フローインジェクション分析法を考える

岡山大学名誉教授
桐榮　恭二

１．はじめに

フローインジェクション分析法(FIA)を始めてみて，テフロンチューブを切ったり，つないだりしながら，その系で最も良い条件の長さを決めるのは，それまでにない楽しさがあった。それまで筆者は新しい有機試薬の合成を考えてきた。反応条件をどうすれば良いか，出来た試料の精製はこうすれば良いだろうと考えながら行う実験もこれまた楽しいものであった。しかし考えてみるとその新しい試薬を使っての実際の分析実験は，すっかり既製の分光光度計に頼っていて，分光光度計の内容に深く立ち入って考えてみようとはしなかった。それは，各メーカーが優秀なものを作り，市場に供給していたからである。そして筆者自身が，光学系，電気系，機械系はまったく弱くて，立ち入る余地が全くないと考えていたからである。

FIAは送液ポンプ，試料注入器，フローセル，分光光度計，記録計などがひとつの流れを中心に有機的に機能してはじめて成立する分析法である。幸いなことに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が発達していて，その部品を利用できることは大変便利であった。

FIAもHPLCも流れを利用する分析法である。しかし，その目的とするところは全く異なる。FIAは多成分均一系の中の一成分のみを高感度に分析することを目的としている。HPLCは多成分均一系の中の多成分を分離分析することを目的としている。従って，フローセルにしても，FIAではかなりな容量があっても差し支えない。しかしHPLCではカラムから出てくるところはできるだけ容量が小さいことが望まれるし，フローセルも出来るだけ小容量が望ましい。HPLCのポンプはかなりの高圧を必要とする。しかし，FIAの場合それほど高圧を要しない。ただし，脈流のできるだけ少ないポンプが望ましい。

このように考えてくると，FIAに最も適したフローセルはどのようなものでなければならないかが浮かび上がってくる。また，送液ポンプの持つ条件も決まってくる。どのメーカーのものがＦＩＡに適しているか。分光光度計も，どのようなものが良いか。試料注入器，チューブ，連結器，混合ジョイント，反応コイル，背圧コイルなどの条件も考えてみようということから，学生諸君とともに，筆者も実際に手足を動かしながら，このFIAに取り組むこととなった。そして，これまでにたくさんの知見が得られたので，以下にその一端をご紹介しながら，将来の可能性と期待について筆者の考えを述べたいと思う。

２．フローインジェクション分析法の原理と特徴

フローインジェクション分析法(Flow Injection Analysis, FIA)は，化学分析における自動化を推進する手段として，きわめて有力である。この方法では，通常，内径0.5~1.0mm程度の樹脂製細管（例えばテフロンチューブ）の中を流れている試薬溶液に分析試料を注入し，細管内を流れている間に試薬と混合，反応し，下流に配した検出器で分析目的とする化学種またはその誘導体を検出，測定し定量するものである。従って，送液ポンプ，試料注入器，反応コイル，検出器など主要なパーツを連結すればFIAの装置の組み立てが自作でも簡単にできる。そして，これにより現在用いられているほとんどの化学分析はFIAに応用でき，自動化が可能となる。

このFIAの特徴・利点として次のような点を挙げることが出来る。

（1）迅速な測定：1時間あたり100～200試料の分析が可能という例も報告されているが，通常，1時間あたり30～60試料の分析速度がもっとも採用されている。

（2）簡単な操作：試料を注入するだけの簡単な操作で質の高い分析が可能である。熟練を要さず，初心者でも簡単に扱うことが出来る。

（3）試料・試薬の少量化：通常，FIAでは試料は100μl程度で充分である。また，試薬も1回の測定に換算すると1ml程度と手分析法の1/10～1/100の量である。従って廃液量も少なくて済み，環境への負荷も大幅に軽減でき，ゼロエミッションの観点からも好ましい分析方法として評価される。

（4）高感度・高精度：FIAでは高性能な送液ポンプを使うことにより，精密に制御された反応場を創り出すことが可能で，分析の高感度化，高精度化を達成することが出来る。

