

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550101

研究課題名(和文) 気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of air segmented - amplitude modulated multiplexed flow analysis with no phase separation

研究代表者

田中 秀治 (TANAKA, Hideji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40207121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が開発した振幅変調多重化フロー分析法の感度向上のため、液流を気泡によって分節することで分散を抑制し、相分離を行わず信号処理によって気泡由来信号を除去する「気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法」を開発した。基本的分析条件の検討ののち、2試料中のリン酸イオンあるいはアンモニウムイオンの定量へと応用し、その実用性を示した。さらに媒質の物性変化(界面活性剤の濃度変化)を利用した振幅変調フロー分析法、内標準法を導入した振幅変調多重化フロー分析法も検討した。本分析法は、周波数解析の概念をフロー分析法に導入したもので、学術的にも独創性の高いものであると考える。

研究成果の概要(英文)：We have developed “air segmented - amplitude modulated multiplexed flow analysis (AMMFA) with no phase separation”. In this approach, liquid stream is segmented by air bubbles in order to limit the axial dispersion within each liquid segment, and thus to improve the sensitivity. Air bubbles are not physically removed. Instead, air signals are removed by signal processing with an in-house program. The developed system has been applied to the simultaneous determination of phosphate or ammonium ion in two samples. We have also studied on AMMFA utilizing periodically varying surfactant concentration in the media, and the introduction of internal standard method to AMMFA. The combination of flow analysis and frequency analysis is a unique feature of the proposed study.

研究分野：分析化学

キーワード：フロー分析 振幅変調 多重化 フーリエ変換 気節 自動分析 同時分析

1. 研究開始当初の背景

細管内の流体の流れを利用するフロー分析法は、高精度、高効率、経済性などの優れた長所により、環境分析や臨床分析などの分野で発展を遂げてきた。現在では、年間数百報にも達する関連論文が公表されている。しかし、学問としては成熟の域に近づいており、フロー分析研究の更なる発展のためには、斬新な発想を導入する必要がある。

研究代表者は通信工学的な概念を導入した振幅変調多重化フロー分析法 (AMMFA) を考案し、2008 年に分析化学誌 *Talanta* に発表した。AMMFA では、複数の試料 (あるいは試料と試薬) の流量を周波数の異なる交流波形制御信号によってそれぞれ変動する。これらの液が合流することで、振幅変調された各液の情報が多重化される。下流で得られる検出信号を高速フーリエ変換 (FFT) し、各周波数成分の振幅を求め、この振幅の大きさより多試料同時分析を行う。同法をリン酸イオンの定量や、 Fe^{2+} と Fe^{3+} の同時定量、 Cl^- の定量などに応用した。

AMMFA の課題は、液が下流に向かう過程で試料の分散が起こり、振幅の減衰、すなわち感度の低下を招くことである。そこで、液流に気泡を導入し、気泡で挟まれた液節内に分散を制限する気節-振幅変調多重化フロー分析法を考案した。しかし、気泡をそのまま検出器に導くと気泡由来の信号が FFT の支障となるため、検出器直前で多孔質膜を用いて脱気する必要があった。このため、脱気後、液が検出器のフローセルに達するまでの間に少なからぬ分散が起こり、感度は期待していたほど高くはならなかった。

2. 研究の目的

本研究では、気泡も直接に検出器へと導き、プログラム処理で気泡由来信号を除去する気節-非相分離 AMMFA を開発する。この目的のために、多流路でも精度の高い送液と気泡導入ができるシステムの構築と、検出信号の形状もとに気泡信号を判別し除去するプログラムを開発する。各種水質試験法による実試料の分析へと応用し、気節-非相分離 AMMFA の実用性を示す。

3. 研究の方法

構築した気節-非相分離振幅変調多重化フロー分析システムを図 1 に示す。総流量一定のもと、関数発生器 SG から供給される周波数の異なる交流波形制御信号 V_{c1} および V_{c2} を用いて、2 試料 (S_1, S_2) の流量を変動させる。両試料は、一定流量で送液される試薬 R、および総流量と (試料 + 試薬) 流量との差に相当する流量で受動的に吸引される水 (希釈液) と合流する。第 5 の流路から空気 Air を導入し、合流した液流を気泡によって分節する。反応コイル RC を経て、気液両相を相分離せずに検出器 D へと導き測定する。検出信号 V_d を V_{c1} や V_{c2} とともにアナログ-デジタル変

