

RGB単位ベクトル間の内積に基づく滴定終点検出法の
開発とフィードバック制御フローレイショメトリー
による局方医薬品定量への応用

2022

柿内 直哉

目次

第1章 序論.....	3
1.1 研究の背景.....	3
1.1.1 フロー滴定法の開発.....	3
1.1.2 フロー分析法の特徴.....	6
1.2 本研究の目的.....	6
第2章 フィードバック／固定三角波制御フローレイショメトリーによるハイスループット滴定.....	7
2.1 緒言.....	7
2.2 実験.....	7
2.2.1 試薬と試料.....	7
2.2.2 フローシステム.....	8
2.2.3 方法.....	9
2.2.4 フィードバック／固定三角波制御フローレイショメトリーの原理.....	10
2.3 結果と考察.....	12
2.3.1 分析パラメータの最適化.....	12
2.3.2 分析性能.....	14
2.3.3 各種酸・塩基試料の検量線.....	16
2.3.4 食酢分析への応用.....	18
2.4 小括.....	19
第3章 超ハイスループット化および日本薬局方医薬品定量への応用.....	20
3.1 緒言.....	20
3.2 実験.....	20
3.2.1 試薬と試料.....	20
3.2.2 フローシステム.....	21
3.2.3 方法.....	22
3.3 結果と考察.....	23
3.3.1 分析パラメータの最適化.....	23
3.3.2 試料濃度変化への対応.....	24
3.3.3 日本薬局方医薬品を含む各種酸・塩基滴定への適用.....	26
3.4 小括.....	27
第4章 RGB 単位ベクトル間の内積を利用した滴定終点検出法の開発.....	28
4.1 緒言.....	28
4.2 実験.....	29

4.2.1	試薬と試料	29
4.2.2	デジタルマイクロスコープ検出器	29
4.2.3	測定用プログラム	31
4.2.4	フローシステム	32
4.2.5	固定三角波制御フローレイシヨメトリーの原理	33
4.2.6	RGB 値を利用した内積	34
4.2.7	色相値 (H) の算出	35
4.3	結果と考察	36
4.3.1	RGB 単位ベクトル間の内積に基づく終点検出法によるフローシグナル例	36
4.3.2	分析性能	38
4.4	小括	39
第5章 RGB 単位ベクトル間の内積を利用した滴定終点検出法の日本薬局法収載医薬品および食酢の定量への応用		40
5.1	緒言	40
5.2	実験	40
5.2.1	試薬と試料	40
5.2.2	フローシステムと方法	41
5.3	結果と考察	43
5.3.1	種々の酸・塩基滴定	43
5.3.2	日本薬局方医薬品の滴定	44
5.3.3	分析性能の評価	46
5.3.4	食酢分析への応用	49
5.4	小括	49
第6章 総括		50
謝辞		52
参考文献		53

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 フロー滴定法の開発

滴定法 (容量分析法) は高精度で汎用性に優れるため、現在でも広く用いられている古典的分析法である。標準物質による検量線の作成を必要としない絶対分析法であり、多くの機器分析法が該当する相対分析法と比較して、原理的には、より正確な定量が可能である。薬学領域では、日本薬局方¹ 記載医薬品の約 45% が滴定法により定量するよう規定されている。しかし、伝統的な滴定は手操作による方法であり、その操作は煩雑で時間を要し、比較的多量の試料と試薬を必要とする上、危険な薬品の取り扱いにも注意を要する。このため、簡便、迅速で経済性にも優れる自動滴定法の開発が求められてきた。

自動滴定法は自動バッチ滴定法と自動連続滴定法 (フロー滴定法) の 2 つに大別される。このうち細管内の流れの中で標準液と試料溶液を反応させるフロー滴定法では、一連の分析工程を準閉鎖系の中で連続的に行うことができるため、測定の自動化と効率の向上、試料・試薬の節約などが期待できる。Tanaka と Nakano はさまざまなフロー滴定法について報告している²。フロー滴定法の代表的な例として、フローインジェクション滴定法 flow injection titration³⁻⁵ (FI 滴定法) およびシーケンシャルインジェクション滴定法 sequential injection titration⁶ (SI 滴定法) の 2 つが挙げられる。

FI 滴定法は、フローインジェクション分析法 flow injection analysis (FIA) の創始者である Ruzicka と Hansen のグループによって提案された方法である。この方法のフローシステムを図 1.1 に示す。標準液であるキャリアー溶液中に試料溶液を注入し、混合コイル RC を経て検出器 D へと導く。下流の検出器 D へと流れていく過程で試料帯はその両端でキャリアー溶液中へと分散していき、目的成分の濃度に依存した分散度で当量点に達する。そのため、図 1.2 に示すような試料帯の前後 2 か所に滴定終点シグナルが観測される。この滴定終点シグナル間のピーク幅 Δt と目的成分濃度の対数値が比例することから、あらかじめ既知濃度の目的成分を含む溶液を用いて検量線を作成しておくことで、試料溶液のピーク幅 Δt からその濃度を求めることができる。しかし、FI 滴定法による測定においては、1 滴定あたり 10 数秒以上の時間を要する上、キャリアー溶液に標準液を用いるため、多量の標準液を消費するなどの欠点が指摘されてきた。この欠点を改善するために考案されたフロー滴定法が SI 滴定法である。

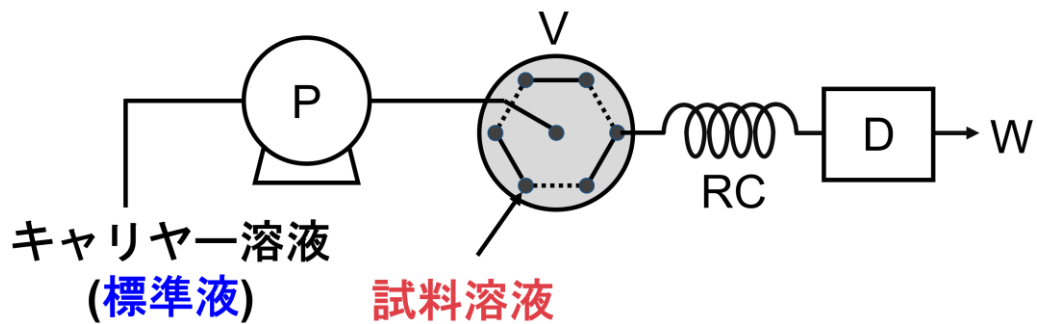


図 1.1 FI 滴定法のフローシステム

P, ポンプ; V, インジェクションバルブ; RC, 混合コイル; D, 検出器; W, 廃液。

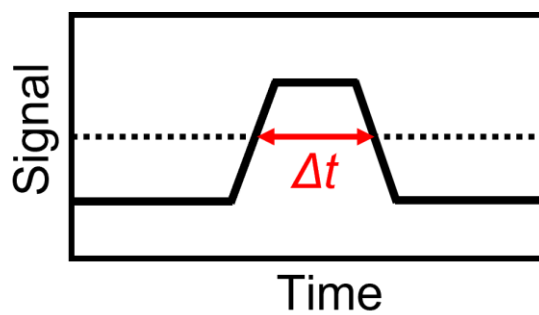


図 1.2 FI 滴定法のシグナル

SI 滴定法は、FI 滴定法の原理をシーケンシャルインジェクション分析法 sequential injection analysis (SIA) へと応用したものである。この方法のフローシステムを図 1.3 に示す。標準液、試料溶液、標準液の順でキャリアー溶液中に注入し、保持コイル HC に保持する。一定時間経過後、キャリアー溶液とともに標準液、試料、標準液のゾーンを検出器 D の方向へと送液する。滴定原理は FI 滴定法と同様であり、試料帯がその前後に位置する標準液へと分散していくことを利用して目的濃度を求める。本法では、標準液を連続的に送液する FI 滴定法と比較して標準液の節約が可能である。しかし、検量線から直接求められるのは目的成分濃度の対数値であるため、ピーク幅のわずかな誤差が目的成分濃度に大きな影響を与える。

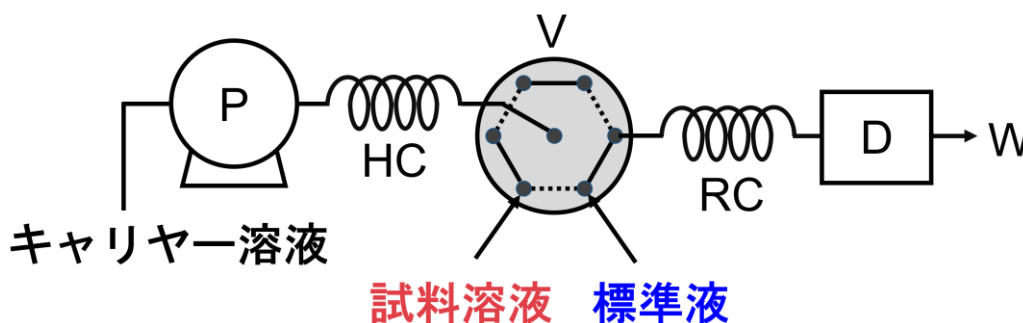


図 1.3 SI 滴定法のフローシステム

P, ポンプ; HC, 保持コイル; V, インジェクションバルブ; RC, 混合コイル; D, 検出器; W, 廃液。

その他のアプローチとして、フローレイシヨメトリー (流量比法) flow ratiometry^{7,8}, 三角波制御電量滴定法 triangle programmed coulometric titration⁹⁻¹¹, 相分離フロー滴定法 monosegment flow titration¹², フロー・バッチ融合型滴定法 flow-batch titration¹³ などの研究がなされてきた。これらの方法によって、測定に要する試料や試薬の消費量は削減されたが、1 回の滴定に数 10 秒以上を要する。Tanaka らの報告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} は、上流の試料溶液と標準液の合流点から下流に配置した検出器に至るまでの遅れ時間をフィードバック制御により補正することで、ハイスループットな滴定を可能とした流量比法である。Fais らはこの原理をプロセス管理へと応用した¹⁶。Tanaka らは、さらにフィードバック制御と固定三角波制御を併用する原理 (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) を考案し、十分な精度 (RSD < 0.5%) で前例のない高い測定効率 (最大 34 titrations min⁻¹) を実現した¹⁷⁻¹⁹。

1.1.2 フロー分析法の特徴

フロー分析法は、送液ポンプ、インジェクションバルブ、反応コイル、検出器などからなるシステムを構築すれば、ハンズフリーで測定が可能であるため、その操作は簡便であるといえる。さらに、コンピュータ制御によるシステムの完全自動化により、省人・省力化、分析時間の短縮や人為的誤差の低減、分析精度の向上が期待できる。Ruzicka らの報告³⁴では1時間あたり150–200試料の測定を行っており、1時間あたり10–20試料が一般的であるバッチ分析法に比べ、はるかに効率的である。さらに、細管内で短時間の測定を行うため、1回の測定に要する試料や試薬の量はバッチ分析法と比較して大幅に削減できる。細管内準閉鎖系で一連の分析工程が実行されるため、試料や試薬からの実験環境汚染あるいは実験環境から試料へのコンタミネーションは非常に少ない。

1.2 本研究の目的

筆者が所属する分析科学分野では、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改良を行ってきた。本研究の前半では、新たな検出器（自作 LED-フォトダイオード (PD) 検出器）の導入と、流路構成の再構成により、さらなるハイスループット化を目指した。後半では、デジタルマイクロスコープによって撮影した動画の表色値（色彩値）をもとに滴定終点を検出する方法を探究した。RGB 単位ベクトル間の内積より指示薬の色調変化を検出するアプローチを新たに考案し、フィードバック制御フローレイシヨメトリーへと応用した。開発した分析システムで、日本薬局方収載医薬品や食酢など、種々の酸・塩基試料の滴定へと応用し、提案した分析法の分析性能と有用性を評価した。

第 2 章 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ハイスループット滴定

2.1 緒言

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は Tanaka ら¹⁷⁻¹⁹によって提案された高効率のフロー滴定法である。当量点付近で試料溶液と標準液の流量比を連続的に高速変化させることによって、高精度 (RSD < 0.5%) かつ高スループット (最大 34 titrations min⁻¹) な自動滴定を実現した。この分析法では、分光光度計を用いて酸塩基指示薬の色調変化をモニターするため、流路長を縮めることが難しい。試料溶液と標準液の合流から下流の検出器に至るまでの遅れ時間が滴定効率に影響するため、両液の合流から検出器までの距離を短くすることが望ましい。そこで、本章ではフィードバック／固定三角波制御フローレイシヨメトリーに自作の LED-PD 検出器を導入した新規の分析システムを構築し、さらなる効率性の向上、試料・試薬消費量の削減および分析装置の低廉化を図った²⁰。また、開発した分析システムによって、市販の食酢中の酢酸を定量し、提案した分析システムの有用性を検討した。

2.2 実験

2.2.1 試薬と試料

ブロモクレゾールグリーン (BCG), 2 mol dm⁻³ HCl, 2 mol dm⁻³ NaOH, 25% NH₃, Na₂CO₃ は関東化学株式会社 (東京) から購入した。ブロモチモールブルー (BTB), チモールブルー (TB), チモールフタレイン (TP) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。本章の研究で使用した試薬は分析試薬等級であり、さらなる精製をすることなく使用した。水は逆浸透水を超純水製造装置 Sartorius Arium 611DI で脱イオン化した超純水を使用した。食酢試料は地元のスーパーマーケットで購入し、分析前に超純水で 10 倍希釈したものをを用いた。

2.2.2 フローシステム

本章の研究のフローシステムを図 2.1 に示す。分析システムは 2 台のペリスタポンプ P_{1-2} (Minipuls 3, MP-2, GILSON, USA.), A/D-D/A コンバータ (PC-CARD-DAS16/12-AO, Measurement Computing, USA), ノートパソコン PC (Dynabook Satellite 1850 SA120C/4, TOSHIBA, Japan), 後述する検出器 D, および電流増幅器 Amp (C2719, 浜松ホトニクス, Japan) で構成した。フローシステムの配管には, ポンプチューブ (外径 3.68 mm, 内径 0.51 mm の Pharmed[®]チューブ) を除いて PTFE チューブ (外径 1.59 mm, 内径 0.5 mm) を使用した。 P_2 ポンプのローラーによって溶液の混合が促進されるため, 混合反応器は使用しなかった。

図 2.2 は, 廃棄パソコンから再利用した ATX 電源 (3, 5, 12 V), 地元の家電量販店で購入した発光ダイオード (黄色 LED, 定格電流 25 mA, メーカーは不明), フォトダイオード (PD, 浜松ホトニクス S2281, Japan), 光学フローセル (外径 3 mm, 内径 1 mm の石英管), 抵抗器 (330 Ω), LED と PD を固定するためのアルミ板, DAISO で購入した黒のプラスチックカバーをもとに組み立てた自作の LED-PD 検出器の写真である。光路長は 1 mm で, 透過光強度を PD で測定する。

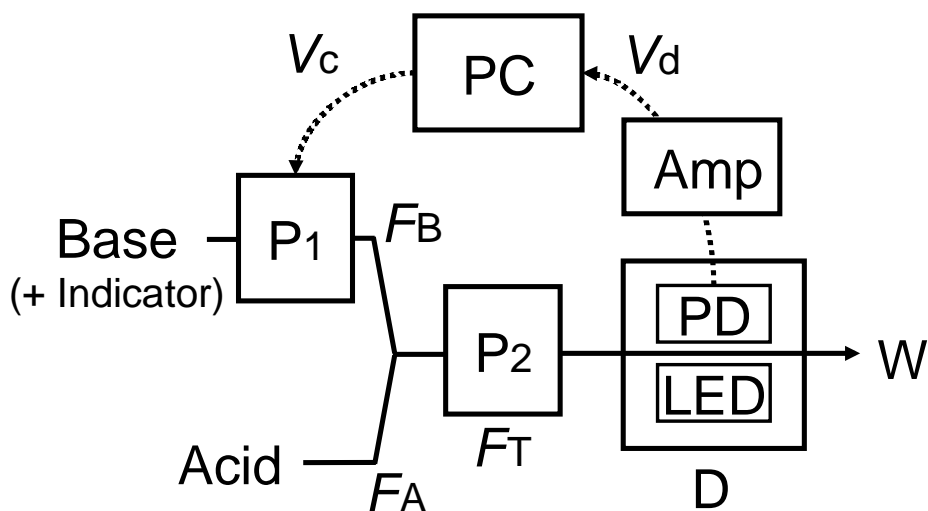


図 2.1 フローシステム

P_1 および P_2 , ペリスタポンプ; D, 検出器; PD, フォトダイオード;
LED, 発光ダイオード; Amp, 電流増幅器; PC, ノートパソコン (カード型の
A/D-D/A コンバータを挿入); V_c , 制御電圧; V_d , 検出電圧; F_A , 酸の流量;
 F_B , 塩基の流量; F_T , 総流量; W, 廃液。

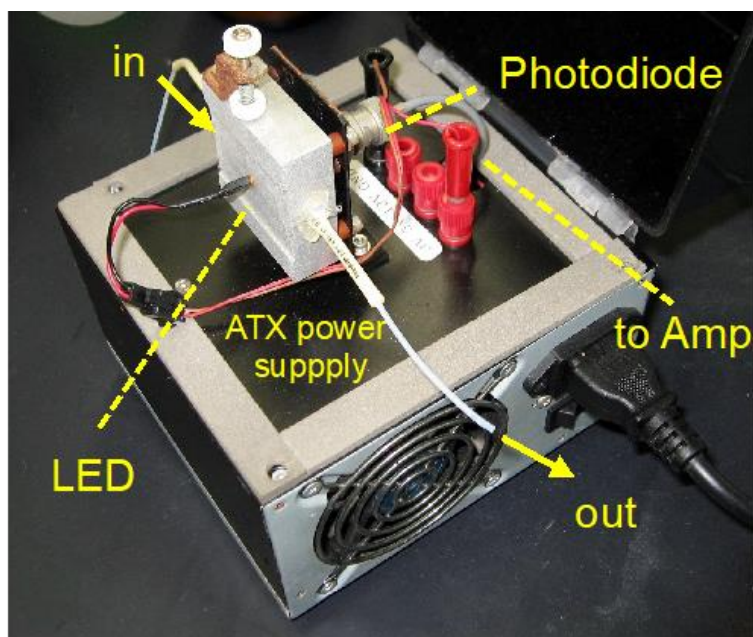


図 2.2 LED-PD 検出器

サイズ: 14 cm (W)×15 cm (D)×20 cm (H)