３．FIAの構成要素の現状と将来

３．１　流路

FIAでは内径0.5mm，外径1.5mmのテフロンチューブが多く使われている。諸外国ではこのテフロンチューブに試薬溶液をペリスタ型ポンプで流し，試料注入バルブから試料溶液を注入する方法を採用している。いま，100μlの試料を注入したとする。内径0.5mmのテフロンチューブの中では50cmを占める。すなわち試薬と試薬の流れの間に試料溶液が50cm挟み込まれた状態で流れる（図１）。試料はその先端と後端とでのみ試薬との混合が起こり，反応が始まる。この時，図のような栓流のまま流れるのではない。流れはチューブの中央では速やかに，管壁付近では徐々に流れ混合が起こる。100cm程度の反応チューブでは試薬と試料とが完全に混合することは出来ない。

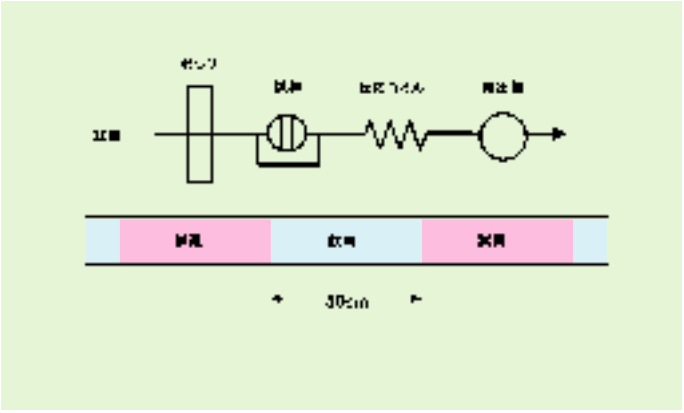

図１　一流路系FIAにおける細管内反応の構成図

細い内径0.5mmのテフロンチューブの中で，いかに速やかに試薬と試料とを混合するかが最大の問題となる。これを解決した一つの方法としてサンドウィッチ法がある（図２）。これは，例えば，１６方バルブを用いて，試薬を試料と試料の間に少量ずつ挟み込み（場合によっては試料を試薬と試薬の間に挟み込む），キャリヤー溶液で流して速やかに反応を起こさせたのである。

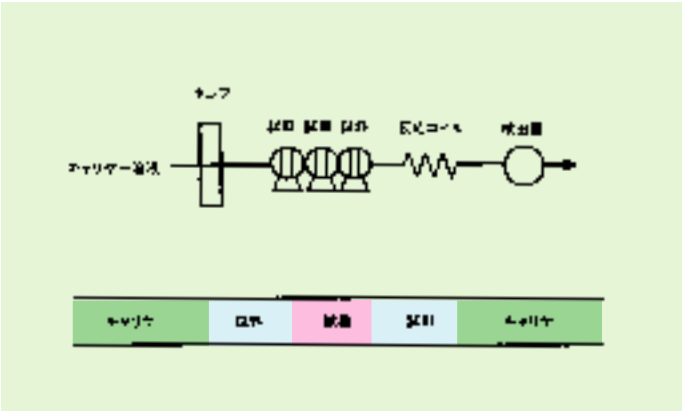

図２　サンドウィッチ方式における細管内反応の構成図

筆者は二流路方式を採用した。すなわち，試薬溶液とキャリヤー溶液(多くは蒸留水)を無脈流ダブルプランジャーマイクロポンプ(後述)を使って別々に流した。このポンプから両液が交互に4.9μlずつ吐出される。Y字ジョイントで両液を合流させた。キャリヤー溶液に試料溶液を注入バルブを使って注入した。Y字ジョイントから出てくる液は試薬溶液と試料溶液とが交互にテフロンチューブの2.5cmずつを占める。20cmも流れるうちに，両液は完全に混合する(図３)。この二流路方式による反応チューブの長さは，一流路方式の反応チューブよりも大幅に短くすることができ，両液は完全に混合した。