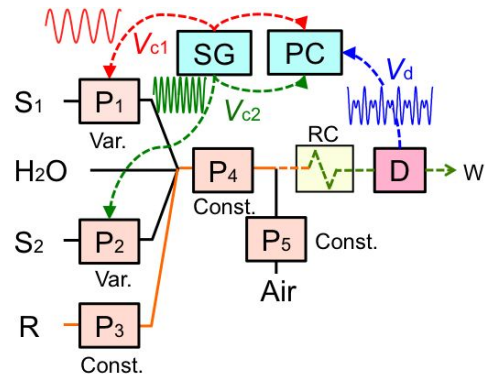


図 1 気節-非相分離振幅変調多重化フロー分析法

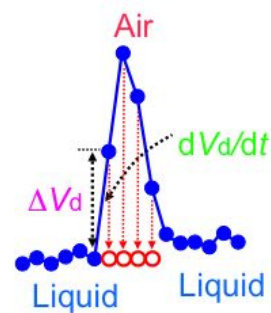


図 2 信号処理による気泡信号除去

換器を介してコンピュータ PC に取得し、記録する。

図 2 に信号処理による気泡信号の除去の原理を示す。気泡信号の判別のために、 V_d の傾き dV_d/dt および液相信号レベルからの変位 ΔV_d に関して閾値を設定する。新たに取得した V_d がいずれかの閾値を超えたとき、これを気泡由来信号と判定し、除去する。この場合、直近の液相信号をその時刻の V_d として維持する。さらに、移動平均処理によって平滑化を行う。こうして得られた液相信号を FFT によって解析し、 S_1 および S_2 に相当する周波数成分の振幅をそれぞれ求める。この振幅の値から、目的成分を定量する。測定しながらリアルタイムで定量が行えるよう、一定数のデータが得られるたびに解析窓を移動させつつ、FFT 計算を行う。

まず、以上の過程を完全自動で行うため、オリジナルのプログラムを作成した。試料として希釈過程のみで振幅変調が実現できる色素 (メチルオレンジ) 水溶液を用いてシステムおよびプログラムの検証を行った。この場合、図 1 の R の流路を閉じた。その成果を、マラカイトグリーン法によるリン酸イオン定量、インドフェノールブルー法によるアンモニウムイオンの定量にそれぞれ応用した。

AMMFA の長所は比較的単純なシステムで多試料同時分析が行える点にある。しかし、複数の試料と試薬を 1 流路に導くため、各試料については希釈率が高くなり、感度や検出

限界の点では単一試料の分析に劣ることは避けられない。そこで、流路中に電解過程を導入し、目的成分の電解濃縮と溶出（ストリップング）を周期的に行うことにより感度上昇をはかる方法を検討した。

媒質物性の周期的変動を利用した AMMFA についても検討した。陽イオン性色素のクリスタルバイオレット CV を目的物質とし、媒質中の硫酸ドデシルナトリウム SDS の濃度を臨界ミセル濃度 (cmc) 以上と以下に周期的に変動させることで、ミセル濃縮による感度上昇をはかった。

通常のフロー分析法と同様、AMMFA においてもポンプの送液流量のゆらぎは誤差の原因となる。長時間の工程管理や環境モニタリングにおいては、定期的に測定を中断し、流量校正あるいは検量線作成が必要となる。この頻度を低減するために、内標準法を導入した AMMFA を検討した。Fe²⁺およびメチレンブルーをそれぞれ目的物質および内標準物質として選択し、*o*-フェナントロリン吸光度法による呈色反応へと応用した。二波長 UV/Vis 検出器を用いて目的物質および内標準物質の極大吸収波長における吸光度を測定し、両者の振幅の比をもとに定量を行った。

4. 研究成果

(1) 気節-非相分離振幅変調多重化フロー分析法によるリン酸イオンの定量

図 1 に示したシステムを構築した。まず、メチルオレンジ水溶液を用いて信号処理による気相由来信号の認識と除去および平滑化に関する基礎的検討を行った。これを、マラカイトグリーン吸光度法による 2 試料中のリン酸イオンの同時定量へと応用した。最適化したシステムで得られた検出信号の一例を図 3 に示す。ここでは S₁ および S₂ (ともに 11.62 μM PO₄³⁻) の流量をそれぞれ 30 s および 20 s で変動している。気泡信号認識のための閾値は $dV_a/dt = 0.45 \text{ V s}^{-1}$, $\Delta V_a = 0.35 \text{ V}$ にそれぞれ設定した。赤色は生信号、青色は信号処理によって脱気した信号、緑色はさらに 31 点移動平均処理を行った平滑化信号を示す。開発したプログラムは、良好に気泡