2.2.3 方法

A/D-D/A コンバータを経由して PC から供給される制御電圧 (V_c) に比例して、塩基溶液 (指示薬含有) の流量 (F_B) を P_1 によって増減させた。総流量 (F_T) は P_2 によって $1.41 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ で一定にした。酸溶液は $F_T - F_B$ の流量で受動的に吸引され、塩基溶液と合流する。この混合液を検出器内のフローセルへと導入し、透過光強度を測定した。検出器からの信号を電流増幅器によって増幅し、検出電圧 V_d として PC に取得する。システムの制御、データ取得、解析、結果の表示を自動化するためのプログラムは Excel VBA を用いて作成した。

2.2.4 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原理

原理を図 2.3 に示す。総流量一定のもと、 V_c を直線的に増大させつつ、 V_d を下流でモニターする。このとき、塩基溶液と酸溶液の合流から下流の検出器に至るまでに一定の遅れ時間 t_{lag} (主として液の移動時間に相当) が生じるので、 V_c が規定する合流点における組成は t_{lag} だけ遅れてモニターされる。 V_c が V_E で示した当量点組成を与えるレベルを通過したのち、 V_d は t_{lag} だけ遅れて滴定終点に相当する信号 V_{sp} に達する。この瞬間に V_c の走査方向を反転させる。 V_c が再び V_E を通過したのち、下流の検出器で V_{sp} が検出された瞬間に V_c の走査方向を反転させる。この操作がフィードバック制御であり、 V_c の極大値 V_{cH} および極小値 V_{cL} を平均することで V_E を求めることができる (式 2.1)。

$$V_E = \frac{V_{cH} + V_{cL}}{2} \quad (2.1)$$

この後、直近のフィードバック制御の走査範囲に対してより狭い範囲でより高速に V_c を走査させる。この走査が固定三角波制御であり、下流の V_{sp} の検出を待たずに V_c の走査方向を反転させているため、より効率的な測定が可能となる。フィードバック制御の V_{cH} と V_{cL} に相当するもの (それぞれ V_{cH}^* , V_{cL}^*) は、走査方向を反転させる前の V_c を下流の検出器で V_{sp} が検出された時間まで外挿することによって求めることができ、 V_E は式 2.2 から算出される。

$$V_E = \frac{V_{cH}^* + V_{cL}^*}{2} \quad (2.2)$$

濃度変化により、 V_c が V_E をカバーできなくなると、 V_d が V_{sp} に達することができなくなる。固定三角波制御において、 V_c 走査の 3 周期以上でこの状態が続いたとき、再びフィードバック制御に移行し、新たな V_E (図 2.3 の V_E' 参照) を求めるようにプログラムしている。また、 V_c が制限上限値 (5 V)、下限値 (0 V) に達した際は (標準液と試料溶液の濃度差が大きいときに起こり得る)、その瞬間に走査方向を反転させ、 V_{sp} が得られる時間まで反転前の V_c を外挿することによって V_{cH} および V_{cL} に相当する V_c (図 2.3 の V_{cH}') を求めるようにプログラムしている。

従来のバッチ式滴定法における体積のかわりに流量 (単位時間あたりに流れる体積) を用いることにより、本法では当量点において、以下の関係が成立する。

$$n_A C_A (F_T - F_B) = n_B C_B F_B \quad (2.3)$$

ここで、 n_A と n_B はそれぞれ酸と塩基の価数であり、 C_A と C_B はそれぞれ酸溶液と塩基溶液の濃度を示している。 F_B は V_c に比例するため ($F_B = kV_c$, k は比例定数), 式 2.3 は式 2.4 に変換できる。

$$\frac{1}{V_E} = \frac{n_B k C_B}{n_A F_T C_A} + \frac{k}{F_T} \quad (2.4)$$

したがって、 V_E の逆数は C_A の逆数または C_B に比例する。すなわち、 V_E を得ることができれば、一方を標準液として他方の濃度を求めることができる。

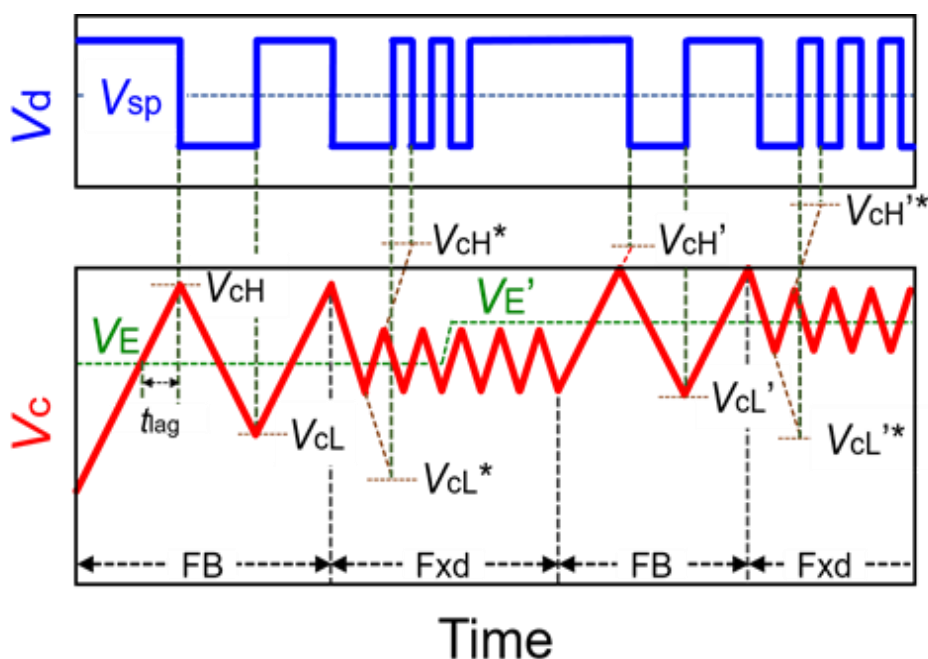


図 2.3 フィードバック／固定三角波制御フローレイショメトリーの原理
 FB, フィードバック制御モード; Fxd, 固定三角波制御モード; V_c , 制御電圧;
 V_d , 検出電圧; V_E , 合流点における当量点組成を与える V_c ;
 V_{cH} および V_{cL} , FB モードにおける V_c の極大値および極小値;
 V_{cH}^* および V_{cL}^* , Fxd モードにおける V_c の極大値および極小値;
 V_{sp} , 滴定終点とみなす設定値 V_d ; プライム (') 記号は試料濃度変化後の値を示す。

2.3 結果と考察

2.3.1 分析パラメータの最適化

迅速かつ高精度な測定のために、フィードバック制御 (FB) モードにおける V_c 走査速度 (dV_c/dt) を最適化した。同モードでは、1 滴定あたりに要する時間は基本的には t_{lag} (2.2.4 項参照) に依存する。しかし、試料濃度が変化するとき、新たな V_E を迅速に決定するためには、より速い V_c 走査速度が好ましい。その一方、 V_c 走査速度を高めると測定の分析精度は低下する可能性がある。そこで、測定の効率と精度に対する影響を dV_c/dt $0.1 \text{ V s}^{-1} - 0.4 \text{ V s}^{-1}$ の範囲で検討した。 0.1 mol dm^{-3} HCl を試料として、BTB 含有 0.1 mol dm^{-3} NaOH を標準液として用いた。その結果、 0.1 V s^{-1} , 0.2 V s^{-1} , 0.3 V s^{-1} , 0.4 V s^{-1} の走査速度において 1 滴定あたりに要する時間はそれぞれ $9.45 \text{ s titration}^{-1}$, $9.43 \text{ s titration}^{-1}$, $9.03 \text{ s titration}^{-1}$, $8.89 \text{ s titration}^{-1}$ となった。 V_E の相対標準偏差 RSD は V_c 走査速度 $0.1 \text{ V s}^{-1} - 0.2$

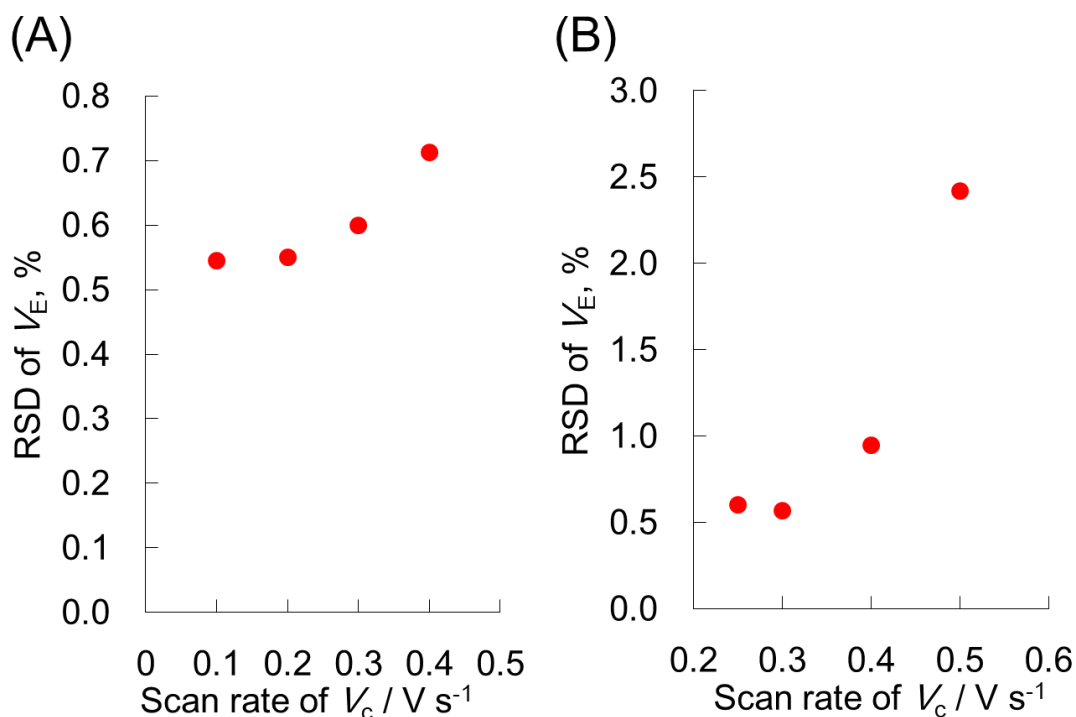


図 2.3 フィードバック制御 (A), 固定三角波制御 (B) における V_c 走査速度が精度に与える影響

A, B ともに試料は 0.1 mol dm^{-3} HCl, 標準液は 0.1 mol dm^{-3} NaOH であり, 固定三角波制御モードの V_c 走査範囲は直近のフィードバック制御モードの 50% とした。

$V s^{-1}$ の範囲で 0.55% 未満, これよりも高い V_c 走査速度では高い RSD ($> 0.60\%$) となった (図 2.3A)。そこで, FB モードの V_c 走査速度には $0.2 V s^{-1}$ を選択した。

固定三角波制御 (Fxd) モードにおいて, 測定効率は V_c 走査速度 (dV_c/dt) に比例するが, dV_c/dt が大きくなると精度が低くなる。 dV_c/dt が $0.3 V s^{-1}$, $0.4 V s^{-1}$, $0.5 V s^{-1}$ のときの V_E の RSD はそれぞれ 0.57%, 0.95%, 2.42% であった (図 2.3B, V_c 走査範囲は直近の FB モードの V_c 走査範囲の 50%)。測定効率と精度を考慮して, Fxd モードの V_c 走査速度には $0.4 V s^{-1}$ を選択した。また, 固定三角波制御モードの V_c 走査範囲は測定効率に反比例する。直近の FB モードの V_c 走査範囲の 50%, 40%, 30%, 20% を Fxd モードの V_c 走査範囲として検討した。1 滴定に要した時間は V_c 走査範囲 50%, 40%, 30% のときでそれぞれ, 2.34 s, 2.09 s, 1.39 s であった。測定効率はそれぞれ 25.6 titrations min^{-1} , 28.6 titrations min^{-1} , 43.1 titrations min^{-1} であった。 V_E の RSD はそれぞれ, 0.81%, 1.28%, 7.89% であった (図 2.4)。 V_c 走査範囲を 20% とした場合, 正確な V_E を得ることができなかった。 V_c 走査範囲が 30% のとき, 測定効率は最大 43.1 titrations min^{-1} であり, 過去の報告 (34.1 titrations min^{-1}) を上回った¹⁷⁻¹⁹。しかし, 精度を考慮して Fxd モードの V_c 走査範囲は主に 40% を基本とした。

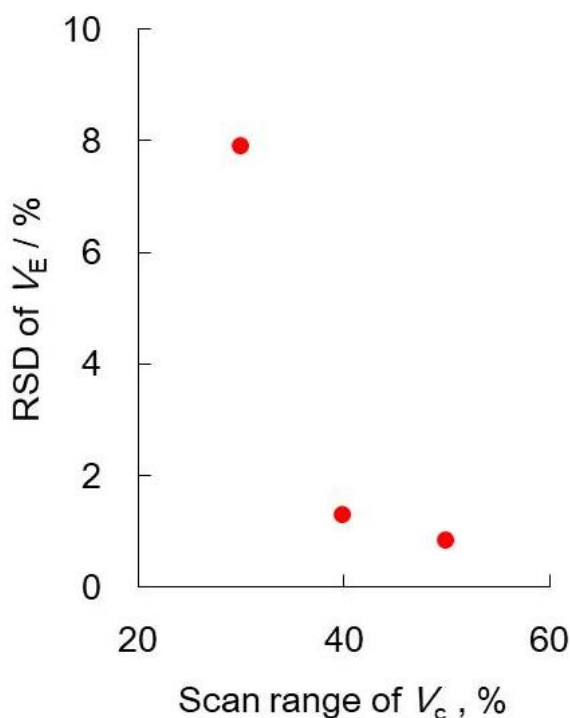


図 2.4 固定三角波制御において V_c 走査範囲が精度に与える影響
試料と標準液は図 2.3 と同様のものを用いた。

2.3.2 分析性能

図 2.5A は実試料の一例として米酢を 0.1 mol dm^{-3} NaOH (0.2 mmol dm^{-3} BTB 含有) で滴定したときのフローシグナルである。 V_d は電流増幅器による増幅に加えて、ソフトウェア上で5倍に増幅して記録し、図に示している。増幅率はExcelファイルの“parameter”シートで任意に設定できる。サンプリング周波数は 20 Hz , V_{sp} は 5.0 V に設定した。Fxd モードで1回の滴定に要した時間は 2.09 s で、滴定効率は $28.6 \text{ titrations min}^{-1}$ であった。米酢中の酢酸濃度は $796.7 \pm 4.3 \text{ mmol dm}^{-3}$ であった。図 2.5B は滴定曲線であり、 V_c が $1.18 \text{ V} - 3.52 \text{ V}$ の範囲にある外側のループと $1.80 \text{ V} - 2.64 \text{ V}$ の範囲にある内側のループは、それぞれ FB モードと Fxd モードで得られたデータに対応している。この結果から、 V_c の走査範囲、特に Fxd モードの走査範囲は当量点付近にのみ限定され、効率よく測定できていることがわかる。

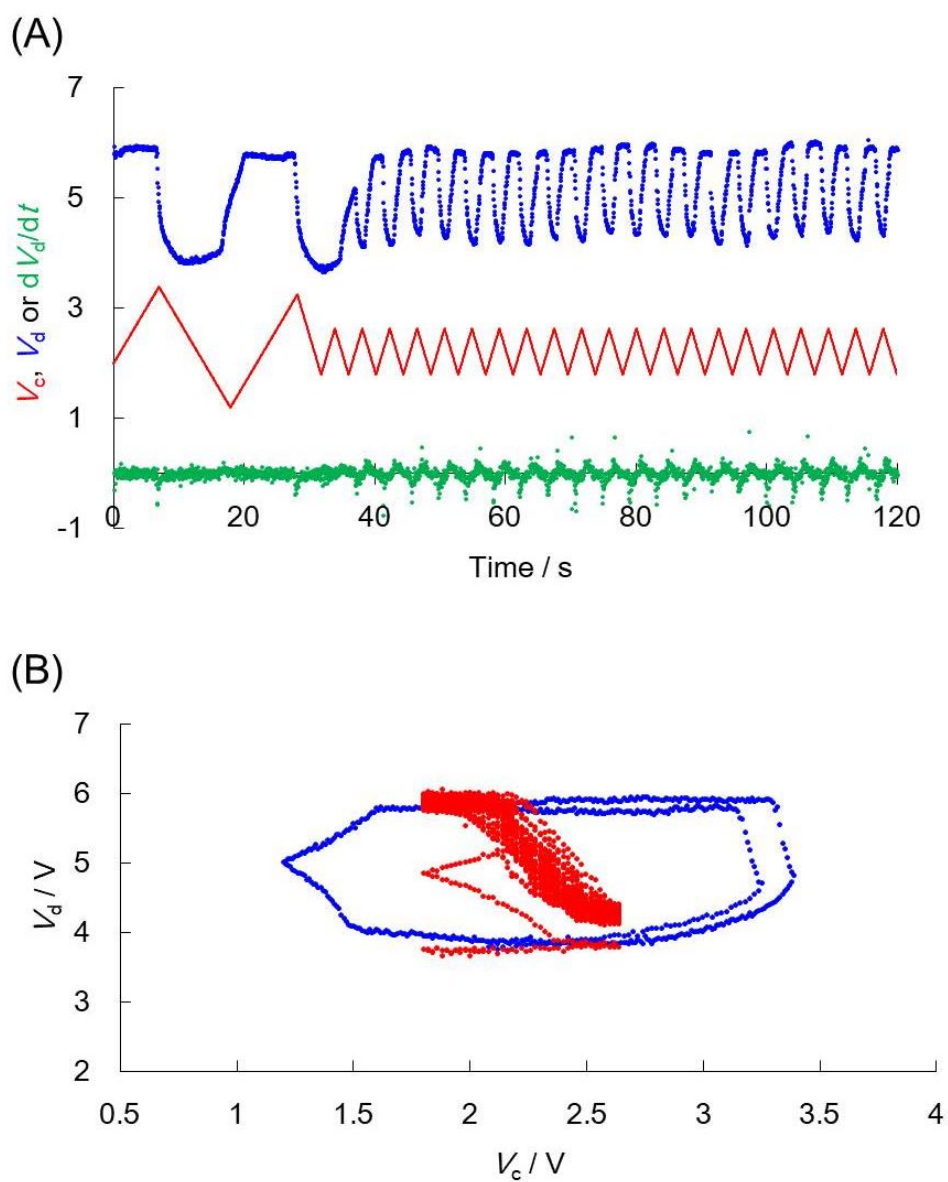


図 2.5 米酢を測定した際のシグナル例 (A) と滴定曲線 (B)
 標準液は $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ ($0.2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ BTB}$ 含有)。
 固定三角波制御モードの V_c 走査範囲は 40% である。