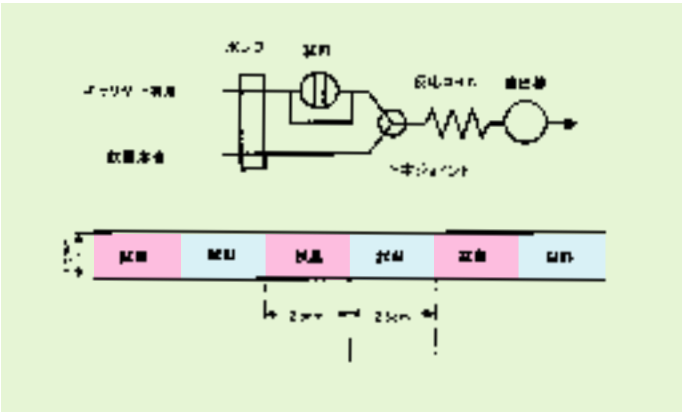

図３　二流路系細管内反応の構成図

３．２　ポンプ

ポンプはFIAの心臓部を成し，最も重要な構成要素である。筆者もこのポンプの選択と開発には特に力を注ぎ，何台ものポンプを試作してきた。この考え方は，今も変わることなく，新しいポンプの出現を願っているところである。

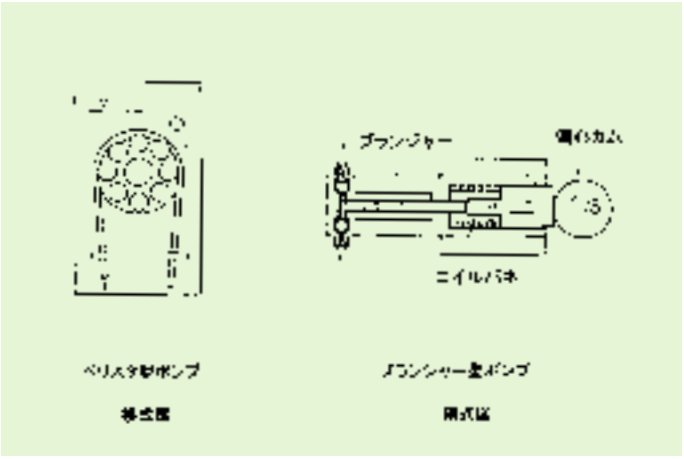

図４　ポンプの構成図

ペリスタ型ポンプはタイゴンチューブをローラーでしごくことにより送液を行うものである（図４）。しかし，長く使っているとタイゴンチューブはヘビの抜け殻のようになってしまい，送液の安定性，耐久性に欠けるという最大の欠点を持っている。諸外国ではほとんどがペリスタ型ポンプを使っているのに，筆者はあえてHPLCに利用されているダブルプランジャーポンプを使うことにした。このプランジャーポンプは偏心円盤の回転につれて，その外縁でプランジャーを押し出し，バネによって回転につれてプランジャーを元の位置に戻すことを繰り返すようになっている（図４）。このポンプでは，流量は極めて正確であるが，液の流れは完全に脈流である。そこで，この脈流を均一な流れにするために，ポンプの吐出口にそれぞれ20mものダンパーチューブをつける必要があった。これも不便である。そのとき，いろんな分野の研究者の方々と話しをして情報を仕入れ，また，いろいろ装置を見て回り，その中に組み込まれているポンプを調査していく中で，無脈流ダブルプランジャーマイクロポンプの存在を知った。そのポンプのプランジャー径は2.5mmであり，往復運動のストロークは1mmである。この時プランジャーは2本あって，片方が吐出しているときは他方が吸引する仕組みになっている。さらにこのポンプによる1ストロークあたりの吐出量は4.9μlと非常に微少量であることから，無脈流を達成することが出来る。4.9μlの液は交互に，極めて正確に内径0.5mmのテフロンチューブに注入される。内径0.5mmのテフロンチューブの中ではそれぞれ2.5cmを占め，この両液は20cmも進むうちに完全に混合する。このポンプは，筆者の構想するFIA用ポンプとして完全に適合した。そして筆者は我が国の多くのFIA研究者たちにこのポンプを奨めた。我が国においてはこの方式によるFIAの研究が多いことは大変うれしく思っている。しかし，残念ながらこのポンプは重量が重過ぎる。もっと軽くすべきである。改良されることを期待する。

このプランジャーポンプの特徴は回転運動をプランジャーの往復運動に変換することである。回転運動を経ないで直接往復運動によるポンプはないものであろうか。そのほうが機構が簡単となって小型化が容易となり，価格も低く押さえられるのではないか。そのような考え方から市場を調査してみると，ある会社で磁場の切り替えを利用する，超磁歪ポンプ(450g)があり，これを2個買い求めた。通常のポンプの1/10程度の低価格であった。これを連続運転させたところ，ポンプ自体の発熱のため，使用をあきらめざるをえなかった。しかしこの型式のポンプは改良すればFIAポンプとして役立つものとして大いに期待している。