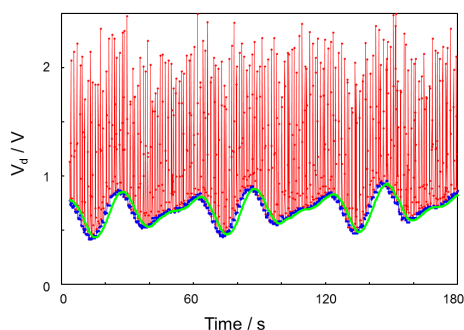


図 3 シグナル例 (リン酸イオンの定量)

由来信号を認識し除去していることがわかる。検量線 (0.0–31.0 μM) の直線性は良好であり ($r^2 > 0.999$), 30 s の制御周期のもとでは 0.52 μM の検出限界 (3.3σ) が得られた。本法を河川水、堀水、灌漑用水、池水を用いた添加回収試験に応用し、100%前後の良好な回収率を得た。

(2) 気節-振幅変調多重化フロー分析法による 1 試料中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの同時定量

気節-振幅変調多重化フロー分析法をナフトルエチレンジアミン吸光度法による硝酸イオン・亜硝酸イオンの同時定量 (前者は Cu-Cd カラムで亜硝酸イオンへと還元) へと応用した。その結果、気節を導入しない従来型の振幅変調多重化フロー分析法に比べて 1.5 倍程度 (制御周期等に依存する) の感度を得ることができた。本研究成果を発表した吉田悠 (研究協力者) は、2013 年 11 月 8 日に熊本大学にて開催された第 51 回フローインジェクション分析講演会において若手優秀ポスター賞を受賞した。(本テーマは 2009–2011 年度基盤研究(C) (21550083) の最終年度終盤から継続したものである。)

(3) 気節-非相分離振幅変調多重化フロー分析法によるアンモニウムイオンの定量

気節-非相分離 AMMFA をインドフェノールブルー法による 2 試料中のアンモニウムイオンの同時定量へと応用した。気節-非相分離法 (信号処理による気泡信号除去) の導入により、気節を導入しない AMMFA に比べ、感度は最大 5.8 倍に増大し、より低い検出限界 ($< 0.11 \text{ mg dm}^{-3} \text{ as N}$ (3.3σ)) が得られた。実試料への応用においても良好な結果が得られた。本研究成果を発表した戌亥孝次 (研究協力者) は 2012 年 9 月に金沢大学で開催された日本分析化学会第 61 年会において若手講演ポスター賞を受賞した。研究成果を原著論文にまとめ、*J. Flow Inject. Anal.* 誌に投稿中である (本報告書執筆時点において、掲載決定には至っていない)。

(4) 周期的な電解濃縮/溶出を利用した振幅変調フロー分析法

モリブドリン酸-マラカイトグリーンイオン対、メチルオレンジなどを目的物質として基礎的検討を行ったが、学会発表さらには論文公表に堪えうる良好なデータを得ることができなかった。このテーマの見極めが遅れ、時間を費やしたことは反省材料である。

(5) 媒質物性の周期的変動を利用した振幅変調フロー分析法

フローシステムを図 4 に示す。矩形波制御信号 V_e を用いて 5 mM の SDS 水溶液を断続的に送液した。試料として 5 μM の CV 水溶液を用いて基礎的検討を行った。SDS の cmc を低下させるための共存 NaCl 濃度、 V_e の

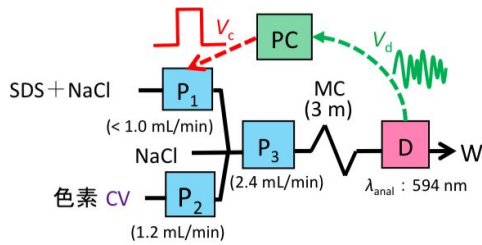


図 4 ミセル濃縮を利用した振幅変調フロー分析法

Duty 比 (矩形波のパルス幅 / 周期), 混合コイル MC の長さについて最適化を行い, それぞれ 0.2 M, 25%, 3 m に決定した。得られた検出信号 V_d は周期的な変動を示し, その極大値は SDS を導入しない場合 (P_1 流路からは水を送液) に比べ, 最高で約 4 倍に達した。従来法 (変調をかけない連続フロー分析法) と比較すると, 本法は直線性および検出限界のいずれにおいても優れていた。