2.3.3 各種酸・塩基試料の検量線

多くの機器分析法が標準物質による検量線作成を必要とする相対分析法であるのに対し、本法は流量 F_T と F_B 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、原理的には絶対分析法となる。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溶液を用いて検量線を作成する方が容易であると考えられる。2.2.4 項の式 2.4 で示したように、 V_E の逆数は酸濃度の逆数および塩基濃度に比例する。この関係をもとに、一方を標準液とすることで、種々濃度の目的物質溶液を用いて検量線を作成できる。種々の酸 (HCl , CH_3COOH , H_3PO_4) あるいは塩基 (NaOH , NH_3 , Na_2CO_3) をそれぞれ NaOH と HCl で滴定し、検量線を作成した。酸塩基指示薬は、それぞれの電離定数、当量点での pH 、色調変化を考慮して選択した。

図 2.6 は 0.1 mol dm^{-3} HCl を標準液として $0.025 \text{ mol dm}^{-3}$ – 0.4 mol dm^{-3} NH_3 (BCG 含有) の滴定を行い、 NH_3 濃度と当量点組成を与える V_e (V_E) との関係について検討した結果である。横軸に NH_3 濃度、縦軸に V_E の逆数をプロットしたところ、決定係数 $r^2 = 0.9999$ の良好な直線性が得られた。その他の酸・塩基試料の検量線の結果を表 2.1 に示す。表

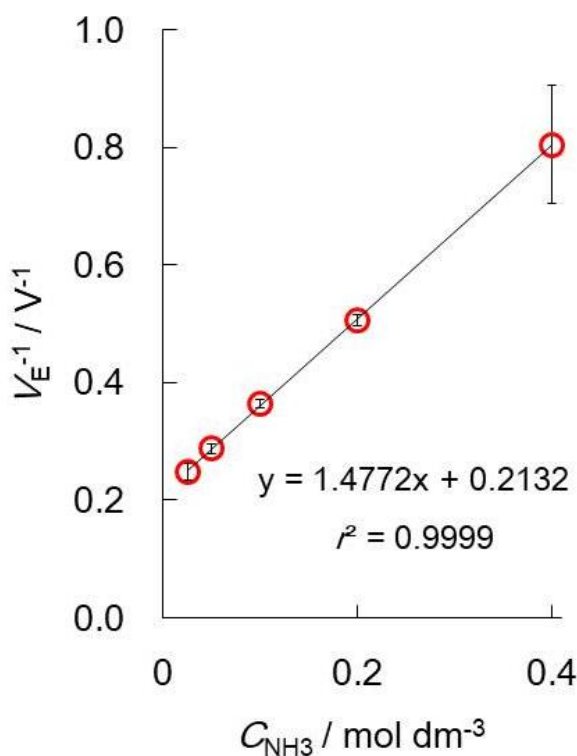


図 2.6 アンモニアの検量線

試料は $0.025 \text{ mol dm}^{-3}$, 0.05 mol dm^{-3} , 0.1 mol dm^{-3} , 0.2 mol dm^{-3} , 0.4 mol dm^{-3} NH_3 ,
標準液は 0.1 mol dm^{-3} HCl 。

の直線範囲の () 内の数字は測定した濃度の数を示している。直線範囲は標準液の濃度に依存しており (表 2.1, NaOH による HCl の滴定のデータを参照), より低濃度領域で直線検量線を得るためには, より低濃度の標準液が適する。右端の列に示すように, いずれの検量線も良好な直線性を示した ($r^2 > 0.993$)。

表 2.1 さまざまな酸・塩基試料の検量線

試料	標準液	指示薬 ^a	標準液の濃度 / mol dm ⁻³	直線範囲 / mol dm ⁻³	r^2
			0.01	0.008 – 0.070 (6)	0.9945
HCl	NaOH	BTB	0.05	0.030 – 0.400 (6)	0.9957
			0.1	0.075 – 0.800 (6)	0.9972
CH ₃ COOH	NaOH	TB	0.1	0.050 – 1.000 (6)	0.9980
H ₃ PO ₄ (1 st)	NaOH	BCG	0.1	0.075 – 1.000 (6)	0.9981
H ₃ PO ₄ (2 nd)	NaOH	TP	0.1	0.050 – 0.800 (6)	0.9987
NaOH	HCl	BTB	0.1	0.075 – 0.600 (5)	0.9935
NH ₃	HCl	BCG	0.1	0.025 – 0.400 (5)	0.9999
Na ₂ CO ₃ (1 st)	HCl	TB	0.1	0.050 – 0.150 (5)	0.9935
Na ₂ CO ₃ (2 nd)	HCl	BCG	0.1	0.010 – 0.200 (5)	0.9997

^a BTB, ブロモチモールブルー; TB, チモールブルー; BCG, ブロモクレゾールグリーン; TP, チモールフタレイン。

直線範囲の () 内の数字はプロット数を示す。

2.3.4 食酢分析への応用

食酢は料理の材料や調味料として身近な存在であることから、本法を市販の食酢試料の分析に応用した。開発されたフロー分析システムを評価するためのモデルサンプルとして、食酢がしばしば使用されてきた。例えば、Cardwell らによる光度検出法を用いたフロー分析²¹、Honorato らによる単相流解析²²、Moros らによる全反射減衰吸収法による赤外分光²³、Wójtowics らによる標準添加法を用いたフローインジェクション滴定²⁴が挙げられる。González-Rodrigues ら²⁵は、食酢中のエタノールと酢酸を連続的に測定するために、パーペーパレーション装置を導入した FIA システムを開発した。

表 2.2 は、本法で得られた食酢の酸度を CH_3COOH 濃度 (C_{AcOH}) で示した結果である。また、参考として従来の手操作による滴定²⁶で得られた C_{AcOH} も示した。本法の精度は手操作による滴定と比較してやや劣るものの、分析値は相対誤差 3%以内で一致した。手操作による滴定と比較して本法では、1 回に要する滴定時間、試料や試薬の消費量は大幅に削減された。手操作による滴定では、1 滴定に 5 min 以上を要し、試料は 10 cm^3 、標準液は 20 cm^3 を使用すると仮定すると、本法では、それぞれ、1/200, 1/500, 1/1300 程度にまで削減できる。わが国では、食酢の酸度測定は日本農林規格 (JAS) で厳密に規定されている²⁶。本法は製造工程において、規格に適合しない製品を迅速に検出するために有用である。

表 2.2 食酢の分析

試料	$C_{\text{AcOH}} / \text{mmol dm}^{-3}$	
	本法	公定法 (手滴定)
穀物酢	714.8 ± 12.3	716.3 ± 4.6
米酢	796.7 ± 4.3	778.7 ± 1.2
りんご酢	772.8 ± 10.2	765.0 ± 5.1

($n = 3$)

2.4 小括

自作の LED-PD 検出器を利用して、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滴定効率を向上させた。開発した分析システムを市販の食酢の分析に応用したところ、手操作による滴定と同程度の分析結果が得られた。ソフトウェアの改良により、流量比走査可能範囲が $0 - \infty$ になったが、検量線の直線範囲は以前の結果¹⁷⁻¹⁹と同程度であった。これは、試料溶液/標準液の流量比が 0 または ∞ に近づくとつれ、誤差が大きくなるためだと考えられる。次章では、本分析法の流路構成を見直し、さらなるハイスループット化を検討した。

第 3 章 超ハイスループット化および日本薬局方医薬品定量への応用

3.1 緒言

第2章では、自作のLED-PD検出器をフィードバック／固定三角波制御フローレイシヨメトリーに導入し、試料溶液と標準液の合流から検出に至るまでの遅れ時間 (t_{lag}) を短縮させることで最大 $43 \text{ titrations min}^{-1}$ というハイスループット滴定を実現した。本章では、さらなるハイスループット化を目指して、流路構成を再構築した。第2章で述べたように、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おける滴定効率率は、 t_{lag} に依存し、フィードバック制御モードでは、1 滴定に要する時間は $2t_{lag}$ となる。そこで本章の研究では、この t_{lag} を短縮するために、定流量ポンプを検出器の下流に配置することで両液の合流点から検出器までの流路を短縮し、滴定効率の向上を図った。構築した分析システムを日本薬局方収載医薬品をはじめ、さまざまな酸・塩基滴定 (非水滴定を含む) へと応用し、その有用性を検討した。

3.2 実験

3.2.1 試薬と試料

本研究で使用した試薬は、関東化学株式会社 (東京)、ナカライテスク (京都)、富士フィルム和光純薬工業 (大阪) から購入した分析試薬等級であり、さらなる精製をすることなく使用した。日本薬局方医薬品の 4% フロセミド細粒 (ラシックス®)、イソニアジド原末 (イスコチン®)、プロクロルペラジンマレイン酸 (ノバミン®) 錠は、それぞれ日医工株式会社、第一三共株式会社、協和薬品工業株式会社から購入し、それぞれ *N,N*-ジメチルホルムアミド、無水酢酸・酢酸混合液 (体積比 5:1)、酢酸に溶解した。なお、イソニアジド原末とプロクロルペラジンマレイン酸は、分析前にろ紙 (Advantec No.1) でろ過し、溶解しない賦形剤を除去した。水は逆浸透水を超純水製造装置 Sartorius Arium 611DI で脱イオン化した超純水を使用した。

3.2.2 フローシステム

図 3.1 に本研究で構築したフローシステムを示す。両液が合流してから下流の検出器で滴定終点の信号が得られるまでの遅れ時間 (t_{lag}) を短縮し、滴定効率を向上させるために、 P_2 をフローシステムの最下流に配置した。2 台のペリスタポンプ (P_1 : Rainin Dynamax RP-1, USA, P_2 : Gilson Minipuls 3, USA) を用いて溶液を送液した。ポンプチューブには、外径 3.68 mm, 内径 0.51 mm の Pharmed[®]チューブを使用した。その他の流路には、外径 1.59 mm, 内径 0.5 mm の PTFE チューブを使用した。ノートパソコン (PC; IBM ThinkPad 1843-BLJ, China) から A/D-D/A コンバータ (Measurement Computing PC-CARD-DAS16/12-AO, USA) を介して供給される制御電圧 (V_c) によって、酸塩基指示薬を含む塩基溶液の流量 (F_B) を変化させた。本研究開始後に上記の A/D-D/A コンバータが故障し、すでに製造中止で入手困難になっていたことから、以降の実験は新しいコンピュータ (Dell 45176/SDPPI/2016 5100, China) と A/D-D/A コンバータ (CONTEC USB I/O Terminal AIO-160802GY-USB, Japan) を用いて行った。総流量一定 ($1.80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) のもと、塩基溶液を P_1 ($0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} - 1.39 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) によって送液し、受動的に吸引された酸溶液と合流させた。定流量ポンプを検出器の下流に配した本システムでは、前章のようなペリスタポンプのローラーによる強制混合ができないので、両液を効率よく混合させるために、single bead string reactor (SBSR; 外径 2.0 mm, 内径 1.0 mm, 長さ 8.8 cm の PTFE チューブに直径 0.7 mm のガラスビーズを充填) を合流点のすぐ下流に設置した。SBSR ではチューブ内径の 60 – 80% の直径をもつビーズを充填すると、液抵抗を増大させることなく混合が促進されることが知られている²⁷。SBSR を使用しなかった場合、FIA 特有の層流が観察され、試料溶液と標準液の混合が不十分となった。混合溶液を自作 LED-PD 検出器 (2.2.2 項参照) 内のフローセル (外径 3.0 mm, 内径 1.0 mm の石英管) へと導入し、測定された透過光強度を電流増幅器 (Amp; 浜松ホトニクス, C9329, Japan) で増幅後、検出電圧 (V_d) として Microsoft Excel 形式で PC に取得した。

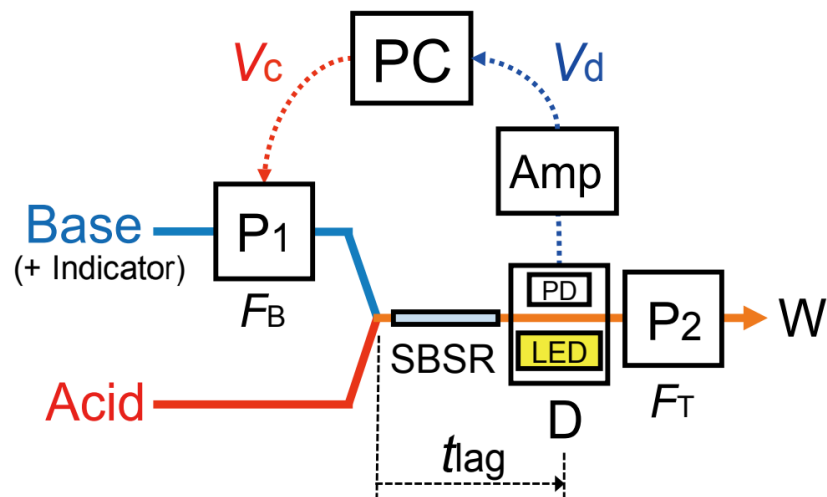


図 3.1 フローシステム

P₁ および P₂, ペリスタポンプ; SBSR, ガラスビーズ充填数珠型混合器;
 D, 検出器; PD, フォトダイオード; LED, 発光ダイオード; Amp, 電流増幅器;
 PC, ノートパソコン (A/D-D/A コンバータ設置); V_c, 制御電圧; V_d, 検出電圧;
 F_B, 塩基の流量; F_T, 総流量; t_{lag}, 遅れ時間; W, 廃液。

3.2.3 方法

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原理については、第2章で述べた通りである。Measurement Computing 社製の A/D-D/A コンバータ使用時はフローシステムの制御、計測、解析は、前章で開発した Excel VBA によるプログラムによって行った。CONTEC 社の A/D-D/A コンバータに変更してからは、Excel VBA で制御不可能であったため、Visual Basic .NET で新たにプログラムを作成した。いずれのプログラムにもフローセル内に誤って気泡が混入した場合の対策として、脱気除去のためのアルゴリズム^{28,29}を導入している。

3.3 結果と考察

3.3.1 分析パラメータの最適化

0.2 mmol dm⁻³ ブロモチモールブルー (BTB) 含有 0.1 mol dm⁻³ NaOH と 0.1 mol dm⁻³ HCl を用いて分析パラメータを検討した。第 2 章で述べた通り、フィードバック制御フローレイシヨメトリーでは、1 滴定に要する時間は 2 t_{lag} である³⁰。 t_{lag} は主に両溶液の合流点から下流の検出器に至るまでの時間と、わずかに検出器の応答時間に依存する。本章では、 V_c 走査速度 (dV_c/dt) 0.1 V s⁻¹, 0.2 V s⁻¹, 0.3 V s⁻¹, 0.4 V s⁻¹, 0.6 V s⁻¹ において滴定を行ったところ、滴定時間はそれぞれ 3.67 s titration⁻¹, 3.75 s titration⁻¹, 3.78 s titration⁻¹, 3.83 s titration⁻¹, 3.82 s titration⁻¹ であった。 V_c 走査速度が大きくなるにつれ、滴定時間が若干長くなったのは、 V_c 走査速度の増加に伴い、混合溶液の組成が当量組成を中心に大きく振動するようになり、検出器の応答が遅れたためと考えられる。得られた V_E 値は V_c 走査速度 0.6 V s⁻¹ を除いてほぼ一定であり、 V_c 走査速度 0.1 V s⁻¹, 0.2 V s⁻¹, 0.3 V s⁻¹, 0.4 V s⁻¹, 0.6 V s⁻¹ でそれぞれ 1.70 ± 0.06 V, 1.69 ± 0.05 V, 1.72 ± 0.07 V, 1.72 ± 0.06 V, 2.04 ± 0.07 V ($n = 50$) であった。したがって、フィードバック制御モードのための V_c 走査速度には 0.1 V s⁻¹ を選択した。