３．３　接続

内径0.5mm，外径1.5mmのテフロンチューブをポンプ，インジェクター，フローセルなどに接続するには，従来，袋ナットが一般的に用いられてきた。そのためにはテフロンチューブの穴を先の尖った電気コテで広げる必要があった(フレアー型，図５)。このほかにもフランジ方式などあるが，いずれもテフロンチューブに加工を施す必要があり，誰でも簡単に実験が始められるというわけにはいかなかった(図５)。

現在では，フェラルと一体となった押しネジで，その中央に外径1.5mmのテフロンチューブが丁度通る穴のあいたPEEK製のものが販売されるようになった。これに内径0.5mm，外径1.5mmのテフロンチューブを通し，各接続部品にねじ込むことによって，簡単に部品との間を連結することが出来るようになった。このような小さな部品の改良もFIAの進歩，発展には欠くことの出来ない重要なことである。

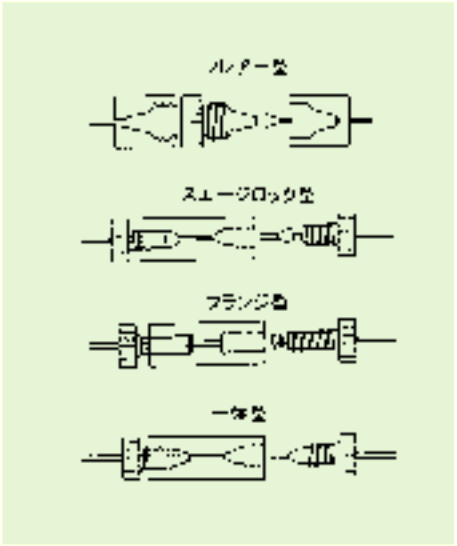

図５　接続方式

３．４　検出器

FIAにおける検出では，原子吸光光度法，ICP法など最新の分析機器との接続も積極的に研究が進んでいるが，やはり吸光光度法が主流を占めているのが現状である。吸光光度検出器としてはHPLCの検出器をそのまま用いたものが多い。フローセルの光路を長くすることによってランベルトの法則により高感度分析が期待できる。

筆者は内径1.5mm，長さ10mm，20mm，50mmおよび100mmのテフロン製のフローセルを自作した。その内容積はそれぞれ18μl，35μl，88μl，および177μlである。10^{-5}Mピクリン酸を流し，400nmにおける吸光度を測ったところ，長さ10mmのセルの吸光度を基準にすると，それぞれ長さ20mmでは2倍，長さ50mmでは5倍，長さ100mmでは10倍となった。すなわち，フローセルの長さを長くすることによって高感度分析が可能となることを理論だけでなく，実際に示すことができた。

FIAでは試料溶液の注入量は100μl程度が多く用いられているので，試薬溶液との混合を考えると，長さ100mm程度までのフローセルは十分利用できると思われる。

筆者はこれに限らず，フローセルの材質にチタンを求め，内径0.5mmの穴をあけ，長さ10mmのフローセルとの比較を行うなど多くのフローセルを自分の手で細工して実験に用いてきた。これらの経験はFIAのハードを考える上において大いに役立っている。

３．５　発光ダイオード（LED）

FIAの検出器としては多く分光光度計が用いられている。研究用としてはいろいろの波長で検討する必要があるので，それは必要である。その場合，光源としてタングステンランプ，重水素ランプやハロゲンランプなどを用い，回折格子や干渉フィルターで分光して，目的とする波長を取り出し，測定に利用している。従ってまずこれらの光源を点灯させる電源が当然必要となるし，各々ランプ自体は大きく，しかも発熱を伴う。また分光するための空間も必要となる場合もあり，検出器としては大型で高価なものとなる。しかしFIAの利用法としては，リン酸分析計とか窒素酸化物分析計とかのように分析対象を限定して使用する場合が多く，その際は使用する波長が決まってしまう。このような場合，目的に合った波長だけが要求される。ここでLED（発光ダイオード）が登場する。LEDは特定の波長の光を発し，主に信号機や電光掲示板に使用されている豆ランプのことである。筆者はこのうちまず，青および緑のLEDをFIAの光源とすることから実験をはじめた。LEDを使用する大きな利点は，まず熱が出ないことと消費電力がわずかであるので，電源ユニットを特別に必要としないこと，さらに大きさはわずか3mm程度であるので，フローセルの直前に取り付けて，フローセルの直後には受光部を置けば，手のひらにのる程度の極めて小型の検出器となる。筆者は実際にこのLEDを検出器を組み込んだFIA装置を試作して，有用性を確かめることができた。