(6) 内標準法を導入した振幅変調多重化フロー分析法

長時間測定における頑健性 (特にポンプの送液流量のゆらぎにに対して) および校正頻度の低減をめざして, AMMFA に内標準法を導入した。 α -フェナントロリン吸光度法による Fe^{2+} の定量に応用することで, その有効性を検討した。フローシステムを図 5 に示す。目的物質 A (Fe^{2+}) と内標準物質 IS (干渉を起こさない物質として $10 \mu\text{M}$ メチレンブルー (MB) を選択) を含む試料溶液 S_1 および S_2 を, 周期の異なる交流波形制御信号 V_{c1} および V_{c2} によってそれぞれ流量変動させつつ送液した。呈色試薬 R (α -フェナントロリン水溶液, $\text{pH} = 4.6$) と混合・反応後, 二波長 UV/Vis 検出器 D に導き, 目的物質および内標準物質に対する検出信号 $V_{d,A}$ および $V_{d,IS}$ をそれぞれ測定した。これらをコンピュータ PC に取得し, FFT によって各検出信号に含まれる各周波数成分の振幅 (Amp) をそれぞれ求めた。図 6 に検出信号の一例を示す (Fe^{2+} 濃度: 0.1 mM (緑色), MB 濃度: 0.01 mM (青色), 制御周期: $V_{c1}, 30 \text{ s}$; $V_{c2}, 20 \text{ s}$)。いずれの試料についても, 内標準法による検量線 ($\text{Amp}_{\text{Fe}^{2+}} / \text{Amp}_{\text{MB}}$ を Fe^{2+} 濃度に対してプロット) は, 絶対検量線法による検量線 ($\text{Amp}_{\text{Fe}^{2+}}$ を Fe^{2+} 濃度に対してプロット) よりも直線性および検出限界とも優れていた (例: S_1 に対する検出限界: $5.62 \mu\text{M}$ (3.3σ))。絶対検量線法とは異なり, 内標準法では制御周期に依存しない検量線が得られた。ポンプ P_1 の流量を意図的に $\pm 5\%$ の範囲で変動させても, 内標準法では一定の測定値を得ることができた。本研究結果を発表した尾崎真理 (研究協力者) は 2015 年 5 月に山梨大学で開催された第 75 回分析化学討論会において若手講演ポスター賞を受賞した。

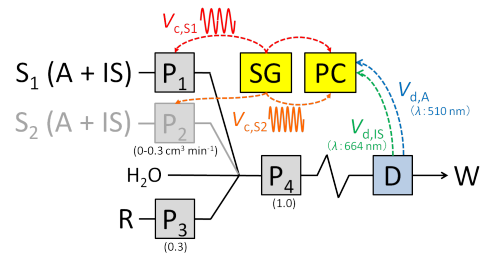


図 5 内標準-AMMFA

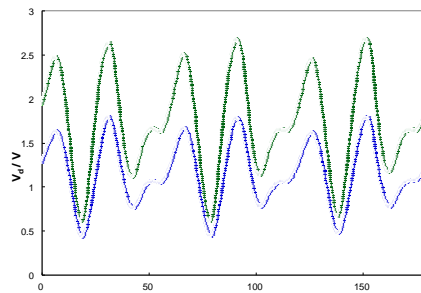


図 6 内標準-AMMFA の検出信号

振幅変調多重化フロー分析法 (AMMFA) およびこれを発展させた気節-非相分離 AMMFA は, 研究代表者が開発したオリジナルの分析法である。周波数解析を導入した他に例の見られないユニークな分析法である。本研究では, 気節法を導入することで, 管内での分散による振幅の減衰が抑制され, 感度を向上させることができた。相分離を行わず, 検出信号の信号処理によって気泡由来信号を除去・平滑化するプログラムを開発した。リン酸イオンやアンモニウムイオンの吸光度定量へと応用し, 本法の実用性を明らかにした。さらに, 流量のゆらぎにに対して頑健性を有する内標準-AMMFA を提案した。これら一連の成果は, オリジナルな分析原理の探究という点でも, 学術的意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Takeshi Ogusu, Katsuya Uchimoto, Masaki Takeuchi, Hideji Tanaka, "Air segmented - amplitude modulated multiplexed flow analysis with software-based phase recognition. Determination of phosphate ion", *Talanta*, 査読有, **118**, 123-128 (2014). (DOI: 10.1016/j.talanta.2013.10.001).