次に固定三角波制御フローレイシヨメトリーの V_c 走査速度と走査範囲を検討した。このモードでは、1 回の滴定に必要な時間は V_c 走査速度に反比例し、 V_c 走査範囲に比例する^{31,32}。フィードバック制御モードの直近の V_c 走査範囲の 50% および 40% を固定三角波制御モードの V_c 走査範囲 (中心: V_E) としたところ、 V_c 走査速度 0.2 V s⁻¹ において 1 滴定に要する時間はそれぞれ 1.69 s および 1.44 s であった。しかし、 V_E の RSD は走査範囲の減少に伴い 0.75% から 1.10% ($n = 50$) へと増大した。そこで、精度を考慮し、固定三角波制御フローレイシヨメトリーの走査範囲は 50% とした。本モードにおける V_c 走査速度を 0.1 V s⁻¹, 0.15 V s⁻¹, 0.2 V s⁻¹, 0.25 V s⁻¹, 0.3 V s⁻¹ で検討した。1 滴定に要した時間はそれぞれ 3.15 s titration⁻¹, 1.76 s titration⁻¹, 1.59 s titration⁻¹, 1.28 s titration⁻¹, 1.20 s titration⁻¹ であり、走査速度の増加に伴い、滴定効率は向上した。また、 V_E 値はそれぞれ 2.40 V, 2.41 V, 2.37 V, 2.39 V, 2.40 V であり、ほぼ一定であったが、RSD は走査速度の増加とともに増加した (それぞれ 0.69%, 1.18%, 1.38%, 1.79%, 3.51%)。 V_c 走査速度 0.3 V s⁻¹ では 50.0 titrations min⁻¹ と高効率であったが、滴定効率と精度の両方を考慮して 0.25 V s⁻¹ を最適な V_c 走査速度とした。これら最適条件のもとでの滴定速度は 46.9 titrations min⁻¹ であった。この効率は第 2 章の滴定効率 43 titrations min⁻¹ を上回っており、前例のないハイスループット滴定を実現した。

3.3.2 試料濃度変化への対応

本プログラムでは、測定中に試料溶液の濃度が変化しても、 V_c の走査範囲が V_E をカバーしていれば、固定三角波制御モードは保持される。しかし、試料濃度が大きく変化し、 V_E が V_c の走査範囲外に逸脱した場合、固定三角波制御モードでは滴定終点を判定できないので、再びフィードバック制御モードに移行するようにプログラムした。この機能を検証するために、試料溶液として、順次、 0.1 mol dm^{-3} 、 0.05 mol dm^{-3} 、そして再び 0.1 mol dm^{-3} NaOHを導入した。その結果を図 3.2 に示す。はじめのフィードバック制御モードは、49.15 s で固定三角波制御モードに移行した。試料溶液を 0.1 mol dm^{-3} から 0.05 mol dm^{-3} に変化させると、 V_c 走査範囲が新しい当量点 (すなわち新しい V_E) をカバーすることができなかった。3 周期 (= 6 走査範囲 [V] / 走査速度 [V s^{-1}]) の V_c 走査の間に滴定終点信号 V_d (V_{sp}) を検出できなかったため、再度 105.25 s にフィードバック制御が開始され、その後 147.65 s で固定三角波制御に移行した。また、 0.1 mol dm^{-3} NaOH では、209.60 s と 246.60 s にそれぞれフィードバック制御と固定三角波制御が適用された。図 3.2A の結果は、本システムが試料溶液の濃度変化に十分追従できることを示している。 0.1 mol dm^{-3} NaOH の 1 回目および 2 回目の導入時の V_E 値はそれぞれ $3.22 \pm 0.05 \text{ V}$ ($n = 26$, $t = 20.5 \text{ s} - 93.8 \text{ s}$) および $3.26 \pm 0.11 \text{ V}$ ($n = 31$, $t = 227.0 \text{ s} - 298.2 \text{ s}$) であり、再現性があることが確認された。なお、 0.1 mol dm^{-3} NaOH を標準液として 0.1 mol dm^{-3} 、 0.3 mol dm^{-3} 、 0.1 mol dm^{-3} HCl を連続的に滴定した場合も同様に良好な結果が得られた。図 3.2B は、0 s – 200 s 間の V_c と V_d の関係を示したもので、標準液の流量は V_c に比例するため、従来のバッチ滴定における滴定曲線に相当する。 t_{lag} のため、滴定曲線はループ状になっている³⁰。各 NaOH 濃度において、時計回りの大きいループ (緑点および青点) はフィードバック制御モード、反時計回りの小さいループ (紫点および赤点) は三角波固定制御モードで得られたデータに対応している。 V_c の走査範囲が狭いことは、本システムが高効率な滴定を実行できることを示している。

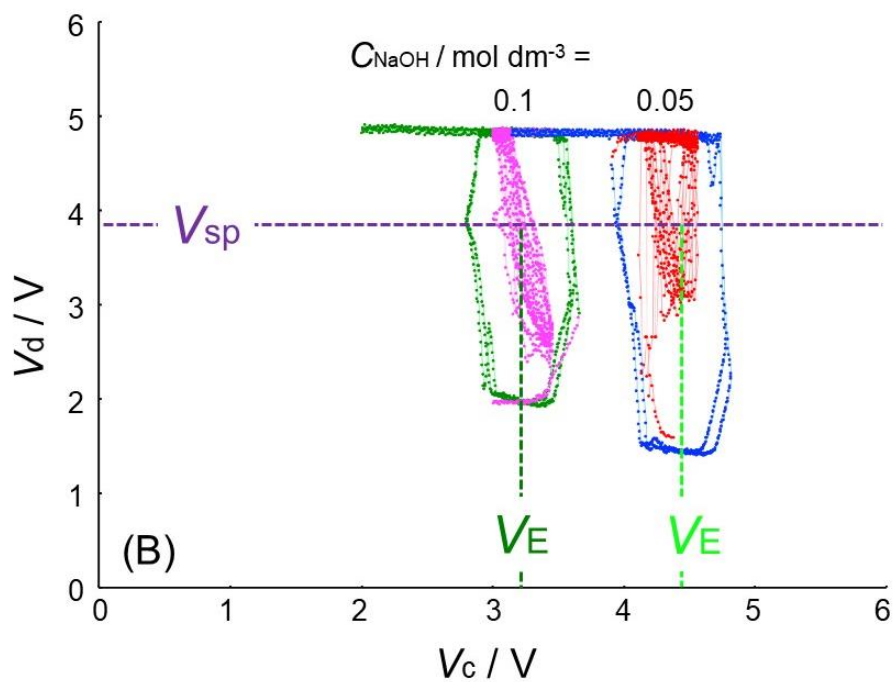
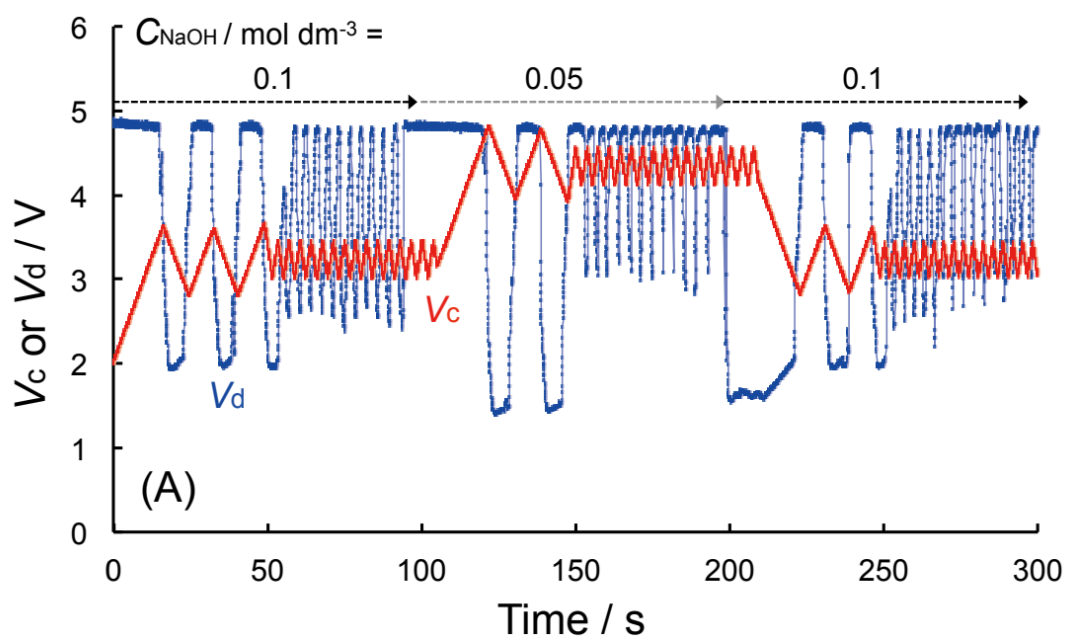


図 3.2 濃度変化をさせた連続滴定によるシグナル例

(A) V_c と V_d の経時変化, (B) 滴定曲線。

標準液: $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$,

試料溶液: NaOH (経時的に 0.1 mol dm^{-3} , 0.05 mol dm^{-3} , 0.1 mol dm^{-3} へと変化させた)

3.3.3 日本薬局方医薬品を含む各種酸・塩基滴定への適用

本システムを第 18 改正日本薬局方収載医薬品の非水滴定を含むさまざまな酸・塩基滴定に適用した。標準液、滴定試料にかかわらず、図 3.1 の Acid と Base で示されたチャンネルから酸溶液と塩基溶液を供給した。 V_c 走査速度や走査範囲などの分析パラメータは 3.3.1 項で述べたものと同様である。試料溶液、標準液、指示薬の組み合わせによって、滴定終点信号となる V_d 値 (V_{sp} , 1.4 – 3.5 V) を個別に決定した。2.3.3 項でも述べたように、フローレイショメトリーは流量が正確に校正されている限り、原理的には絶対分析法である。しかし、流量校正を測定日ごとに行うのは煩雑であり、現実的とはいえない。そこで、絶対検量線法を採用し、式 2.4 に基づき、 V_E の逆数を酸濃度の逆数または塩基濃度に対してプロットした³⁰。その結果を表 3.1 に示す。フロセミドおよびプロクロルペラジンマレイン酸については、製剤中の含有量が非常に少ない (それぞれ 4% 細粒, 5 mg tablet¹) ため、低濃度域での滴定を検討した。フロセミドの滴定では、非水系滴定液中の溶存空気が水系滴定液と混合されて飽和したためか、配管内に気泡が少し発生した (CO_2 については、*N,N*-ジメチルホルムアミドと水の混合液における Henry 定数が文献³³で報告されている)。しかし、ソフトウェアによる脱気原理^{28,29}を用いたプログラムにより、気泡信号を完全に除去することができた。プロクロルペラジンマレイン酸は感光性であるため、アルミホイルで外光を遮蔽して滴定した。検量線の直線性は、検討したすべての医薬品と酸・塩基試料の滴定で良好 ($r^2 > 0.995$) だった。

表 3.1 さまざまな酸・塩基滴定への応用

試料	標準液	指示薬 ^a	標準液の濃度 / mol dm ⁻³	直線範囲 / mol dm ⁻³	<i>r</i> ²
HCl	NaOH	BTB	0.1	0.04 – 1.0	0.999
CH ₃ COOH	NaOH	TB	0.1	0.03 – 1.0	0.999
H ₃ PO ₄ ^{1st}	NaOH	BCG	0.1	0.04 – 0.8	0.995
H ₃ PO ₄ ^{2nd}	NaOH	TP	0.1	0.05 – 0.8	0.998
NaOH	HCl	BTB ^d	0.1	0.03 – 0.6	0.999
NH ₃	HCl	BCG ^d	0.1	0.03 – 0.6	0.999
Na ₂ CO ₃ ^{1st}	HCl	TB ^d	0.1	0.03 – 0.4	0.996
フロセミド ^b	NaOH	BTB	0.01	0.001 – 0.01	0.999
イソニアジド ^b	HClO ₄ ^c	PNB	0.1	0.05 – 0.2	0.999
プロクロルペラ ジンマレイン酸 ^b	HClO ₄	PNB	0.001	0.0001 – 0.0008	0.997

^a BTB, プロモチモールブルー; TB, チモールブルー; BCG, プロモクレゾールグリーン; TP, チモールフタレイン; PNB, *p*-ナフトールベンゼイン。

^b 第 18 改正日本薬局方収載医薬品。

^c 溶媒は CH₃COOH。

^d 指示薬は塩基溶液 (すなわち試料溶液) に添加した。

3.4 小括

本章では、第 2 章のフローシステムの定流量ポンプの配置を変更することによって、遅れ時間 (t_{lag}) を短縮することで、滴定効率の向上を図った。第 2 章では検出器前にペリスタポンプがあり、ポンプローラーによって溶液が効率よく混合された。しかし、本章のフローシステムではポンプによる混合が期待できないため、SBSR を導入した。各種分析パラメータの最適化を行い、日本薬局方収載医薬品や種々の酸・塩基の滴定を行ったところ、第 2 章を上回る 46.9 titrations min⁻¹ (1 滴定あたりわずか 1.28 s) という超ハイスループット滴定を実現した。いずれの検量線の直線性 ($r^2 > 0.995$) も良好で、直線範囲も十分であった。本法では、LED-PD 検出器を用いているため、指示薬の色調に応じて LED を交換する必要がある。次章では、汎用性を向上させるためにデジタルマイクロスコープを検出器として利用した分析法の開発について述べる。

第4章 RGB 単位ベクトル間の内積を利用した滴定 終点検出法の開発

4.1 緒言

デジタルカメラやスマートフォンの普及に伴い、これらの汎用撮影デバイスを利用した検出法に関する報告³⁴⁻³⁶が近年増加している。初期の報告として、プラスチックフィルムやペーパーオプトードによる Li^+ 検出³⁷、発色試薬を用いた Al^{3+} や Fe^{3+} の測定³⁸ などがある。近年では、フロー分析への応用³⁹、点滴分析法⁴⁰、フォトニックゲル検出⁴¹、ペーパーデバイス検出⁴²⁻⁴⁴ など多様な研究がなされている。Soda と Bakker⁴⁵ は、画像処理に基づいた吸光度と分光測定による吸光度との関係について論じた。また、Araújo ら⁴⁶⁻⁵¹ はデジタル画像を用いた測色法を初めて滴定へと応用した。フロー分析法とバッチ分析法を融合させたデジタル画像に基づく滴定法^{52,53} では、RGB 値や色相値を用いて指示薬の色調変化をモニターし、滴定終点を検出している。これらの方法では、指示薬ごとに適切な測色値 (R, G, B 値または色相値) を選択する必要がある。

本章では、指示薬の色調変化を RGB 単位ベクトルの内積によって判定する新たな方法⁵⁴を提案する。デジタルマイクロスコープで得られるカラー画像を RGB 単位ベクトルで表現し、滴定前と滴定中の画像それぞれの単位ベクトルの内積をもとに指示薬の色調変化を判定した。両者の色調が同じである場合は内積 = 1、異なる場合は内積 < 1 となるので、内積の値の急激な変化から滴定終点を判定することができる。この原理の妥当性を、固定三角波制御フローレイシヨメトリーに応用することにより評価した。

4.2 実験

4.2.1 試薬と試料

ブロモクレゾールグリーン (BCG), 2 mol dm^{-3} HCl, 2 mol dm^{-3} NaOH, 1 mol dm^{-3} H_3PO_4 , 25% NH_3 , 1 mol dm^{-3} CH_3COOH は関東化学株式会社 (東京) から購入した。ブロモチモールブルー (BTB), チモールブルー (TB), チモールフタレイン (TP) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。本章の研究で使用した試薬は分析試薬等級であり, さらなる精製をすることなく使用した。水は逆浸透水を超純水製造装置 Sartorius Arium 611DI で脱イオン化した超純水を使用した。

4.2.2 デジタルマイクロスコープ検出器

図 4.1 は自作した検出器の写真である。10 個の白色 LED を搭載したデジタルマイクロスコープ, 内径 1 mm の石英フローセル, 3 個の白色 LED 装置を黒色のプラスチックボックスの中に取り付けた。製作した検出器を後述の図 4.4 に示すフローシステムに配置した。検出器で得られた画像データ (図 4.2) を, OpenCV ライブラリ (ver. 2.4.13) を用いて PC に取得した。サンプリング周波数は 10 Hz とした。画像の指定領域 (6×6 pixels) の各ピクセルの色調を, 三刺激値 (R, G, B 値) で表現し, 計 36 pixels の R, G, B 値それぞれの平均値を算出した。試料や標準液の変更を除くすべての操作は Visual Basic .NET で開発した自作プログラムによって自動化した。

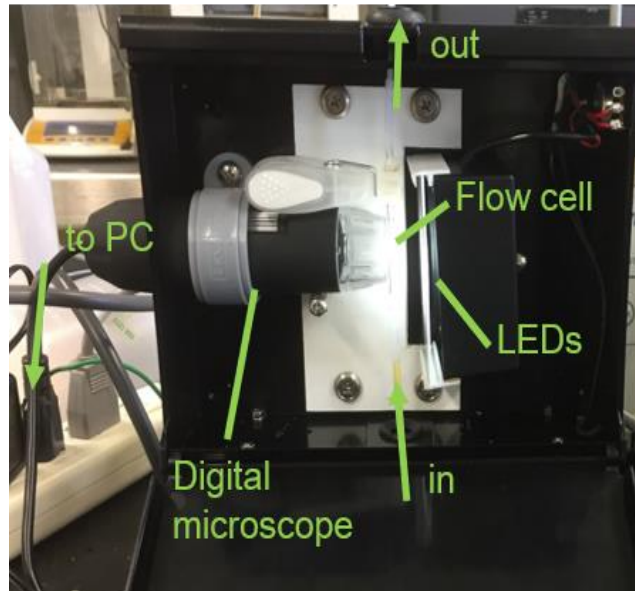


図 4.1 デジタルマイクロスコープを用いた検出器

Digital microscope: YPC-X02 デジタルマイクロスコープ (640 × 480 pixels, UMTELE Co., China)。

黒いプラスチックボックスのサイズ: 18.0 (W) × 5.5 (D) × 14.3 (H) cm。

デジタルマイクロスコープのレンズ周辺に配置された 10 個の白色 LED とフローセル後方 (デジタルマイクロスコープから見てフローセルの反対側) に配置された 3 個の白色 LED によってフローセルを照らした。溶液中に気泡が混入してもフローセル内からただちに排出されやすいように、溶液がセル内を上向きに流れるようにした。

