

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07889

研究課題名(和文)超ハイスループット滴定のための気節-フィードバック制御フローレイシヨメトリー

研究課題名(英文) Air segmented - feedback based flow ratiometry for super high throughput titration

研究代表者

田中 秀治 (TANAKA, Hideji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：40207121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が創案したフィードバック制御フローレイシヨメトリーに、気節 非相分離検出法を導入した。液流を気泡で分節することで分散を抑制し、流量比をより正確に反映した検出信号の取得をめざした。構築したシステムとプログラムの分析条件を最適化したのち、各種酸塩基滴定に応用した。気節法の導入により、適用可能な濃度範囲が広まった。超ハイスループット化に焦点を当てた研究(気節なし)では、自作したLED検出器を用いて前例のないハイスループット滴定(50滴定/分)を実現した。さらに、2つのフィードバック機構を組み合わせることで、品質分析と品質管理(設定濃度への自動調整)を同時に行うシステムも開発した。

研究成果の概要(英文)： Feedback-based flow ratiometry (FB-FR) is a sophisticated variation of flow analysis, first reported by Tanaka et al. in 2000. Flow ratio of sample and reagent solutions is continuously varied by variable and subsequent fixed triangular waves. Information on analyte is obtained by analyzing the relationship between sample/reagent flow ratio and detector output signal. Throughput rate can be increased by a feedback-based control.

In this study, air segmentation approach has been introduced to a flow titrimetry by FB-FR. Axial dispersion was limited in each liquid segment separated by air bubbles, resulting in the expansion of applicable range. The FB-FR system with unprecedented high throughput rate (max. 50 titrations/min, in non segmented mode) was also developed. FB-FR was further applied to a process control, where online analysis and control were carried out by coupling two kinds of feedback-based controls.

研究分野：分析化学

キーワード：フローレイシヨメトリー 流量比法 流れ分析 フロー滴定 気節法 ハイスループット滴定 フィードバック制御 非水滴定

1. 研究開始当初の背景

古典的分析法である滴定法は、高い精度などの優れた長所のため、常量分析や主成分定量において現在でも広く用いられている。反応が化学量論的に進行する限り、標準物質による検量線の作成を必要としない絶対法である。したがって、検量線作成を必要とする相対法に比べ、より正確な分析が行えるポテンシャルを有する。しかし、手操作による滴定は煩雑で時間がかかる上、比較的多量の試料と試薬を必要とする。危険な薬品の取り扱いにも注意が必要である。

そこで、自動滴定法の研究が行われてきた。中でもフロー滴定法は、一連の過程を準閉鎖系内で連続的に進めるため、測定効率の向上や試料・試薬量の低減などの長所を有する。これまで、フローインジェクション滴定法など、さまざまなフロー滴定法が開発されてきた。しかし、液の合流から下流での検出までの遅れ時間 t_{lag} の存在のため、1 滴定あたり 2,3 分を要するのが現状であった。

2000 年に研究代表者は、試料と標準液の流量比を連続的に変化させ、この流量比と検出信号との関係を解析することで定量を行うフローレイシヨメトリー（流量比法）を考案した。フィードバック制御により、流量比走査を目的情報取得のために必要最小限の範囲に限定し、効率化を図った。さらに、フィードバック制御と高速固定三角波制御を組み合わせることにより、1 分あたり最大 34 滴定というハイスループット化を実現した。しかし、その併行精度は相対標準偏差 0.5% 以上であり、ビュレットを用いる手滴定で達成可能な 0.1% には及ばなかった。

2. 研究の目的

フィードバック制御フローレイシヨメトリーにおいては、液の合流時点における流量比を正確に反映した検出信号を得ることが重要である。そのためには、フロー系内の管軸方向への分散を極力抑制する必要がある。細管内の液流を気泡で分節すれば、分散を各液節内に限定することができ、液流内の各点における流量比をより正確に反映した精度の高い分析シグナルが得られると予想される。そこで本研究では、フィードバック制御フローレイシヨメトリーに、研究代表者が開発した気節-非相分離検出法を導入することで、より正確でよりハイスループットな自動滴定システムを構築し、日本薬局方医薬品等の定量に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