Haruka Yoshida, Koji Inui, Masaki

Takeuchi, Hideji Tanaka, "Simultaneous determination of nitrite and nitrate ions by air-segmented Analysis," *Anal. Sci.*, 査読有, **28**, 523-525 (2012). (DOI: 10.2116/analsci.28.523).

[学会発表](計12件)

Hideji Tanaka, Flow analyses utilizing periodically varying flow rate; feedback-based flow ratiometry and amplitude modulated multiplexed flow analysis, 2015年12月15日(発表予定), The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (招待講演), Marriott Waikiki Beach (Honolulu, Hawaii, USA).

尾崎真理, 内標準法を導入した振幅変調多重化フロー分析法, 2015年5月23日, 第75回分析化学討論会, 山梨大学(山梨県・甲府市).

田中秀治, 気節 - 非相分離振幅変調多重化フロー分析法の開発と応用, 2015年3月27日, 日本薬学会第135年会, 神戸サンボホール(兵庫県・神戸市).

Takeshi Ogusu, Spectrophotometric determination of phosphate ion by amplitude modulated multiplexed flow analysis, 2014年12月2日, The 19th International Conference on Flow Injection Analysis, ACROS Fukuoka (Fukuoka Prefecture, Fukuoka City).

内本勝也, ミセル濃縮を利用した振幅変調フロー分析法, 2014年9月17日, 日本分析化学会第63年会, 広島大学(広島県・東広島市).

大楠剛司, 振幅変調多重化フロー分析法; 内標準法への導入の検討, 2014年9月17日, 日本分析化学会第63年会, 広島大学(広島県・東広島市).

Haruka Yoshida, Determination of nitrite and nitrate ions in water samples by air segmented - amplitude modulated multiplexed flow analysis, 2013年11月8日, 第51回フローインジェクション分析講演会, 熊本大学(熊本県・熊本市).

Hideji Tanaka, Determination of phosphate ion in water samples by air segmentation - amplitude modulated multiplexed flow analysis, 2010年10月16日, 2012 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry, Shanghai New International Expo Centre (Shanghai, China).

Takeshi Ogusu, Air segmented - amplitude modulated multiplexed flow analysis with no deaeration process. Determination of phosphate ion, 2012年9月27日, Flow Analysis XII, Grand

Hotel Parace (Thessaloniki, Greece).

Hideji Tanaka, Amplitude modulated multiplexed flow analysis for simultaneous determination of multiple analytes. Determination of ferrous and ferric ions, 2012年9月24日, Flow Analysis XII, Grand Hotel Parace (Thessaloniki, Greece).

戌亥孝次, 気節 非相分離 / 振幅変調多重化フロー分析法によるアンモニウムイオンの定量, 2012年9月19日, 日本分析化学会第61年会, 金沢大学(石川県・金沢市).

大楠剛司, リン酸イオンの定量を目的とする気節 非相分離 / 振幅変調多重化フロー分析法, 2012年9月19日, 日本分析化学会第61年会, 金沢大学(石川県・金沢市).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀治 (TANAKA, Hideji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 40207121

(2) 研究分担者

竹内 政樹 (TAKEUCHI, Masaki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 10457319

(3) 連携研究者: なし

(4) 研究協力者

大楠 剛司 (OGUSU, Takeshi)

徳島大学・大学院薬科学教育部・博士後期課程, 大学院生

戌亥 孝次 (INUI, Koji)

徳島大学・薬学部薬学科・学生

吉田 悠 (YOSHIDA, Haruka)

徳島大学・薬学部薬学科・学生

内本 勝也 (UCHIMOTO, Katsuya)

徳島大学・薬学部薬学科・学生

尾崎 真理 (OSAKI, Mari)

徳島大学・薬学部薬学科・学生