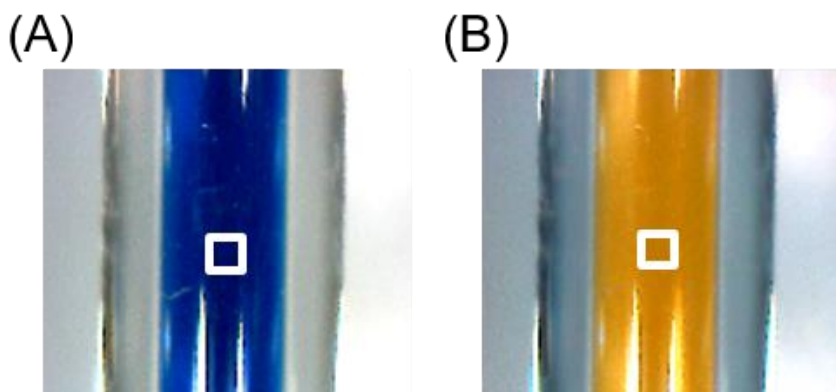


図 4.2 (A) 塩基性, (B) 酸性におけるプロモチモールブルーの色調
白線で囲まれた範囲 (6 × 6 pixels) について RGB 値を取得した。

4.2.3 測定用プログラム

Visual Basic .NET (開発環境: Microsoft Visual Studio) を使用して作成したソフトウェアで、システムの制御・データ取得・解析・結果の表示を行った。グラフィカルユーザーインターフェース (GUI) には Windows Forms を利用した。プログラムは、主に GUI を扱う Main Form, データ取得とシステム制御を行う DataCollector, A/D-D/A コンバータとのインターフェースを担う ContecADDAConvertor の 4 つのクラスから構成される。プログラムの Main Form 画面を図 4.3 に示す。本プログラムでは測定中においても、計測データ (制御電圧や RGB 値, 内積値, 色相値等) を選択・変更することができる。さらに、測定中に計算結果や計測時間をリアルタイム表示するようにプログラムされている。

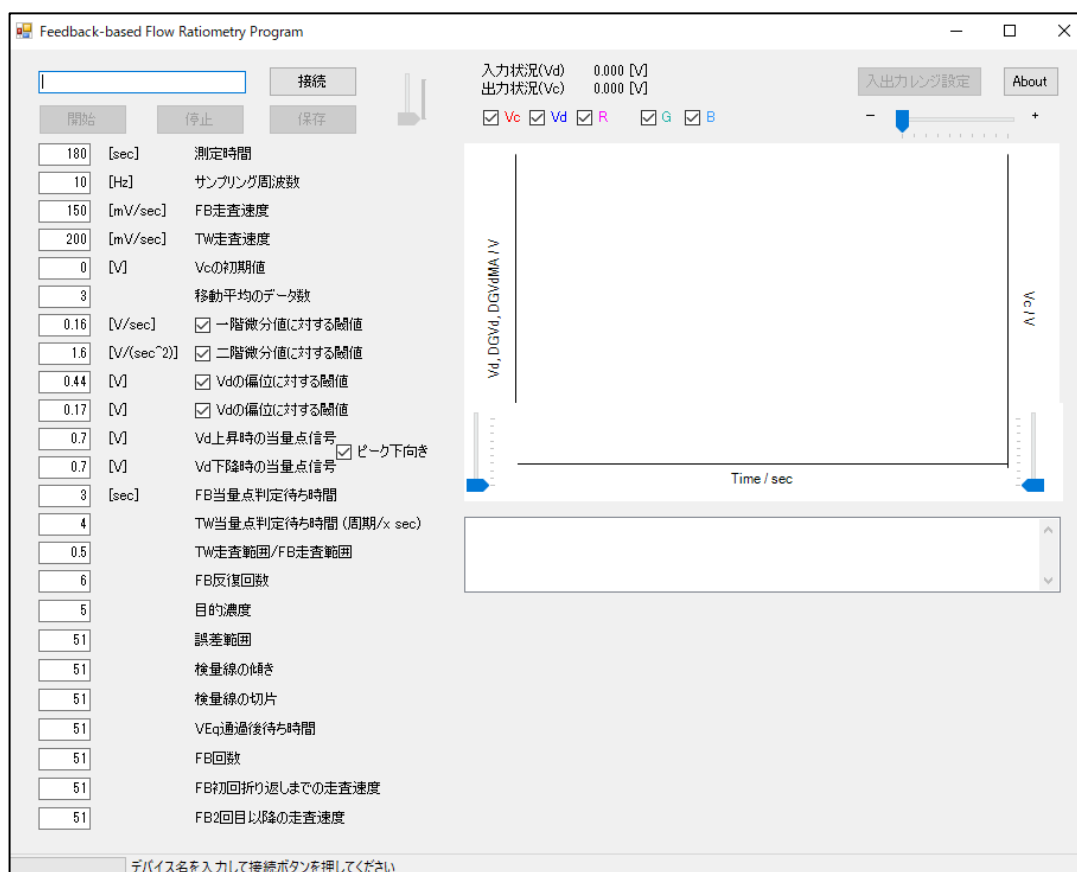


図 4.3 開発したプログラムの Main Form

4.2.4 フローシステム

本章の研究で構築したフローシステムを図4.4に示す。流路構成は、第2章(図2.1)で示したフローシステムと基本的に同じであるが、検出器には前項で述べたデジタルマイクروسコープ検出器、A/D-D/Aコンバータには3章で述べたCONTEC社の製品を使用した。試料溶液を P_1 から送液した。標準液は流量 $F_A (= F_T - F_B)$ で受動的に吸引された。フローシステムの配管には、ポンプチューブ(外径3.68 mm, 内径0.51 mmのPharmed[®]チューブ)を除いてPTFEチューブ(外径1.59 mm, 内径0.5 mm)を使用した。 P_2 ポンプのローラーによって溶液の混合が促進されるため、混合反応器は使用しなかった。

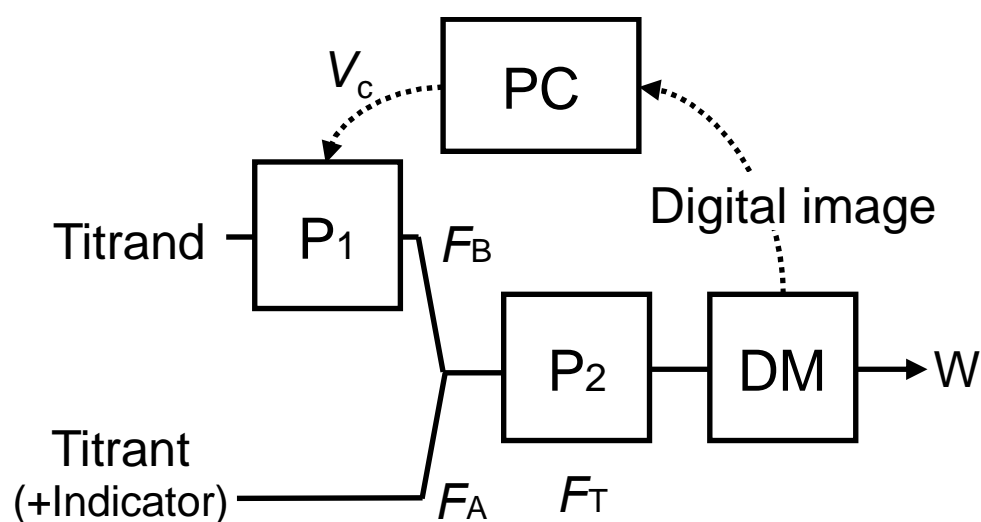


図 4.4 フローシステム

P_1 および P_2 , ペリスタポンプ (GILSON, Minipuls 3, MP-2, USA); DM, デジタルマイクروسコープ検出器; PC, ノートパソコン (Hewlett Packard, HP-ProBesk 430 G3, USA) (A/D-D/A コンバータ付属); V_c , 制御電圧; W, 廃液。

F_B ($0 - 1.15 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$), F_A ($F_T - F_B$), F_T ($1.20 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) はそれぞれ試料溶液の流量, 標準液の流量, 総流量を示す。

4.2.5 固定三角波制御フローレイシヨメトリーの原理

固定三角波制御フローレイシヨメトリーによる滴定原理を図 4.5 に示す。総流量 F_T 一定のもと、試料溶液をコンピュータからの制御電圧 V_c に比例した流量 F_B で送液することで、指示薬含有の標準液は $F_T - F_B$ の流量で受動的に吸引される。 V_c を $0 - 5\text{ V}$ で制御しているため、試料溶液と標準液の流量比は $0:1 - 1:0$ を往復する。両液は合流後に一定の遅れ時間 t_{lag} を経て、下流のデジタルマイクロスコープ検出器へと到達する。検出器内のフローセルを流れる混合液を動画で撮影し、そのデータをコンピュータに取得する。指定領域の画像の RGB 値を求め、RGB 単位ベクトルへと変換する。最初の単位ベクトルと i 番目の単位ベクトルの内積 IP を算出し、その内積値をもとに滴定終点を判定する。滴定終점에相当する内積 IP_{sp} が得られた瞬間の V_c 値 (V_L および V_H) から当量点組成をあたえる V_c (V_E) を算出し、検量線から試料溶液濃度 C_B を計算する (詳細は 2.2.4 項を参照)。

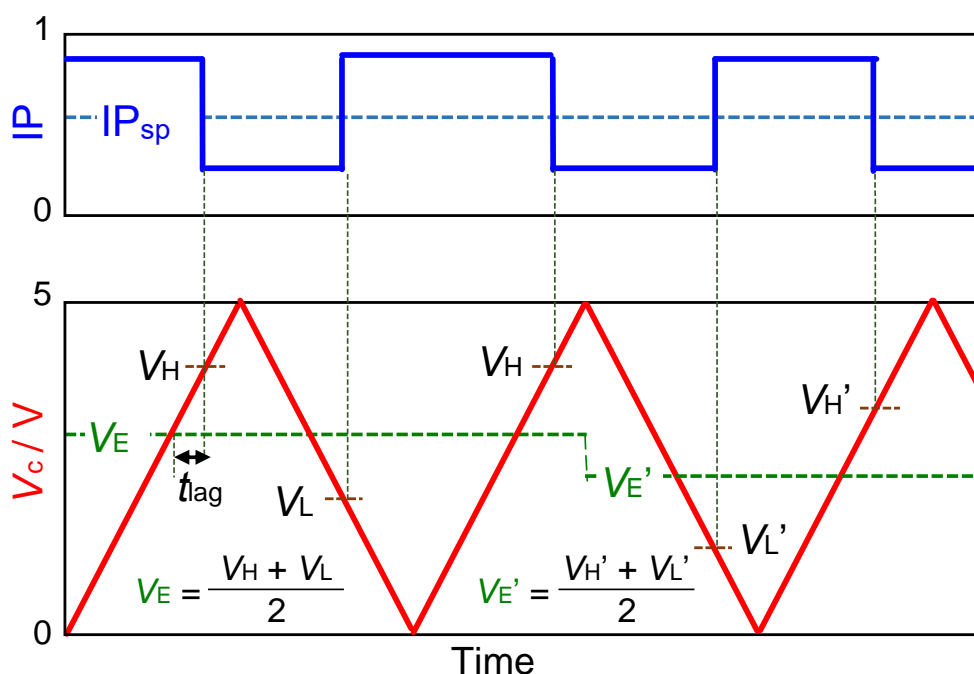


図 4.5 固定三角波制御フローレイシヨメトリーの原理

V_c , 制御電圧; IP , 1 枚目の画像と i 番目の画像から得られる 2 つの RGB 単位ベクトル間の内積; V_E , 合流点での当量点組成を与える V_c ; V_H および V_L , それぞれ V_c 上昇および下降時において滴定終点シグナルが得られた瞬間の V_c 値; IP_{sp} , 滴定終点とみなす IP 。
プライム (') は試料濃度変更後の各値を示す。

4.2.6 RGB 値を利用した内積

画像データから得た RGB 値を単位ベクトル \vec{v}_i 変換した。

$$\vec{v}_i = (r_i, g_i, b_i), \quad (4.1)$$

ここで, r_i, g_i, b_i はそれぞれ式 4.2, 式 4.3, 式 4.4 で表わされ, $r_i^2 + g_i^2 + b_i^2 = 1$ を満たす。

$$r_i = \frac{R_i}{\sqrt{R_i^2 + G_i^2 + B_i^2}}, \quad (4.2)$$

$$g_i = \frac{G_i}{\sqrt{R_i^2 + G_i^2 + B_i^2}}, \quad (4.3)$$

$$b_i = \frac{B_i}{\sqrt{R_i^2 + G_i^2 + B_i^2}}, \quad (4.4)$$

R_i, G_i, B_i は i 番目の画像の三刺激値を示す。 \vec{v}_i の終点は半径 1 の球面上にある。図 4.6A は, r, g, b を軸とした三次元直交座標色空間において, \vec{v}_i が表現する色を示す。

1 枚目と i 枚目の画像の単位ベクトル (\vec{v}_1 と \vec{v}_i) の内積は式 4.5 で算出される。

$$\begin{aligned} IP_i &= \vec{v}_1 \cdot \vec{v}_i = |\vec{v}_1| |\vec{v}_i| \cos \theta = \cos \theta \\ &= r_1 r_i + g_1 g_i + b_1 b_i, \end{aligned} \quad (4.5)$$

$|\vec{v}_1|, |\vec{v}_i|, \theta$ はそれぞれ $|\vec{v}_1|, |\vec{v}_i|$ の大きさと 2 ベクトル間の角度を示している。2 つのベクトルは単位ベクトルであるため, 大きさはいずれも 1 である。 IP_i は色調が完全に同一 (すなわち $\vec{v}_1 = \vec{v}_i$) であれば 1 となり, 色が異なれば 1 よりも低い値をとる。図 4.6B にベクトル例を示す。ベクトル A, B, C の座標はそれぞれ (0, 0.303, 0.953), (0, 0.537, 0.843), (0.780, 0.569, 0.262) である。近い方向を示すベクトル A とベクトル B の内積 IP は 0.967 という高い値である。一方で, 異なる方向を示すベクトル A とベクトル C の IP は 0.423 と低い値である。また, ベクトル B とベクトル C の IP も 0.526 と低い値となっている。したがって, IP の急激な変化を指示薬の色調変化を検出するための指標として用いることができる。

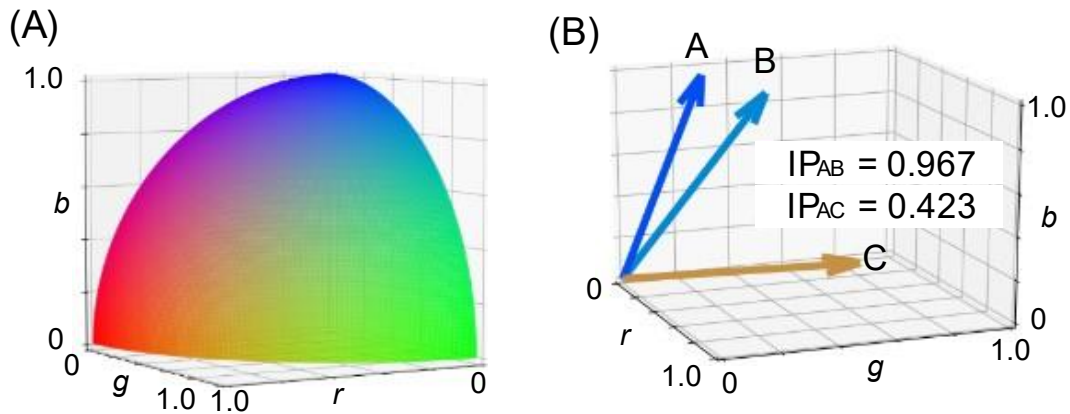


図 4.6 (A) 三次元の色空間, (B) A: 青色, B: 水色, C: 橙色の 3 種類のベクトル。矢印の色は画像の色に対応する。

4.2.7 色相値 (H) の算出

画像データから得た RGB 値を, 表 4.1 に示す式によって色相値 (H) へと変換した。H は色調変化の指標の一つとして用いた。

表 4.1 RGB 値から色相値を算出するための計算式⁵⁵

$$H_i = \begin{cases} \text{atan2}(\beta_i, \alpha_i) \frac{180}{\pi} & \text{atan2}(\beta_i, \alpha_i) \geq 0 \\ \text{atan2}(\beta_i, \alpha_i) \frac{180}{\pi} + 360 & \text{atan2}(\beta_i, \alpha_i) < 0 \end{cases} \quad (4.6)$$

$$\alpha_i = \frac{2R_i - G_i - B_i}{2} \quad (4.7)$$

$$\beta_i = \frac{\sqrt{3}(G_i - B_i)}{2} \quad (4.8)$$

R_i, G_i, B_i は選択された領域の画像の R, G, B 値それぞれの平均値であり, $i (= 1, 2, 3, \dots, n)$ は撮影画像の枚数である。

4.3 結果と考察

4.3.1 RGB単位ベクトル間の内積に基づく終点検出法によるフローシグナル例

0.1 mol dm⁻³ HCl を 2.0 mmol dm⁻³ BTB 含有 0.1 mol dm⁻³ NaOH で滴定したときの V_c , RGB, H, IP の経時的变化を図 4.7 に示す。 V_c は 0.15 V s⁻¹ の走査速度で 0 – 5 V の範囲で制御した (図 4.7A)。試料溶液/標準液の流量比が V_c に比例して増大すると、混合溶液は塩基性から酸性に変化し、それに伴い指示薬の色調は青色から緑色を経て黄色に変化した。

RGB 表色系の三刺激値 (R, G, B) は、8 ビットで 0 – 255 の値をとることができる。混合溶液が青色から黄色に変化したとき (28.4 s と 94.9 s), R 値と G 値は増加したが、 B 値は大きく減少した (図 4.7B)。再び、指示薬の色調が黄色から青色に変化すると (62.0 s と 128.8 s), R, G, B 値は元の値にもどった。三刺激値の中で最も顕著な変化を示したのは R 値であったが、どの三刺激値が最適であるかは、使用する指示薬の種類によって異なる。