まず、気相/液相の自動識別および信号平滑化のためのアルゴリズムを導入した気節-フィードバック制御フローレイシヨメトリーのプログラムの作成と、フロー分析システムの構築を行った。比較的単純な直接滴定 (HCl vs. NaOH) でこれらの検証と最適化を行い、その成果をもとに、局方医薬品等の定量、特

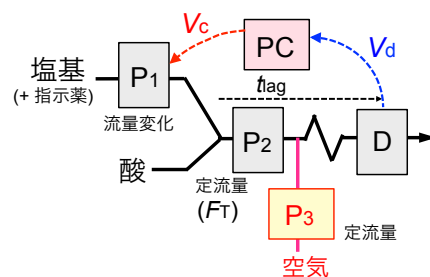


図1 気節-フィードバック制御フローレイシヨメトリーのシステム

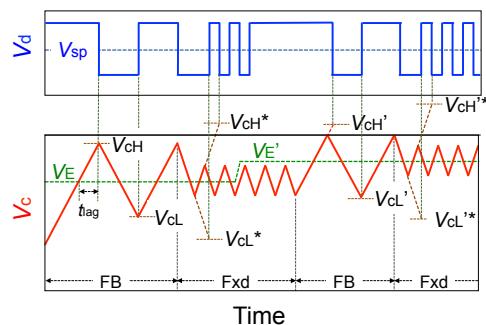


図2 フィードバック制御と固定三角波制御を組み合わせたフローレイシヨメトリーの原理

に最も応用例が多い非水滴定に応用した。当初の計画では間接滴定や逆滴定も検討する予定であったが、気相/液相の自動識別のためのパラメーターを反応系ごとに設定しなければならないなど困難が多く、研究が思うように進展しなかった。そこで新たな展開として、2つのフィードバック機構（フィードバック制御フローレイシヨメトリーによるオンライン滴定、その結果をフィードバックさせることによる設定濃度への自動調整）を組み合わせた工程分析・工程管理への応用を研究した。

図1に構築した気節-フィードバック制御フローレイシヨメトリーのマニフォルド（流路図）を示す。酸塩基滴定では、総流量一定のもと、流量可変ポンプ P1 をコンピュータ PC から出力される制御信号 V_c によって制御し、酸と塩基を様々な流量比で合流させた。続いて、第3の流路から空気を一定流量で導入し、液流を分節した。相分離を行うことなく、両相を検出器 D に導き、指示薬の塩基性色における吸光度を測定した。これを検出信号 V_d として直接、あるいは増幅後、PC に取得した。

自動化プログラムは、研究代表者が以前に作成した Excel VBA プログラムを改良した。特に、フィードバック制御時における V_c の上限値 (5 V) あるいは下限値 (0 V) への振り切れについて対策を施し、より広範囲の流量比に対応できるようにした。原理を図2に示す。フィードバック制御 (FB) モードでは、 V_c (したがって塩基流量) を直線的に増大さ

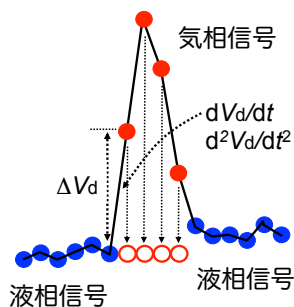


図3 信号処理による気泡信号除去

せる。合流点において当量点組成を与える $V_c (= V_E)$ に達してから t_{lag} 遅れて、 V_d は当量点信号 V_{sp} に達する。この瞬間に V_c を減少方向に転じさせる。再び V_{sp} が検出されたときには、 V_c の制御を上昇方向へと転じる。このような走査を繰り返すと、隣り合う V_c の極大値 V_{cH} と極小値 V_{cL} の平均が V_E を与え、その値より酸（または塩基）の濃度を求めることができる。続いて、より狭い範囲をより高速で固定三角波制御 (Fxd) し、測定効率を高める。 V_c が V_E をカバーする限り、 t_{lag} 遅れて V_{sp} が検出されるので、その時刻まで走査方向反転前の V_c を外挿することにより V_{cH} や V_{cL} に相当する値（それぞれ V_{cH}^* と V_{cL}^* ）を求めることができる。試料濃度が変化して V_c の走査範囲が V_E をカバーできなくなると、 V_d が高値あるいは低値に留まったままとなる。この時には再び FB モードによる測定が始動するようプログラミングしている。