３．６　溶媒脱気装置

ダブルプランジャーポンプはその機構上，気泡が入ると液が流れなくなることがある。したがって，ポンプが液を吸引する手前にエアートラップを取り付けると良い。また，エアートラップだけでは不充分なことが，特に無人連続運転を必要とするモニターとして利用するような場合にある。送液がストップしてしまうことでFIAが機能しなくなり，情報のフィードバックが間に合わず重大な事態を招くことを避けなければならない。そのために，溶媒脱気装置が利用されている。主に，真空チャンバー方式が用いられている。比較的小型で安価なものが市販されるようになったが，FIAの場合は，HPLCのような精密なグラジエントは行わないので，必要最小限の脱気で充分であることを考慮して，筆者はその点をさらに追求して，安価で小型な装置の出現を期待している。

３．７　記録計

FIAの検出器における出力の変化を記録する必要がある。吸光光度法の場合は吸光度変化を電圧変化として記録紙上に記録する。通常ペンレコーダーやHPLCで用いられるインテグレータなどが利用され，ピーク高さ，面積を計測して試料濃度を定量する。HPLCの分野ではコンピュータによるデータ処理が急速に進歩しているが，FIAの分野では匹敵する程のデータ処理機能を持つものがない。総合的な分析の省力化，自動化という観点から見れば，この分野の進展が不可欠であるが，今日の情報処理技術からすれば，必ずや達成できるものと確信している。

３．８　オートサンプラー

数多くの試料の分析のためには，オートサンプラーを接続して試料をFIAに自動的に注入すると良い。HPLCの分野では，多機能型のものまで比較的そろっているが，試料の注入間隔が最小

でも3分程度で，FIAの利点である迅速な測定を有功に利用できる機能は備わっていない。FIAでは少なくとも1分間隔での注入が出来ることが望ましい。最近では，ＦＩＡメーカーの努力によりこの条件を満足するオートサンプラーが市販されるようになった。ポンプ，検出器などのシステム全体が小型化の方向に進んでいる中，今後はオートサンプラー本体の小型化が要求されるのは必至で，より良いものを創り出そうという要求は尽きることがなく，一歩でも前進した形のオートサンプラーが出現するものと期待している。

４． FIAにおける恒温の重要性

ＦＩＡの高感度化，高精度化を達成するのに不可欠な条件として前述の無脈流高性能ポンプによる送液と，“ＦＩＡシステムを恒温に保つ”という2つの重要な点を挙げることが出来る。前者については既述したのでここでの重複は避ける。通常のバッチ式用手法では，「すべての反応が完全に平衡状態に達した状態(定常状態)」での測定を前提としているのに対し，FIAでは「定常状態に移行しつつある過渡的状態」を利用している。従って，反応速度に影響を及ぼす因子は常に制御された状態になければ正確な測定は行えない。その最大の因子が温度である。筆者は，「*o*-フェナントロリンによる鉄(II)の定量」という学生実験でも行われる反応系をモデルとして，高感度化を追求していく上で「温度コントロール」すなわち「恒温」がいかに重要であるかを証明する実験を行い，その装置を自作した(図6)。実験ではまず，60×60×30cmの木箱を作りこの中にポンプ，検出器をセットした。検出器に内蔵されているタングステンランプやポンプの運転による発熱は恒温を乱す。そこで木箱の中を冷却することとした。実際には，オートバイのラジエターを買い求め，これを利用して25℃より低い温度の水を外部で作り，循環させて，複数のファンにより木箱内の空気をまんべんなく攪拌して，装置内の温度を25.0℃に保つことに成功した。