三刺激値から表 4.1 の式 4.6 を用いて算出した色相 (H) 値は、0 – 360 をとり得る。H 値は指示薬の色調変化に応じて、225 (青色) から 35 (黄色) に変化した (図 4.7C)。RGB 値と同様に H 値も指示薬によって変化量や方向性は異なる。例えば、非水滴定の指示薬として使用される *p*-ナフトールベンゼイン (酸性: 緑色, 塩基性: 橙色) では、H 値の変化量は 90 (120 から 30) であった。また、H 値は $R = G = B$ で定義されていない⁵⁵、色の彩度や明度に関する情報がないなどの欠点がある。

原理的には IP は 1 から 0 の範囲で変化する。しかし、IP = 0 となるには両方のベクトルが直交する (例えば一方が r 軸上にあり、もう一方が gb 平面にある) 必要があり、IP = 0 となるのはまれである。本システムでは、図 4.7D に示すように、IP は 1 から 0.22 まで減少した。IP の顕著な変化点は上述の RGB, H 値の変化点と一致した。43 s と 111 s にピークを持つ 2 つの三角形状 (27.8 s から 59.1 s, 94.5 s から 125.8 s) はいずれも指示薬の濃度が低下したことが要因と考えられる。これは、指示薬含有の標準液の流量が、当量点以降でも V_c 走査方向が反転されるまで減少し続けるためである。さまざまな指示薬を用いて酸・塩基滴定を検討した結果、いずれの指示薬においても色調変化の検出に最適な IP 値 (IP_{sp}) は 0.70 であった。IP の最大値と最小値 (それぞれ 1 と 0.22) の平均値 (0.61) は、上で述べた滴定終点以降の三角形状の IP ピークを下回る可能性があるため適切ではない。なお、($i - 1$) 番目の画像と i 番目の画像の RGB 単位ベクトル間の内積 IP も、滴定終点の検出に利用することができる。この IP の経時的变化を図 4.8 に示す。

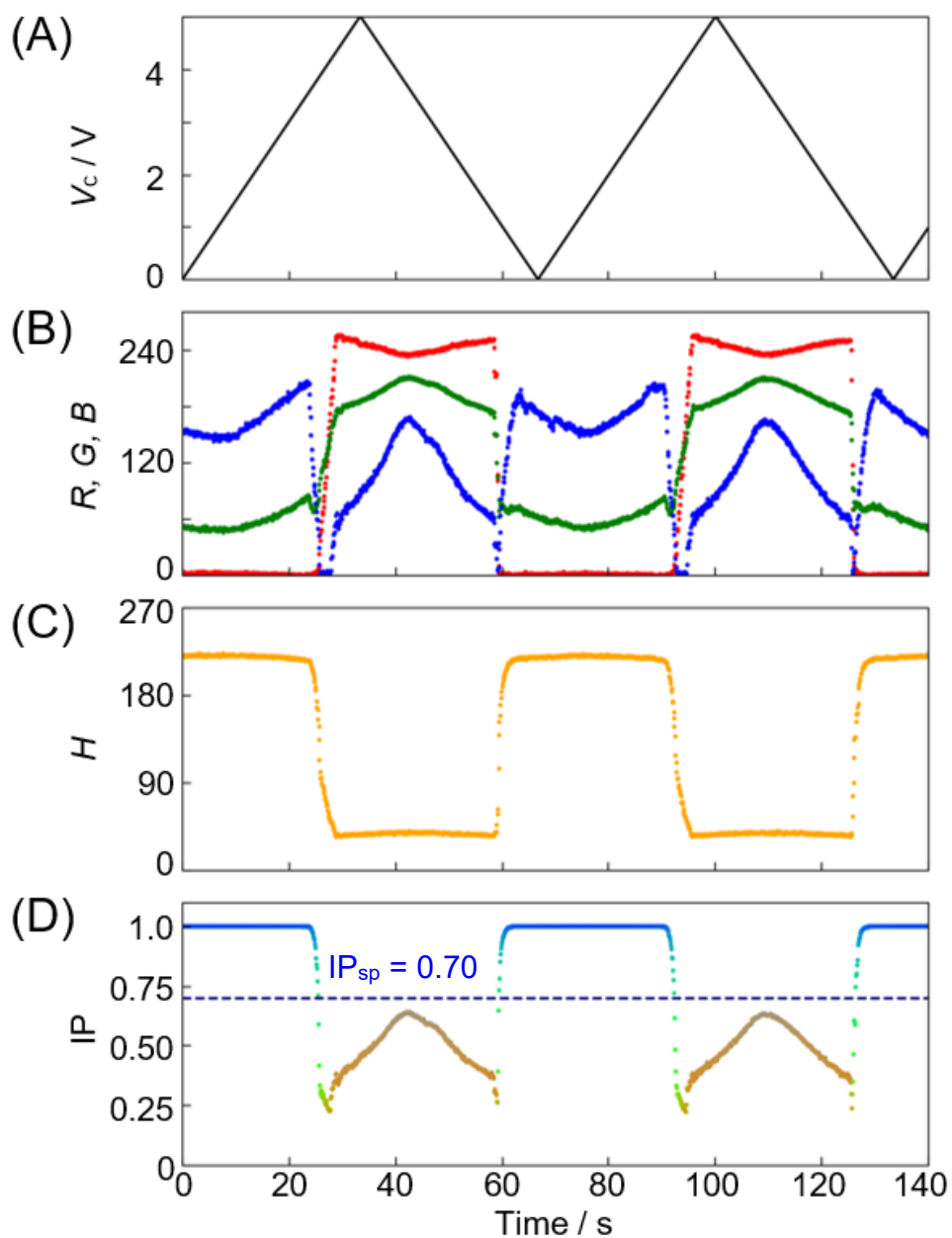


図 4.7 制御電圧 V_c と色成分 (R, G, B 値, H, IP) の経時的変化
 (A) 制御電圧 V_c , (B) R, G, B 値, (C) Hue (H) 値, (D) 内積 IP の経時的変化。
 試料: $0.10 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$, 標準液: $0.10 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$ ($2.0 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ BTB}$ 含有)。
 点線は滴定終点レベルを示す $IP (IP_{sp})$, サンプルング周波数は 10 Hz 。

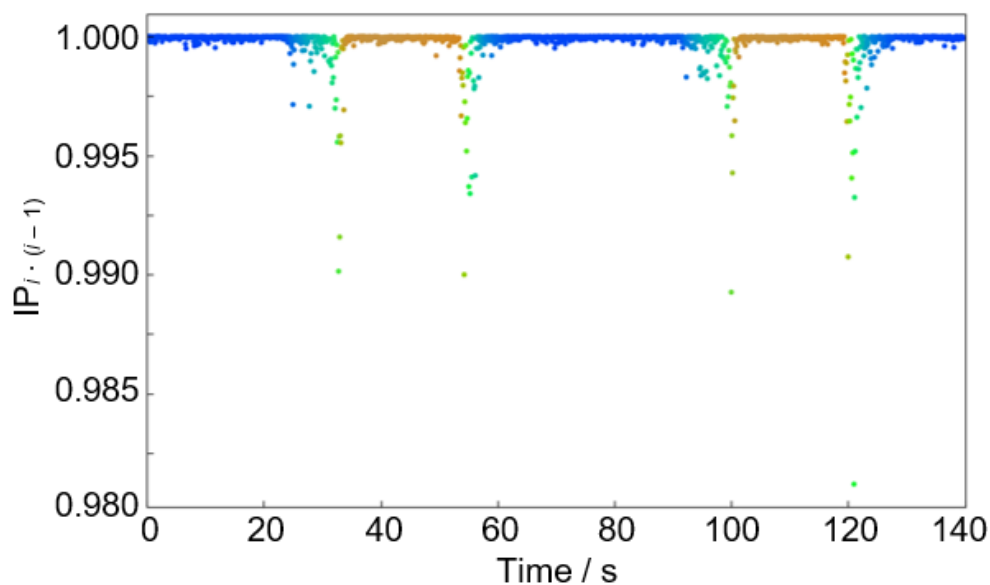


図 4.8 図 4.7 のデータにおける $(i - 1)$ 番目と i 番目の画像の RGB 単位ベクトル間の IP の経時的変化。
各点の色は指示薬の色調を示している。

4.3.2 分析性能

当量点組成を与える V_c (V_E) は、滴定終点を検出した瞬間の直近の 2 つの V_c 値を平均することで求められる (4.2.5 節および図 4.5 を参照)。第 2 章および第 3 章でも述べたように、フローレイショメトリーは流量が正確に校正されていれば原理的には絶対分析法である。しかし、ポンプ流量の校正は操作が煩雑で、時間を要する。そこで式 2.4 に基づいて、試料濃度 C_B に対して V_E の逆数をプロットする絶対検量線法を採用した。各種酸・塩基滴定の検量線の結果を表 4.2 に示す。すべての滴定において、良好な直線範囲と直線性 ($r^2 > 0.998$) を得ることができた。

表 4.2 各種酸・塩基滴定の検量線

試料	標準液 ^a	指示薬	直線範囲 mol dm ⁻³	r ²
HCl	NaOH	BTB	0.030 – 1.0	0.998
CH ₃ COOH	NaOH	PP	0.030 – 0.75	0.999
H ₃ PO ₄ (1st)	NaOH	TP	0.030 – 0.30	0.998
H ₃ PO ₄ (2nd)	NaOH	BCG	0.020 – 0.60	0.999
NaOH	HCl	BTB	0.025 – 0.50	0.999
NH ₃	HCl	BCG	0.050 – 1.0	0.998

^a BTB, ブロモチモールブルー; PP, フェノールフタレイン; TP, チモールフタレイン; BCG, ブロモクレゾールグリーン。
標準液濃度: 0.1 mol dm⁻³。

4.4 小括

本研究では、デジタル画像を用いて溶液の色調変化を検出するために、RGB 単位ベクトル間の内積 (IP) を使用することを初めて提案した。この IP を利用した滴定終点検出法は、指示薬の分析波長や最適な色成分 (*R, G, B* や Hue 値) を選択することなく色調変化をとらえることができるため、簡便で経済性に優れ、汎用性が高い検出法であるといえる。

第5章 RGB 単位ベクトル間の内積を利用した滴定 終点検出法の日本薬局法収載医薬品および食酢の定 量への応用

5.1 緒言

第4章では、RGB 単位ベクトル間の内積 (IP) に基づいて指示薬の色調変化を検出するという新しい概念を提案し、この妥当性を固定三角波制御フローレイシヨメトリーによって検証した。本章の研究では、さらにこの方法をフィードバック制御フローレイシヨメトリーに応用し、医薬品および食酢の水溶媒滴定、非水溶媒滴定に適用した。対象試料として、第18改正日本薬局方に収載される医薬品と市販の食酢を選択した。

5.2 実験

5.2.1 試薬と試料

2 mol dm⁻³ HCl, 2 mol dm⁻³ NaOH は関東化学株式会社 (東京) から購入した。プロモチモールブルー (BTB), *p*-ナフトールベンゼイン (PNB), フェノールフタレイン (PP), クリスタルバイオレット (CV) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。イソニアジド原末 (イスコチン®), プロベネシド 250 mg 錠 (ベネシッド®), 50%スルピリド細粒はそれぞれ、第一三共株式会社 (東京), 科研製薬製薬 (東京), 協和薬品株式会社 (富山) から購入した。4%フロセミド細粒 (ラシックス®), イブプロフェン 100 mg 錠 (ブルフェン®) は日医工株式会社 (富山) から購入した。実験に使用した医薬品の構造式を図 5.1 に示す。穀物酢, リンゴ酢, 米酢は徳島市のスーパーマーケットで購入した。本章の研究で使用した試薬は分析試薬等級であり、さらなる精製をすることなく使用した。水は逆浸透水を超純水製造装置 Sartorius Arium 611DI で脱イオン化した超純水を使用した。

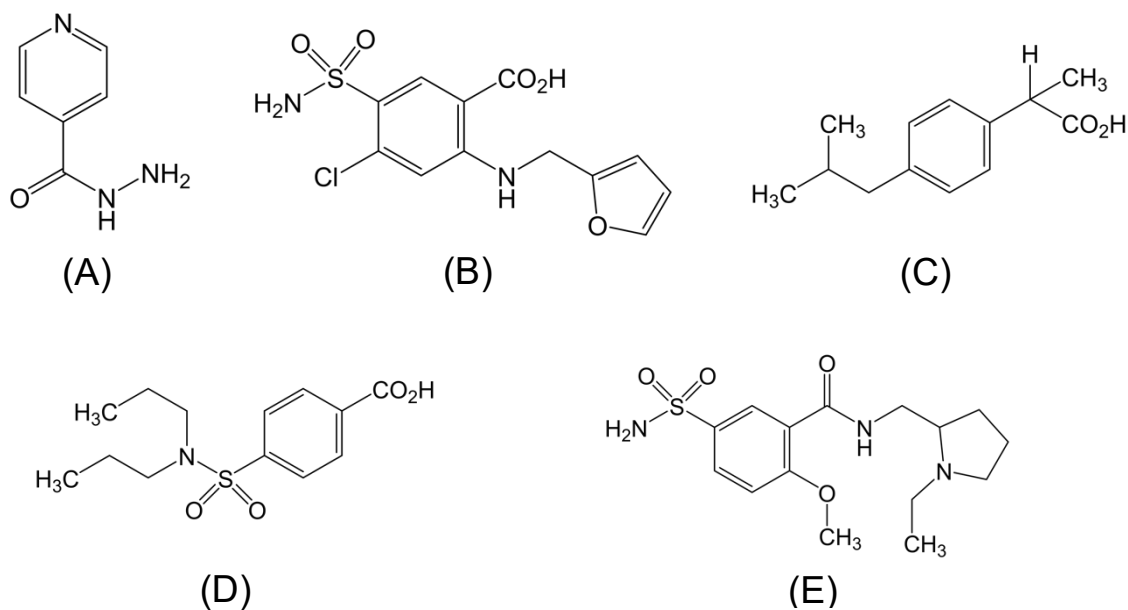


図 5.1 医薬品の構造式

(A) イソニアジド, (B) フロセמיד, (C) イブプロフェン, (D) プロベネシド, (E) スルピリド。

5.2.2 フローシステムと方法

図 5.2 に本章の研究で用いたフローシステムの概略図を示す (図 4.4 に示したものと同一である)。ノートパソコン PC から A/D-D/A コンバータを介して制御電圧 V_c を出力し, P_1 によって試料流量 $F_B (= kV_c, k$ は比例定数) を変化させた (ただし, スルピリドの滴定では, P_1 によって標準液を送液した)。フローシステムの配管には, ポンプチューブ (外径 3.68 mm, 内径 0.51 mm の Pharmed[®]チューブ) を除いて PTFE チューブ (外径 1.59 mm, 内径 0.5 mm) を使用した。 P_2 ポンプのローラーによって溶液の混合が促進されるため, 混合反応器は使用しなかった。指示薬含有の標準液は $F_T - F_B$ (F_T は総流量) の流量で受動的に吸引され, 合流した両液は自作の検出器へと導かれた。検出器内では, 石英製のフローセル (光路長 1 mm) を流れる溶液をデジタルマイクروسコープで撮影した。画像データは OpenCV ライブラリ (ver. 2.4.13) を使用して PC に取得した。これら一連の操作を, Visual Basic .NET で自作したプログラムによって自動化した。

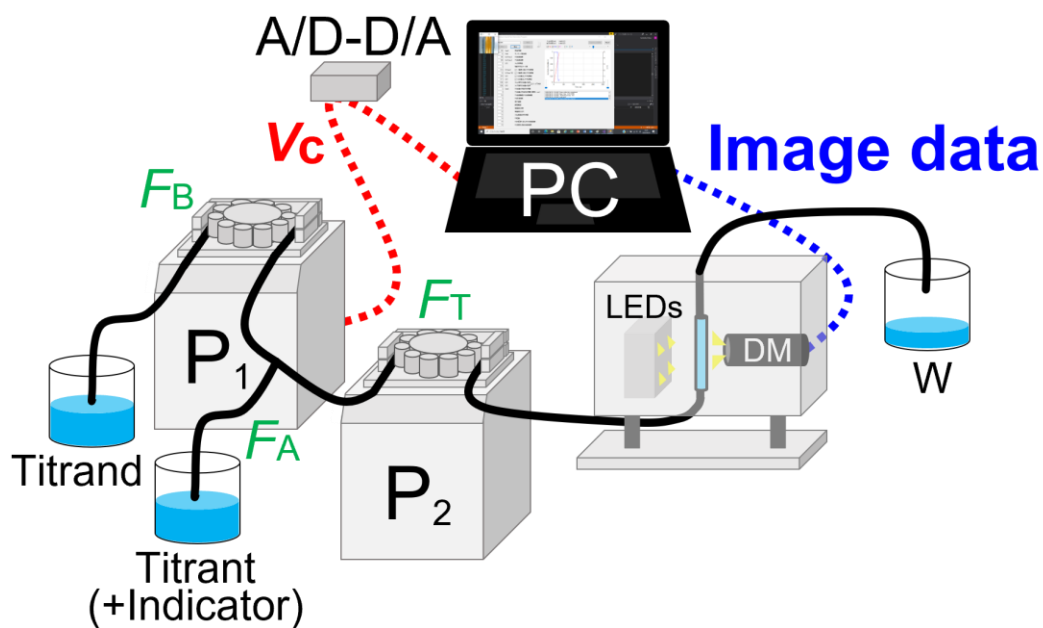


図 5.2 フローシステム

P_1 および P_2 , ペリスタポンプ (GILSON, Minipuls 3, MP-2, USA);

DM, デジタルマイクロスコープ (UMTELE Co., YPC-X02, China);

PC, ノートパソコン (Hewlett Packard, HP-ProBesk 430 G3, USA);