信号処理による気泡信号の除去の原理を図3に示す。液相信号からの変位や信号の傾き（一階微分値、二階微分値）に閾値を設け、得られた V_d に関して、いずれかの閾値を上回ったとき、これを気相由来信号として除去し、直近の液相信号を維持する。必要に応じて移動平均処理により平滑化を行う。

4. 研究成果

(1) 気節-フィードバック制御フローレイシヨメトリーによるフロー滴定

P_2 (図1参照) の流量を $1.43 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ に

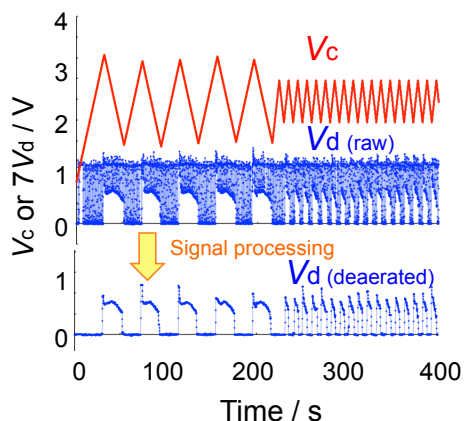


図4 滴定のフローシグナル

固定し、空気流量を検討した結果、 $0.48 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ を P_3 の最適流量とした。このとき液流に導入される気泡の体積は、 $7.85 \pm 0.46 \text{ mm}^3$ (RSD = 5.8%)であった。 0.05 mol dm^{-3} HCl および 0.1 mol dm^{-3} NaOH を用いて制御条件を検討した。その結果、 V_c 走査速度については FB モードでは 100 mV s^{-1} 、Fxd モードでは 200 mV s^{-1} とし、後者では前者における直近の V_c 走査範囲の 50% を走査することとした。

フローシグナルの一例を図4に示す。試料は 0.1 mol dm^{-3} HCl、標準液は 0.1 mol dm^{-3} NaOH (指示薬としてプロモチモールブルーを含む) であり、指示薬の塩基性色 (青) の吸収極大波長で吸光度をモニターした。開発したプログラムにより、生信号 $V_d(\text{raw})$ からほぼ完全に気泡信号が除去でき、液相信号 ($V_d(\text{deaerated})$) が得られていることがわかる。求められた V_E は $2.941 \pm 0.062 \text{ V}$ であり、RSD = 2.12% ($n = 72$)、1 滴定あたりに要する時間は 5.07 秒であった。本法は検量線作成を要しない絶対法である。しかし、煩雑な流量校正を行うよりも酸濃度の逆数 C_A^{-1} (図1の流路構成の場合) と V_E^{-1} が直線関係にあることを利用して検量線を作成する方が現実的である。 $0.01 - 0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ HCl に対して得られた検量線は、気節法を導入しない場合は低濃度側で直線性が失われたのに対し、気節法を導入すると、いずれの濃度範囲でも直線性の高い ($r^2 = 0.9980$) 検量線が得られた。本法を種々の酸塩基滴定 (HCl, CH_3COOH , H_3PO_4 , NaOH, NH_3 , Na_2CO_3) に応用し、良好な結果を得た。

(2) フィードバック制御フローレイシヨメトリーの超ハイスループット化

フィードバック制御モードでは $2t_{lag}$ ごとに 1 滴定が行えるので、滴定効率は主として t_{lag} に依存する。そこで、気節を導入せずに、液の合流から検出までの流路を極力短くすることで、滴定の超ハイスループット化をめざした。この目的のために、コンピュータの ATX 電源、発光ダイオード、フォトダイオード、石英管などからなる光度検出器を製作した。その結果、1 分あたり最大 44.3 滴定 (図1の P_2 を D の下流側に設置した場合は 50.0 滴定/分) という超ハイスループット化を達成できた。日本薬局方医薬品のフロセミド (利尿薬) の非水滴定、炭酸水素ナトリウム (制酸薬) の酸塩基滴定、イソニアジド (抗結核薬) の非水滴定に応用した結果、公定法 (手滴定) によって得られた結果と相対誤差 3% 未満で一致する結果が得られた。市販醸造酢 (穀物酢、米酢、りんご酢) の酸度の測定においても、手滴定の場合の約 1/200 の測定時間、1/500 の試料量、1/1300 の試薬量で、一致する結果が得られた。