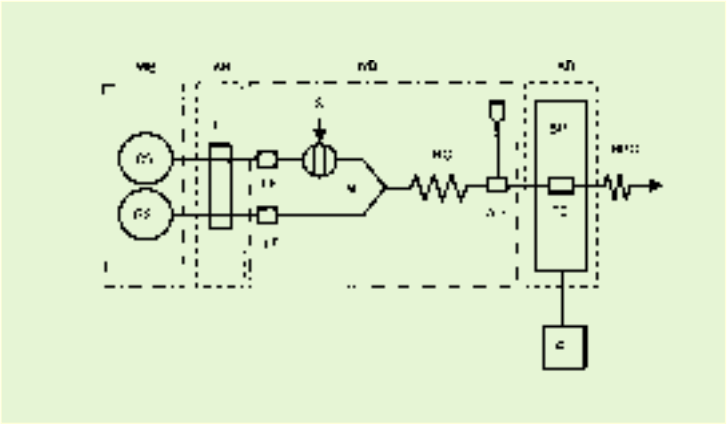

図６　高感度FIAシステム

CS：**キャリヤー溶液**，RS：**試薬溶液**，P：**ダブルプランジャーポンプ**，
LF：**ラインフィルター**，S：**サンプルインジェクター**，M：**ミキシングジョイント**，
RC：**反応コイル**，AD：**エアダンパー**，FC：**フローセル**，SP：**分光光度計**，
R：**記録計**，BPC：**背圧コイル**(0.25mmi.d.)，WB：**水浴(25.0℃)**，
AB：**空気恒温槽(25.0℃)**

当然，流す溶液類，インジェクター，反応コイルなどはすべて25.0℃の恒温水槽につけてコントロールした。高感度化のためにはこのほかにもこれまでの経験から得たさまざまなノウハウを駆使してシステムを構築した(詳細は紙面の都合上省略する)。この結果，ppbレベルの鉄の定量が可能となった(図７)。新しい分析試薬を設計，合成し，高感度化を達成する楽しみも充分味わってきたが，ごく一般的に利用されている試薬を用いてもppbレベルの検出を可能にするFIAも実にすばらしい分析法であることを実感した。しかも，それは「恒温」を実現することによって達成できたことである。

この木箱による恒温型FIA装置(仮称)を第1号機として，次に検出器を分解して，タングステンランプと電源部分を箱の外に取り外し，電子クーラーとヒーター併用型空気恒温槽内にポンプと検出器の残りの部分をセットした第2号機，発熱の原因となる光源を前述のLEDに代え，電気系と反応系をべつべつの部屋に分けて恒温精度を上げると同時に装置を簡略化した3号機へと改良を続けて現在に至っている。

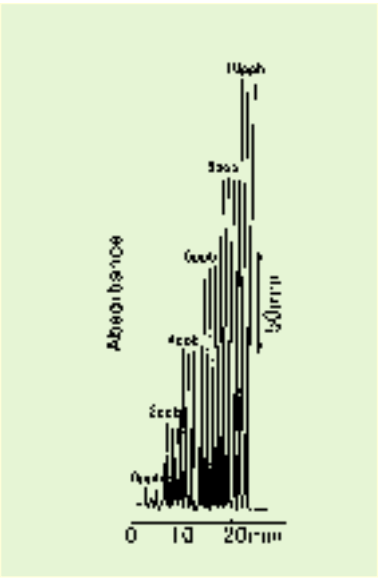

図７　1,10-フェナントロリンによるFe(II)の定量
検量線用シグナル

５．おわりに

このように，筆者は新しいFIA装置を製作し，各種部品の特徴を見極めるとともにさらに改良を加えて，より高感度で，機能的なFIA装置の実現を目指している。筆者が教鞭を執った岡山大学理学部分析化学研究室では長い間の習慣として，朝の始業前の30分間に，全員が集まる本読みが行われている。FIAの創始者RuzickaとHansen両氏の著書“Flow Injection Analysis”の訳本(九州大学石橋信彦氏, 与座範政氏訳)を読んだのが1983年4月であり, 我々は大いに啓発された。本年, 日本分析化学会フローインジェクション分析研究懇談会が発足して15周年目を迎えることとなった。聞き及ぶところによると，ISOなど公定法へのFIAの規格化もまもなくとのこと，今後FIAがますます発展し，更に広く一般に普及することを心から願っている。