A/D-D/A, A/D-D/A コンバータ (CONTEC, AIO-16082 GY-USB, Japan);

V_c , 制御電圧; W, 廃液。

F_B ($0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} - 1.15 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$), F_A ($F_T - F_B$), F_T ($1.20 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) はそれぞれ試料溶液の流量, 標準液の流量, 総流量を示す。

5.3 結果と考察

5.3.1 種々の酸・塩基滴定

医薬品や食酢を分析する前に、本法を用いて HCl vs. NaOH, CH₃COOH vs. NaOH, H₃PO₄ (第 1 当量点) vs. NaOH, NH₃ vs. HCl の滴定を行った。酸塩基指示薬にはそれぞれ、ブロモチモールブルー (BTB), フェノールフタレイン (PP), チモールフタレイン (TP), ブロモクレゾールグリーン (BCG) を用いた。図 5.3 に 0.1 mol dm⁻³ NaOH を 0.1 mol dm⁻³ HCl で滴定したときの結果を示す。V_c に比例して試料 (NaOH) の流量が増大するにつれ、指示薬 (BTB) の色調は橙色から緑色を経て青色に変化した。V_c は IP が IP_{sp} (0.7: 当

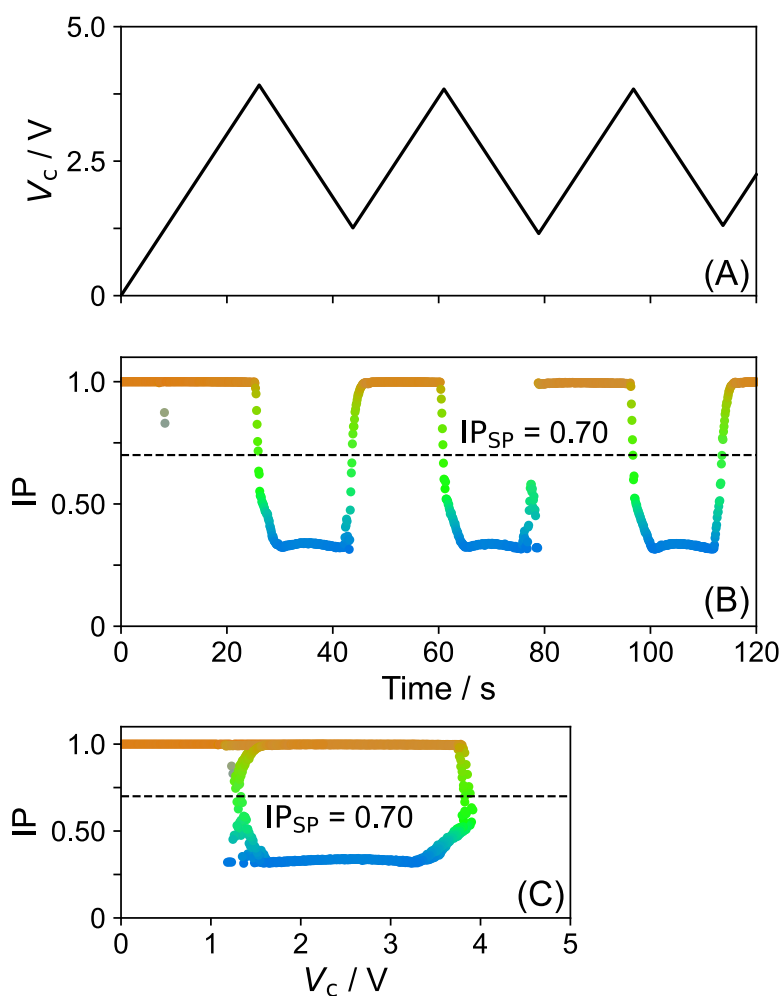


図 5.3 0.1 mol dm⁻³ NaOH vs. 0.1 mol dm⁻³ HCl の滴定

(A) 制御電圧 V_c の経時的変化, (B) 内積 (IP) の経時的変化, (C) 滴定曲線。

図 5.3 (B) および (C) の各点の色は画像の色を示す。点線は IP_{sp} を示す。

量点レベル) を通過した瞬間 (25.9 s, 61.1 s, 96.8 s) に上向きから下向きに走査方向が反転された。

それとは対照的に, 43.6 s, 78.8 s, 113.5 s で V_c 走査方向は下向きから上向きに反転された。図 5.3C に滴定曲線を示す。1.17 V–3.91 V の狭い V_c 走査範囲で効率よく滴定が行われたことがわかる。

5.3.2 日本薬局方医薬品の滴定

2.0 mmol dm⁻³ クリスタルバイオレット (CV) 含有 20 mmol dm⁻³ スルピリド (溶媒: 酢酸) を非水滴定したときの V_c , IP, 色相値 (H) の経時変化をそれぞれ図 5.4A, B, C に示した。標準液には 20 mmol dm⁻³ HClO₄ (溶媒: 酢酸) を使用した。指示薬 (CV) が標準液 (HClO₄) に溶解しなかったため, CV は試料溶液 (スルピリド) に溶解させた。P₁ によって試料溶液を送液したところ, 測定開始直後は指示薬含有の試料流量が 0 cm³ min⁻¹ であるため, 溶液は無色で指示薬の色調が観察されなかった。そこで, スルピリドの滴定では, 標準液 (HClO₄) を P₁ より送液した。図 5.4B, C, D の各点の色は撮影した画像の指定領域の色調に対応する。 V_c の走査方向は IP が IP_{sp} (= 0.70) に達した 27.9 s, 65.4 s, 103.2 s に上向きから下向きに反転された。それとは対照的に 46.8 s, 84.3 s で V_c 走査方向は下向きから上向きに反転された。直近の V_c の極大値 (V_{cH}) と極小値 (V_{cL}) の平均値から求めた V_E は 2.76 ± 0.02 V ($n = 4$) であった。H 値は 250 (青) から 360 (= 0) を経て 30 (橙) まで大きく変化した。しかし, メチルレッドのように色相環上での遷移間隔が小さい (赤 \leftrightarrow 黄) 指示薬を用いる場合は, H 値の変化も小さくなるであろう。図 5.4D は, V_c (図 5.4A) に対して IP (図 5.4B) をプロットした滴定曲線である。第 4 章の固定三角波制御フローレイショメトリー (V_c 走査範囲 0 – 5 V) とは異なり, 本章のフィードバック制御モードでは, V_c 走査範囲を 43% に限定することができ, 1 滴定あたり 19.1 ± 0.3 s ($n = 4$) という高効率な滴定を実現した。原理的には, 下向きの V_c 走査時の色調変化は, 上向きの V_c 走査時の色調変化を逆に迎えることが予想される。しかし, 図 5.4B, D の a と b の間の 1 サンプルング周期 (0.1 s) の間で, データは得られなかった。他の医薬品試料でも同様の傾向が見られた。上向きの V_c 走査時に色調が急激に変化する理由については, 現時点では明らかではない。

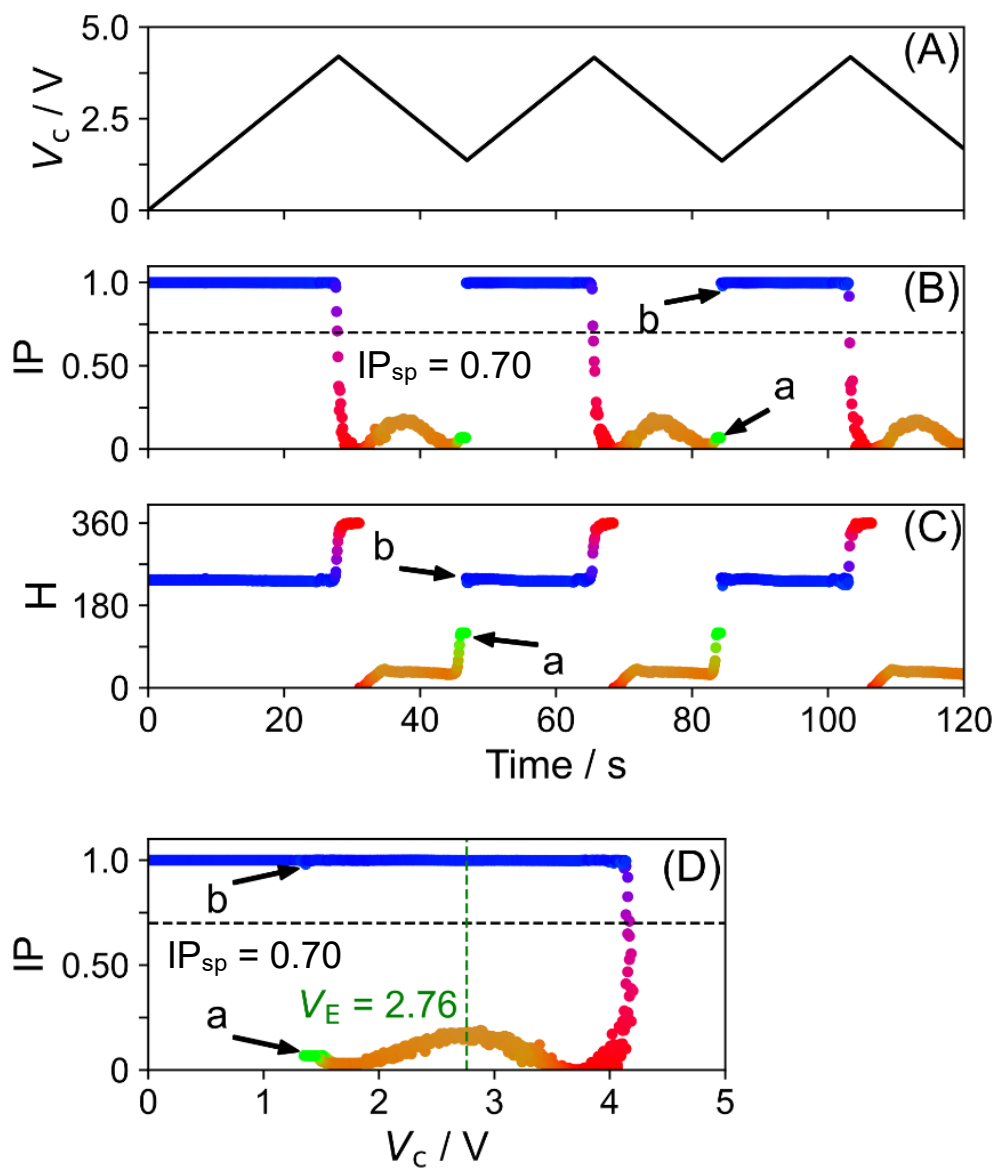


図 5.4 20 mmol dm⁻³ スルピリドのフローシグナル

(A) 制御電圧 V_c (V_c 走査速度: 0.15 V s^{-1}), (B) 1 枚目の画像と i 枚目の画像の RGB 単位ベクトル間の内積 (IP), (C) 色相値 H , (D) 滴定曲線。

サンプリング周波数: 10 Hz, 標準液: $20 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$ 。

図 5.4B, C, D の各点の色は指示薬の色調を示す。水平の点線は IP_{sp} を示し、垂直の点線は V_E を示す。

5.3.3 分析性能の評価

表 5.1 にさまざまな医薬品の検量線の分析性能を示した。いずれの検量線も良好な直線範囲と直線性 ($r^2 > 0.996$) が認められた。また, 図 5.5 に検量線のグラフを示した。いずれの医薬品についても 5 点以上のデータで検量線を作成した。イソニアジドの高濃度側 350 mmol dm^{-3} とフロセミドの低濃度側 0.3 mmol dm^{-3} では直線から外れるプロットとなった。

図 5.6 にスルピリドのさまざまな濃度における滴定結果を示した。 5.4 mmol dm^{-3} (黄色線・黄色点) の滴定では, V_e は下限 (0 V) に達したため, 0 V で V_e 走査方向は反転された。 V_{cl} は IP_{sp} が検出される時間まで反転前の V_e を外挿することによって自動的に算出された (2.2.4 項参照)。

表 5.1 さまざまな医薬品の検量線

試料	標準液	指示薬 ^a	直線範囲 / mmol dm^{-3}	r^2
イソニアジド	HClO_4^{b}	PNB	2.5 – 270	0.999
フロセミド	NaOH^{c}	BTB	0.6 – 12	0.996
イブプロフェン	NaOH^{d}	PP	12 – 120	0.998
プロベネシド	NaOH^{e}	PP	14 – 140	0.999
スルピリド	HClO_4^{f}	CV	5.4 – 54	0.996

^a PNB, *p*-ナフトールベンゼイン; BTB, ブロモチモールブルー;

PP, フェノールフタレイン; CV, クリスタルバイオレット。

^{b-f} 標準液の濃度: b, 20 mmol dm^{-3} ; c, 10 mmol dm^{-3} ; d, 50 mmol dm^{-3} ; e, 100 mmol dm^{-3} ;

f, 20 mmol dm^{-3} 。

イソニアジド, スルピリドおよび HClO_4 は CH_3COOH に, フロセミドは *N, N*-ジメチルホルムアミドに, イブプロフェンとプロベネシドはエタノールに溶解させた。 NaOH は超純水に溶解させた。

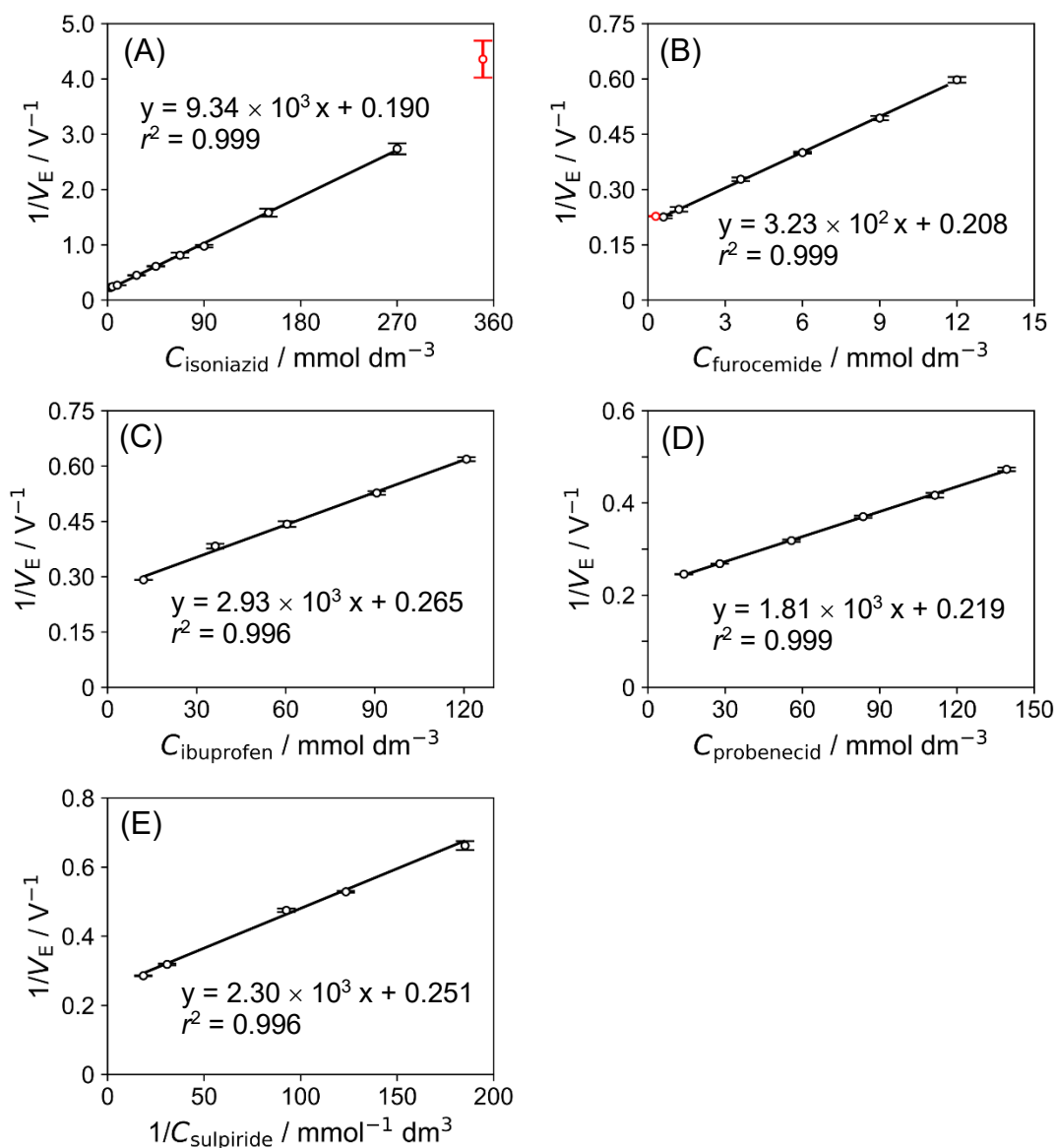


図 5.5 (A) イソニアジド, (B) フロセミド, (C) イブプロフェン, (D) プロベネシド (E) スルピリドの検量線。

赤色のプロット (350 mmol dm^{-3} イソニアジド (A) と 0.3 mmol dm^{-3} フロセミド (B)) は直線範囲から外れた。

スルピリドについては、例外的に P_1 チャンネルより標準液 (HClO_4) を送液した。試料溶液 (スルピリド) は $F_A (= F_T - F_B)$ の流量で吸引されるため、 V_E の逆数は試料溶液濃度 C_A の逆数に比例する。