なお、検出器を流通式ガラス電極に変更して酸塩基の電位差滴定を行った場合には、 V_c 走査速度は FB モードおよび Fxd モードとも

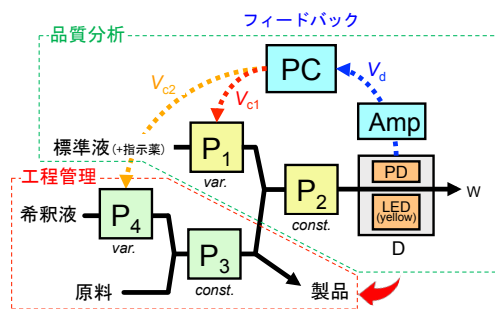


図5 工程管理システム

100 mV s⁻¹が最適値となり、1滴あたりに必要な時間は14.7秒であった。これは、光度検出器に比べて電極の応答が遅いためと考えられる。

(3) フィードバック制御フローレイシヨメトリーの工程管理への応用

医薬品や食品の製造工程では、製品が均質で、品質規準を満たすことが重要である。この目的のため、製造ライン中で製品の品質を迅速にモニターし制御できる方法の開発が求められている。そこで本研究では、フィードバック制御フローレイシヨメトリーの工程管理の応用について検討した。図5に流路構成を示す。品質分析部では、フィードバック制御フローレイシヨメトリーに基づいて、制御信号 V_{c1} によってポンプ P_1 の流量を変化させ、製品のオンライン分析を行う。その結果をフィードバックし、工程管理部では制御信号 V_{c2} によってポンプ P_4 の流量を変化させ、原液と希釈液の混合比を変化させる。分析値と設定値との間に有意な差が生じたとき、希釈液と原料の流量比が再調整される。

一例として、塩酸濃度の設定値を 0.1 mol dm^{-3} として、本法を適用した場合の結果を図6に示す。0.1, 0.2, 0.15 mol dm^{-3} 塩酸の順で原液を変更したところ、 0.1 mol dm^{-3} の原液では、 V_E の値より $0.101 \pm 0.003 \text{ mol dm}^{-3}$ の分析値が得られた (P_4 ポンプは非作動)。続いて 0.2 mol dm^{-3} さらに 0.15 mol dm^{-3} の原液へと変更したときは、品質分析部で設置値 (0.1 mol dm^{-3}) からの逸脱が確認された瞬間 (それぞれ時刻 141 秒および 862 秒) に V_{c2} によるフィードバック制御が始動し、いずれも 5 分程度でそれぞれ 0.096 ± 0.003 , $0.102 \pm 0.003 \text{ mol dm}^{-3}$ の濃度にまで収束させることができた。本研究の成果は、連続的な濃度測定と設定濃度への自動調整を必要とする製造工程の管理のための基礎的知見を与えるものであると考える。

(4) 総括

フィードバック制御フローレイシヨメトリーは研究代表者が2000年に創案・命名 (H. Tanaka *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 4713 (2000)) した分析法であり、プログラムも研究代表者が作成したオリジナルなものである。比較的単純なシステムで高性能な自動分析

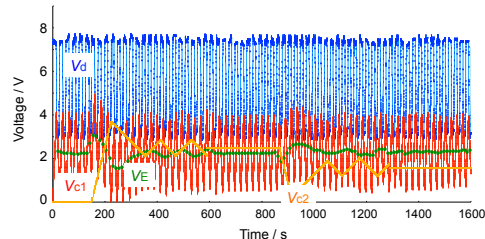


図6 工程管理のフローシグナル

が可能であり、既存の分析法や高額市販機器に頼った分析化学研究とは一線を画するものである。汎用され、重要な分析法であるものの、古典的分析法であり、研究の対象とはなりにくい滴定に焦点を当てた点でもユニークな研究であると考えられる。

