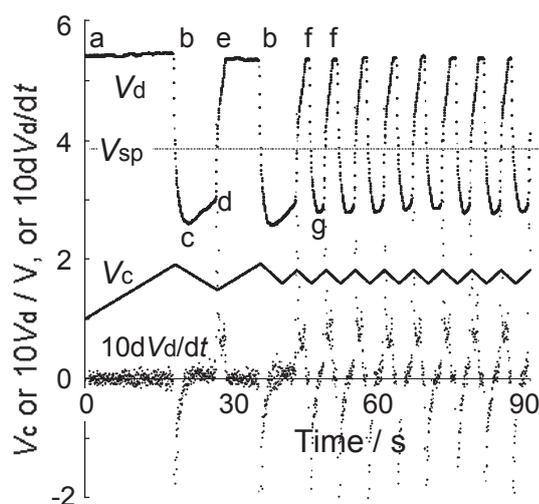


Fig. 4 Typical results for the titration of  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl with  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH; Temporal profile of control signal  $V_c$ , detector output signal  $V_d$  and the slope of  $V_d$ .

(その  $V_d$  が検出された瞬間には、 $V_c$  はもっと先の値に進んでいるため)。この方法は、従来法 (滴定曲線 A) に比べてかなり効率的であるが、定量に必要なのは当量点近傍の情報だけでよいので、無用な領域にまで走査が行われていると言える。当量点が検出された瞬間に  $V_c$  の走査方向を反転させるフィードバック制御フローレイシヨメトリー [14,15]では、上昇方向の滴定曲線からショートカットして下降方向のそれに移行するので、 $V_c$  の走査範囲はより狭く、より効率的になる (C)。フィードバック制御と固定三角波制御を併用 [16,17]して、後者では前者よりさらに狭い固定範囲を走査すると、滴定曲線は D のようになり、効率はさらに高まる。

### 4. 実測例

Figure 4 に  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  の HCl を  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  の NaOH で滴定した場合の、制御信号  $V_c$  および検出信号  $V_d$  の時間変化を示す。指示薬のプロモチモールブルーを NaOH 溶液に添加しており、その塩基性色 (青色) における透過光強度をモニターしている。検出信号の微分曲線  $dV_d/dt$  も表示している (この値の絶対値が極大となる  $V_d$  を予備実験で求め、それを  $V_{sp}$  に設定している)。Figure 2 に示した原理図と同様の信号が得られていることがわかる。 $V_d$  が  $V_{sp}$  を通過するたびに当量点が求められる。ここには示していないが、測定中に試料濃度を変化させても、本システムはその変化を追跡することが可能である。本法では、1分間に最大34滴定 (1滴定あたり 1.76秒) という超ハイスループット滴定を実現した。

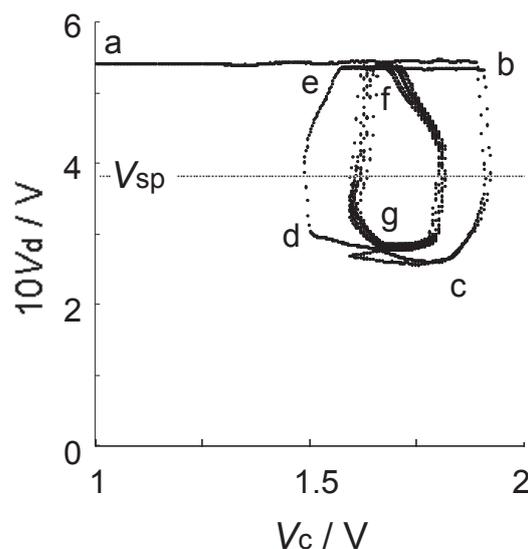


Fig. 5 Typical results for the titration of  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl with  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH; Titration curve. The symbols of a - g correspond to those in Fig. 4.

Figure 5 は、検出信号  $V_d$  を制御信号  $V_c$  に対してプロットした滴定曲線である (横軸は、1~2 V の範囲を拡大して表示している)。図中の a-f は、Fig. 4 のそれぞれの記号に対応している。Figure 3 の C および D に模式的に示したものに似た滴定曲線が得られていることがわかる (外側のループがフィードバック制御、内側のループが固定三角波制御)。本法では当量点を含むごく狭い範囲で  $V_c$  の上昇・下降走査を繰り返すので、このことがハイスループット化につながっていることが、この図からも見ることができている。