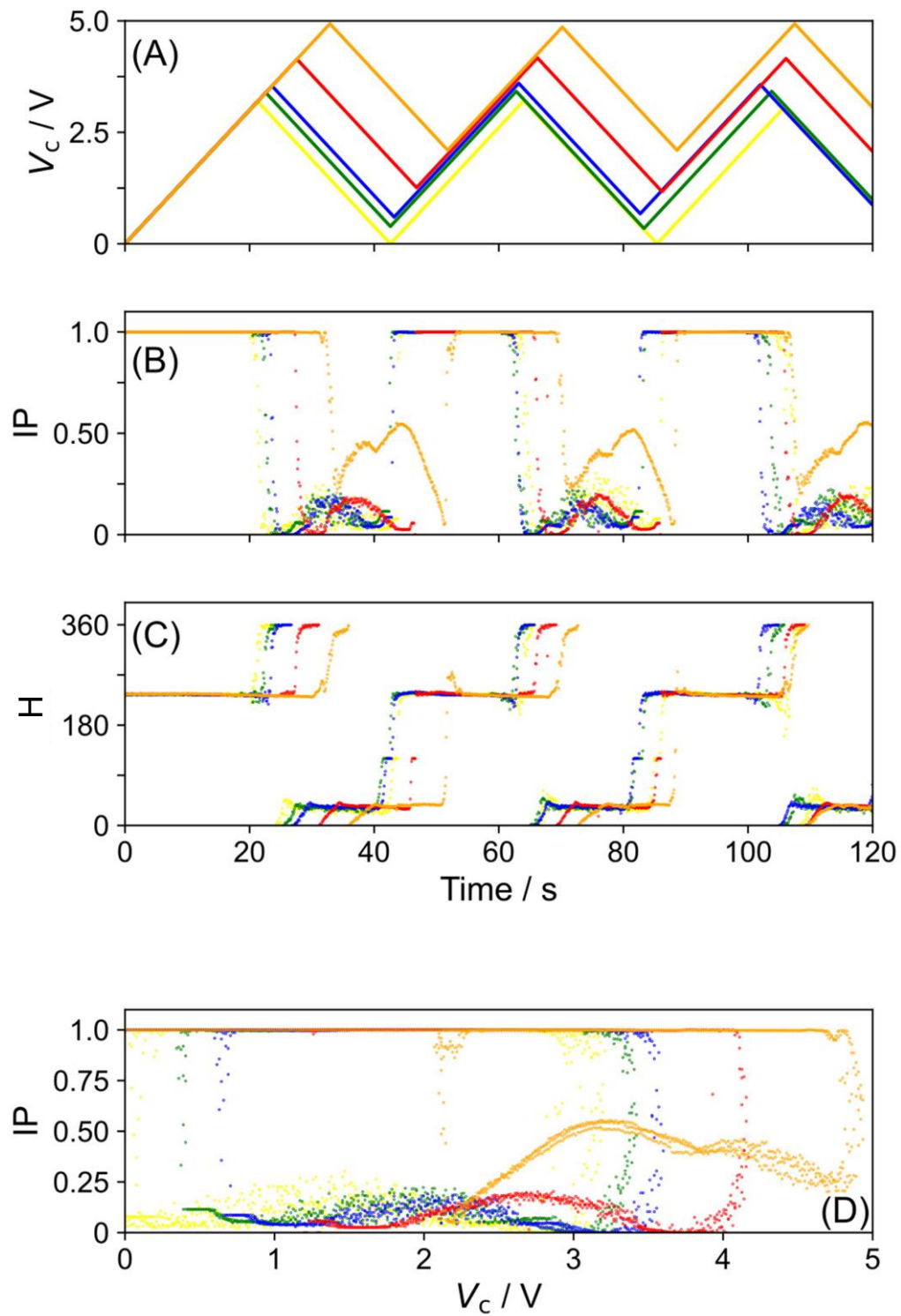


図 5.6 さまざまな濃度のスルピリドの滴定
 (A) 制御電圧 V_c , (B) 内積 IP, (C) Hue 値 (H) の経時的変化。(D) 滴定曲線。

5.3.4 食酢分析への応用

市販の食酢試料を本法で分析した。その結果を表 5.2 に示す。日本農林規格²⁶ (JAS) および米国食品医薬品局⁵⁶ (FDA) は食酢の最低酸度を 4%と規定しているが、本法によって得られた分析値は 4%以上であり、その規定を満たしていた。本法による結果と公定法 (手操作による滴定) との間に有意な差 (スチューデント *t* 検定の 95%信頼区間) は見られなかった。また、相対誤差は 1%未満であった。

表 5.2 食酢試料の定量

試料	標準液 ^a	指示薬	濃度, %		相対誤差 ^b , %
			本法	公定法	
穀物酢	NaOH	PP ^c	4.62 ± 0.03	4.62 ± 0.02	0
リンゴ酢	NaOH	PP ^c	4.74 ± 0.15	4.80 ± 0.01	- 1.0
米酢	NaOH	PP ^c	4.93 ± 0.13	4.88 ± 0.01	1.0

(*n* = 3)

^a 濃度: 50 mmol dm⁻³。

^b 相対誤差 = (公定法による結果 - 本法による結果)/(公定法による結果) × 100%。

^c PP, フェノールフタレイン。

5.4 小括

第 4 章で新たに提案した RGB 単位ベクトル間の内積を利用した滴定終点検出法をフィードバック制御フローレイショメトリーに導入し、日本薬局方収載医薬品や食酢の分析に応用した。医薬品の分析においては、水溶媒滴定のみならず非水溶媒滴定にも応用し、問題なく分析を行えることを確認した。食酢の定量においては、JAS に規定される手操作による滴定法と本法で分析結果を比較したところ、有意な差はみられなかった。

第 6 章 総括

フローレイシヨメトリー flow ratiometry は、独立に送液される 2 液 (たとえば試料溶液と試薬溶液) を、細管内の流れ系でさまざまな流量比で合流させ、この流量比と下流で得られる検出信号との関係を解析することで目的成分の濃度や平衡定数を求めるフロー分析法である。本研究では、フローレイシヨメトリーに基づく滴定法のさらなる発展と局方医薬品定量への応用を目的に、自作 LED-フォトダイオード (PD) 検出器の導入と流路構成 (マニフォールド) の改良によるハイスループット化、およびデジタルマイクロスコープを用いる動画撮影・測色法に基づく低コスト化と簡便性・汎用性の向上を検討した。

まず、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ハイスループット化について検討した。流量可変ポンプ、コンピュータ (PC)、LED-PD 検出器、電流増幅器などでフロー分析システムを構築した。総流量一定のもと、酸溶液と塩基溶液 (いずれかに酸塩基指示薬を添加) の流量比を連続的に変化させつつ両液を合流させ、下流の検出器の石英フローセルへと導き、LED 光を入射させた。透過光強度を PD で検出し、電流増幅器によって増幅したのち、検出信号として PC に取得した。装置の制御、データ取得、解析、結果の図表表示を完全自動化するために Visual Basic .NET によるプログラムも開発した。フィードバック制御により滴定終点検出のために不必要な領域への流量比走査を回避し、さらに、より狭い領域をより高速で走査する固定三角波制御を併用することでハイスループット化を図った。酸溶液と塩基溶液の流量比を上昇・下降させ、それぞれにおいて滴定終点を検出することで、両液の合流から検出までの遅れ時間 (t_{lag}) の影響を補正した。分析条件を最適化したシステムでは、1 分間に最大 43 回の滴定を行うことができた。さらなるハイスループット化を目指して、滴定効率に影響する t_{lag} の減少のためのマニフォールドの改良や混合反応器の導入を検討した結果、1 分間に最大 46.9 回の超ハイスループット滴定を実現した。

後半では、フローレイシヨメトリーに測色に基づく新たな滴定終点検出法を導入した。まず、石英フローセル、白色 LED、デジタルマイクロスコープなどからなる検出器を製作した。酸・塩基混合溶液を検出器内のフローセルへと導き、デジタルマイクロスコープで動画を撮影した。そのデータを PC に取得し、あらかじめ設定した画像の微小領域の RGB 値を、OpenCV ライブラリを用いて取得した。この RGB 値を三次元単位ベクトル (\vec{v}_i) へと変換し、1 枚目の画像の単位ベクトルと i 枚目の画像の単位ベクトル間の内積 $IP_i (= \vec{v}_1 \cdot \vec{v}_i)$ から指示薬の色調変化を判定した。すなわち、色調が完全に同一であれば IP_i は 1 となり、異なれば < 1 となる。固定三角波制御フローレイシヨメトリーを用いて本検出法の評価を行った後、フィードバック制御フローレイシヨメトリーによる第 18 改正日本薬局方収載医薬品 (イソニアジド、イブプロフェンなど) や食酢

の酸・塩基滴定 (非水滴定を含む) に応用した。その結果, $18 \text{ s titration}^{-1}$ の効率, $\text{RSD} < 4.4\%$ の併行精度で, いずれの目的物質についても良好な分析値が得られた。

本研究で開発した分析システムでは, 前例のないハイスループット滴定を実現した。動画撮影・測色検出法で使用したデジタルマイクロスコープは安価 (約 2,000 円) であり, 画像の測色値 (RGB 値) をもとに終点検出するため, 指示薬の色調に応じた光源や分析波長の選択が不要である。本研究で考案した RGB 単位ベクトル間の内積を用いる終点検出法は前例のない方法であり, いずれの三刺激値 (R , G または B) が最適かを選択する必要がなく, 簡便性や汎用性にも優れる。

謝辞

本研究の遂行にあたり一貫してご指導をいただきました，徳島大学大学院医歯薬学研究部薬学域分析科学分野の田中秀治教授，竹内政樹准教授に心より感謝申し上げます。

徳島大学薬学部衛生薬学研究室で研究のご指導をいただきました，徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域食料科学分野の田中保教授，徳島大学大学院医歯薬学研究部薬学域衛生薬学分野の小暮健太郎教授に心より感謝申し上げます。

検出器の制作にご協力いただきました，四国理研有限会社の藤川明洋様に感謝申し上げます。

共同研究者としてご尽力頂きました，宮崎愛子氏，落合惇也氏，岡本和将氏に深く感謝申し上げます。

私の6年間の研究室生活を充実したものにさせていただきました，薬学部分析科学研究室の皆さまに厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. The Japanese Pharmacopoeia, 18th ed., **2021**, The Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo.
2. H. Tanaka and S. Nakano, *J. Flow Inject. Anal.*, **2004**, *21*, 123.
3. A. U. Ramsing, J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **1981**, *129*, 1.
4. J. Ruzicka, and E. H. Hnasen, “*Flow injection analysis*”, 2nd ed., **1988**, John Wiley & Sons, New York, pp. 229.
5. J. Ruzicka, and 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.
6. J. F. van Staden, H. du Plessis, *Anal. Commun.*, **1977**, *34*, 147.
7. W. J. Blaedel and R. H. Laessig, *Anal. Chem.*, **1964**, *36*, 1617.
8. W. J. Blaedel and R. H. Laessig, *Anal. Chem.*, **1965**, *37*, 332.
9. G. Nagy, K. Tóth, and E. Pungor, *Anal. Chem.*, **1975**, *47*, 1460.
10. G. Nagy, Z. S. Fehér, K. Tóth, and E. Pungor, *Anal. Chim. Acta.*, **1977**, *91*, 87 and 97.
11. U. Spohn, G. Nagy, and E. Pongor, *Anal. Sci.*, **1986**, *2*, 423 and 431.
12. J. Marcos, A. Ríos, and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta.*, **1992**, *261*, 489 and 495.
13. R. S. Honorato, M. C. U. Araújo, R. A. C. Lima, E. A. G. Zagatto, R. A. S. Lapa, and J. L. F. C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *396*, 91.
14. H. Tanaka, P. K. Dasgupta, and J. Huang, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4713.
15. P. K. Dasgupta, H. Tanaka, and K. D. Jo, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *435*, 289.
16. M. Fais, C. Schwarz, and F. C. Leinweber, *Chem. Ing. Tech.*, **2016**, *88*, 793.
17. H. Tanaka and T. Baba, *Talanta*, **2005**, *67*, 848.
18. H. Tanaka and T. Baba, *Anal. Sci.*, **2005**, *21*, 615.
19. T. Aydan, A. Kitagawa, M. Takeuchi, and H. Tanaka, *J. Flow Inject. Anal.*, **2008**, *25*, 65.
20. N. Kakiuchi, A. Miyazaki, A. Fujikawa, M. Takeuchi, and H. Tanaka, *J. Flow Inject. Anal.*, **2017**, *34*, 11.
21. T. J. Cardwell, R. W. Cattrall, G. J. Cross, G. R. O’Connell, J. D. Petty, and G. R. Scollary, *Analyst*, **1991**, *116*, 1051.
22. R. S. Honorato, M. C. U. Araujo, G. Veras, E. A. G. Zagatto, R. A. S. Lapa, and J. L. F. C. Lima, *Anal. Sci.*, **1999**, *15*, 665.
23. J. Moros, F. A. Iñón, S. Garrigues, and M de la Guardia, *Talanta*, **2008**, *74*, 632.
24. M. Wójtowicz, J. Kozak, D. Gornacka, and P. Koscielniak, *Anal. Sci.*, **2008**, *24*, 1593.
25. J. González-Rodrigues, P. Pérez-Juan, and M. D. L. de Castro, *Analyst*, **2001**, *126*, 117.
26. JAS, “Japanese Agricultural Standard for Brewed Vinegar”, **2019**, Ministry of Agriculture,

Forestry and Fisheries, Japan.

27. 黒田 六郎, 小熊 幸一, 中村 洋, フローインジェクション分析法, 共立出版株式会社, 1990, 第1版, pp. 25.
28. T. Ogusu, K. Uchimoto, M. Takeuchi, H. Tanaka, *Talanta*, **2014**, *118*, 123.
29. J. Ochiai, S. Oka, T. Hirasaka, E. Tomiyama, H. Kubo, K. Okamoto, M. Takeuchi, and H. Tanaka, *Anal. Sci.*, **2020**, *36*, 703.
30. H. Tanaka, P. K. Dasgupta, and J. Huang, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4713.
31. H. Tanaka, and T. Baba, *Talanta*, **2005**, *67*, 843.
32. H. Tanaka, and T. Baba, *Anal. Sci.*, **2005**, *21*, 615.
33. M. Jödecke, Á. P. S. Kamps, and G. Maurer, *J. Chem. Eng. Data.*, **2012**, *57*, 1249.
34. L. Zhong, J. Sun, Y. Gan, S. Zhou, Z. Wan, Q. Zou, K. Su, and P. Wang, *Anal. Sci.*, **2019**, *35*, 133.
35. P. Jaikang, S. Wangkarn, P. Paengnakorn, and K. Grudpan, *Anal. Sci.*, **2019**, *35*, 421.
36. A. Choodum, V. Jirapattanasophon, C. Boonkanon, T. Taeekarn, and W. Wongniramaikul, *Anal. Sci.*, **2020**, *36*, 577.
37. E. Hirayama, T. Sugiyama, H. Hisamoto, and K. Suzuki, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 465.
38. N. Maleki, A. Safavi, and F. Sedaghatpour, *Talanta*, **2004**, *64*, 830.
39. K. Danchana and V. Cerdá, *Talanta*, **2020**, *216*, 120977.
40. S. Apichai, K. Thajee, W. Wongwilai, S. Wangkarn, P. Paengnakorn, C. Saenjurn, and K. Grudpan, *Talanta*, **2019**, *201*, 226.
41. H. Park, Y. G. Koh, and W. Lee, *Sens. Actuators B Chem.*, **2021**, *345*, 130359.
42. K. Sankar, D. Lenisha, G. Janaki, J. Juliana, R. S. Kumar, M. C. Selvi, and G. Srinivasan, *Talanta*, **2020**, *208*, 120408.
43. H. Sharifi, J. Tashkhourian, and B. Hemmateenejad, *Anal. Chim. Acta*, **2020**, *1126*, 114.
44. A. Lert-itthiporn, P. Srikritsada Wong, and N. Choengchan, *Talanta*, **2021**, *221*, 121574.
45. Y. Soda and E. Bakker, *ACS Sens.*, **2019**, *4*, 3093.
46. E. da N. Gaiao, V. L. Martins, W. da S. Lyra, L. F. de Almeida, E. C. da Silva, and M. C. U. Araújo, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *570*, 283.
47. A. R. Tórreres, W. da Silva Lyra, S. I. E. de Andrade, R. A. N. Andrade, E. C. da Silva, M. C. U. Araújo, and E. da N. Gaião, *Talanta*, **2011**, *84*, 601.
48. M. B. Lima, S. I. E. Andrade, I. S. Barreto, L. F. Almeida, and M. C. U. Araújo, *Microchem. J.*, **2013**, *106*, 238.
49. S. I. E. Andrade, M. B. Lima, I. S. Barreto, W. S. Lyra, L. F. Aleida, M. C. U. Araújo, and E. C. Silva, *Microchem. J.*, **2013**, *109*, 106.
50. M. A. Domínguez, P. H. G. D. Diniz, M. S. D. Nezio, M. C. U. de Araújo, and M. E. Centurión, *Microchem. J.*, **2014**, *112*, 104.

51. L. A. Siqueira, I. S. Nunes, P. L. Almeida Junior, W. S. Lyra, R. A. N. Andrade, M. C. U. Araújo, L. F. Almeida, and R. A. C. Lima, *Microchem. J.*, **2017**, *133*, 593.
52. R. A. C. Lima, L. F. Almeida, W. S. Lyra, L. A. Siqueira, E. N. Gaião, S. S. L. Paiva Junior, and R. L. F. C. Lima, *Talanta*, **2016**, *147*, 226.
53. L. A. Siqueira, I. S. Nunes, P. L. Almeida Junior, W. S. Lyra, R. A. N. Andrade, M. C. U. Araújo, L. F. Almeida, and R. A. C. Lima, *Microchem. J.*, **2017**, *133*, 593.
54. N. Kakiuchi, J. Ochiai, M. Takeuchi, and H. Tanaka, *Anal. Sci.*, **2021**, *37*, 3.
55. R. S. Berns, “*Billmeyer and Saltzman’s Principles of Color Technology*”, 4th ed., **2019**, John Wiley and Sons, Hoboken, USA, pp. 47.
56. Compliance Policy Guide Sec. 525.825 “Vinegar, Definitions - Adulteration with Vinegar Eels”, **1995**, U.S. Food and Drug Administration.