本研究では、フィードバック制御フローレイシヨメトリーのさらなる信頼性の向上をめざして、気節-非相分離検出法を導入した。細管内の液流を気泡で分節し、分散を各液節内に制限することで、液流内の各点における流量比をより正確に反映した分析信号が得られると期待した。システムの構築およびプログラム作成から着手し、基本的分析条件を確立したのち、各種酸塩基滴定に応用した。気節法の導入により、フロー系内での分散が抑制でき、適用可能な濃度範囲が広がることが示された。反応速度が遅い、試料の粘度が高いなどの理由で、長い反応コイルが必要な時に本法の長所はより発揮できると考えられる。実際、HCl vs. NaOH の滴定において、長い反応コイルを用いた場合の本法の有効性を明らかにした。しかし、実際の応用例となりうるような適切な反応系が思い浮かばなかった。また、酸塩基および指示薬の種類ごとに、相認識のための閾値を詳細に設定する必要があるが、研究が思うように進まなかった。

そこで、気節を導入しないフィードバック制御フローレイシヨメトリーで、超ハイスループット化をめざす研究も行った。発光ダイオードやフォトダイオードで検出器を自作し、マニフォールドも検討 (検出器の下流側に総流量一定のためのポンプを設置) することにより、最大 50 滴定/分という世界でも前例のない超ハイスループット滴定が実現できた。日本薬局方医薬品の非水滴定にも応用することができた。さらに、2 種類のフィードバック機構を組み合わせることにより、工程管理 (オンライン自動定量、設定濃度への自動調整) への応用についても示した。

現在、フィードバック制御フローレイシヨメトリーの汎用性をさらに高めるために、web カメラを用いる色調解析法を検討しており、その完成を今後の目標としたい。また、原著論文公表にまで至らなかった研究成果について、不足のデータを補い、順次、原著論文公表していきたい。

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)

- ① Naoya Kakiuchi, Aiko Miyazaki, Akihiro Fujikawa, Masaki Takeuchi, Hideji Tanaka, "High Throughput Titration Based on Variable and Fixed Triangular Wave Controlled Flow Ratiometry with LED-Photodiode Detector," *J. Flow Inject. Anal.*, 査読有, **34(1)**, 11-14 (2017). [https://doi.org/10.24688/jfia.34.1_11]
- ② 田中秀治, 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 (解説), *J. Flow Inject. Anal.*, 査読有, **32(2)**, 101-105 (2015). [https://doi.org/10.24688/jfia.32.2_101]

[学会発表] (計 20 件)