本法は、制御信号  $V_c$  と流量  $F_B$  との関係および総流量  $F_T$  が正確に校正でき、かつ反応が化学量論的に進行するならば、原理的には絶対法に属する。しかし、日常分析においてはそのような流量校正は煩雑であり、むしろ既知濃度の目的物質を用いて検量線を作成する方が容易である。酸および塩基の価数をそれぞれ  $n_A$  および  $n_B$ 、 $k$  を比例定数 ( $F_B = kV_c$ ) とすると、次の式 (1) の関係が成立する。

$$n_A C_A (F_T - k V_c) = n_B C_B k V_c \quad (1)$$

式 (1) を整理すると、次の式 (2) が得られる。

$$\frac{1}{V_c} = \frac{k n_B C_B}{n_A C_A F_T} + \frac{k}{F_T} \quad (2)$$

式 (2) より、 $V_c$  の逆数は  $C_A$  の逆数あるいは  $C_B$  に比例することがわかる。この関係をもとに、一方を標準液、他方を試料溶液とすることで、検量線が作成できる。本法を種々の酸あるいは塩基の滴定に応用し、 $r^2 > 0.997$  の直線性が得られた。 $V_c$  の相対標準偏差は 0.5% 未満であった [17]。

## 5. 結語

本稿では、フィードバック制御フローレイシヨメトリーの原理について解説した。丁寧に解説したつもりではあるが、不明な点があればお赦しいただきたい。筆者までお問い合わせいただければ幸いです。

現在、管軸方向の分散を抑制することで流量比をより正確に反映した信号が得られるよう、気節-非相分離検出法 [19] の導入を検討している。気泡由来信号と当量点信号はいずれも大きな傾きを示すので、いかに両者を判別して気泡由来信号を除去するか、気泡由来信号の認識のための閾値の設定など、改良を重ねている。この成果は、近い将来、原著論文として公表したい。

## 6. 謝辞

本稿で紹介した研究は、日本学術振興会 2005-2006 年度科学研究費補助金基盤研究(C) (課題番号 17590033) の補助を得て行われた。フローレイシヨメトリーの研究は、筆者が文部省長期在外研究員として 1999 年 6 月~2000 年 2 月に Texas Tech University (Lubbock, Texas) で行った研究が契

機であり、ご指導いただいた Purnendu K. Dasgupta 先生 (現 University of Texas at Arlington 教授) に深く感謝いたします。

本稿執筆の機会を賜りました *J. Flow Inject. Anal.* 編集委員長の長岡 勉 先生 (大阪府立大) および編集委員の皆様にご礼申し上げます。

## 文献

- [1] F. Szabadvary, 分析化学の歴史, 第 8 章, 内田老鶴圃, 東京, 1988.
- [2] A.U. Ramsing, J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **129**, 1 (1981).
- [3] J. Ruzicka, E.H. Hnasen, フローインジェクション分析法, 化学同人, 京都, 1983, pp. 95-101.
- [4] J.F. van Staden, H. du Plessis, *Anal. Commun.*, **34**, 147 (1977).
- [5] W.J. Blaedel, R.H. Laessig, *Anal. Chem.* **36**, 1617 (1964).
- [6] W.J. Blaedel, R.H. Laessig, *Anal. Chem.* **37**, 332 (1965).
- [7] J. Marcos, A. Rios, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta.*, **261**, 489 and 495 (1992).
- [8] B. Fleet, A.Y.W. Ho, *Anal. Chem.*, **46**, 9 (1974).
- [9] G. Nagy, K. Tóth, E. Pungor, *Anal. Chem.*, **47**, 1460 (1975).
- [10] G. Nagy, Z.S. Fehér, K. Tóth, E. Pungor, *Anal. Chim. Acta.*, **91**, 87 and 97 (1977).
- [11] U. Spohn, G. Nagy, E. Pongor, *Anal. Sci.*, **2**, 423 and 431 (1986).
- [12] A.D. Dakashev, V.T. Dimitrova, *Analyst*, **119**, 1835 (1994).
- [13] 田中秀治, 中野恵文, *J. Flow Inject. Anal.*, **21**, 123 (2004).
- [14] H. Tanaka, P.K. Dasgupta, J. Huang, *Anal. Chem.*, **72**, 4713 (2000).
- [15] P.K. Dasgupta, H. Tanaka, K.D. Jo, *Anal. Chim. Acta*, **435**, 289 (2001).
- [16] H. Tanaka, T. Baba, *Talanta*, **67**, 848 (2005).
- [17] H. Tanaka, T. Baba, *Anal. Sci.*, **21**, 615 (2005).
- [18] T. Aydan, M. Takeuchi, H. Tanaka, *J. Flow Inject. Anal.*, **26**, 133 (2009).
- [19] T. Ogusu, K. Uchimoto, M. Takeuchi, H. Tanaka, *Talanta*, **118**, 123 (2014).

(付記) 本稿は、日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議 編、「薬学分析化学の最前線」, じほう, 東京, 2009, pp. 106-107, 田中秀治, 竹内政樹, 「流れ系を利用した超ハイスループット滴定」の記述に大幅な加筆を行ったものである。