- ① 柿内直哉, フィードバック制御フローレイシヨメトリーによるプロセス分析と制御, 2018年9月(発表予定), 日本分析化学会第67年会, 東北大学(宮城県・仙台市).
- ② 柿内直哉, フィードバック制御フローレイシヨメトリーの工程管理への応用, 2018年7月1日(発表予定), 第24回分析化学若手セミナー, 鶯敷野外活動センター(徳島県・那賀町).
- ③ Hideji Tanaka, Flow titrimetry based on air-segmented flow ratiometry controlled with feedback-based/fixed triangular waves, 2018年2月7日, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018), The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center (Hat Yai, Thailand).
- ④ Naoya Kakiuchi, High throughput titration by feedback-based flow ratiometry and its application to analyses of drugs in Japanese Pharmacopoeia, 2018年2月7日, Pure and Applied Chemistry International Conference 2018 (PACCON 2018), The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center (Hat Yai, Thailand).
- ⑤ 柿内直哉, 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と工程管理への応用, 2018年1月23日, 第22回徳島地区分析技術セミナー(日本分析化学会中国四国支部徳島地区講演会), 徳島大学薬学部(徳島県・徳島市).
- ⑥ 柿内直哉, フィードバック/固定三角波制御フローレイシヨメトリーの局方医薬品定量への応用, 2017年12月1日, 第54回フローインジェクション分析講演会, 岡山理科大学(岡山県・岡山市).
- ⑦ 柿内直哉, フィードバック/固定三角波制御フローレイシヨメトリーの開発と局方医薬品のハイスループット滴定への応用, 2017年10月21日, 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 徳島大学蔵本キャンパス(徳島県・徳島市).
- ⑧ 平坂知子, 気節-非相分離フィードバック制御フローレイシヨメトリーの各種酸塩基滴定への応用, 2017年9月10日, 日本分析化学会第66年会, 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都・葛飾区).
- ⑨ Hideji Tanaka, Flow titration by feedback-based flow ratiometry with air segmentation, 2017年9月10日, China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry 2017 (招待講演), 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都・葛飾区).
- ⑩ Naoya Kakiuchi, High throughput titration by feedback-based flow ratiometry and its application to analysis of vinegar samples 2017年9月10日, China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry 2017 (Outstanding Presentation Award 受賞), 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都・葛飾区).
- ⑪ 宮崎愛子, 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ハイスループット滴定, 2017年7月2日, 第23回分析化学若手セミナー, 秋吉台国際芸術村(山口県・美祢市).
- ⑫ 柿内直哉, ハイスループット滴定(43 滴定/分)を可能にするフィードバック/固定三角波制御フローレイシヨメトリー, 2017年5月27日, 第77回分析化学討論会(若手ポスター賞受賞), 龍谷大学深草学舎(京都府・京都市).
- ⑬ Hideji Tanaka, High throughput titration by air-segmented flow ratiometry, 2016年12月10日, The 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII) (招待講演), The Empress International Convention Center (Chiang Mai, Thailand).
- ⑭ 岡佐和子, 気節-非相分離フローレイシヨメトリーによるハイスループット滴定, 2016年11月5日, 第53回フローインジェクション分析講演会, 同志社大学室町キャンパス寒梅館(京都市).
- ⑮ 柿内直哉, フィードバック/固定三角波制御フローレイシヨメトリーによる超ハイスループット滴定, 2016年9月14日, 日本分析化学会第65年会, 北海道大学工学部(北海道・札幌市).

- ⑯ 田中秀治, フィードバック制御フローレイシヨメトリーと振幅変調多重化フロー分析法, 2016年5月29日, 第76回分析化学討論会, 岐阜薬科大学(岐阜県・岐阜市).
- ⑰ 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, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2015), Marriott Waikiki Beach (Honolulu, Hawaii, USA).
- ⑱ 田中秀治, 流量の周期的変化を利用するフロー分析法の創案, 2015年12月11日, 日本分析化学会中国四国支部周南地区講演会(招待講演), 東ソークラブ(山口県・周南市).
- ⑲ 久保祐哉, 気節-非相分離フィードバック制御フローレイシヨメトリーによる滴定, 2015年11月20日, 第52回フローインジェクション分析講演会, 桐生地域地場産業振興センター(群馬県・桐生市).
- ⑳ 田中秀治, フィードバック制御フローレイシヨメトリーに基づくフロー滴定への気節法の導入, 2015年9月10日, 日本分析化学会第64年会, 九州大学伊都キャンパス(福岡県・福岡市).

[図書](計2件)

- ① 田中秀治, 「滴定終点検出法」, 第17改正日本薬局方解説書, 分担単著, 図書の総ページ数9,800頁, 分担単著の章の総ページ数11頁(pp. B276-286), 廣川書店, 東京, 2016.
- ② 田中秀治, 「酸塩基滴定」, 基礎分析化学, 共編・分担単著, 図書の総ページ数193頁, 分担単著の章の総ページ数15頁(pp. 33-47), 廣川書店, 東京, 2016.

[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・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 40207121.

(2)研究分担者

竹内 政樹 (TAKEUCHI, Masaki)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 10457319.

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者

柿内 直哉 (KAKIUCHI, Naoya)
徳島大学・大学院薬科学教育部・博士前期課程, 大学院生
久保 祐哉 (KUBO, Hiroya)
徳島大学・薬学部薬学科・学生
岡 佐和子 (OKA, Sawako)
徳島大学・薬学部薬学科・学生
平坂 知子 (HIRASAKA, Tomoko)
徳島大学・薬学部薬学科・学生
富山 絵里奈 (TOMIYAMA, Erina)
徳島大学・薬学部薬学科・学生
宮崎 愛子 (MIYAZAKI, Aiko)
徳島大学・薬学部薬学科・学生
藤川 明洋 (Fujikawa, Akihiro)
四国理研有限公司