

可搬型環境試料中重金属濃度分析計の高機能化

-セレン(IV)のマイクロカラム着色に基づく

目視蛍光定量法-

藪谷 智規^{1*}, 木下 峻輔², 猪井 勇志³, 岩野 あずさ³, 横田 昌幸², レー
ティ スン テウイ², 外輪 健一郎¹, 高柳 俊夫¹

Development of potable analytical devices for determination of metallic
species in environmental samples

-A colorimetric sensing device using fluorometric coloration length on a
microcolumn for determination of selenium(IV)-

by

Tomoki YABUTANI^{1*}, Shunsuke KINOSHITA², Yuji INOI³, Azusa IWANO³,
Masayuki YOKOTA², Le Thi Xuan THUY², Ken-ichiro SOTOWA¹, and Toshio
TAKAYANAGI¹

A visible colorimetric sensing device for determination of selenium(VI) is proposed. This method is simply measuring the fluorinated coloration length of a microcolumn to determination Se(IV). The extension of the length of color band was generated by accumulation of a fluorescence reactant (Se-DAN) between Se(VI) and diaminonaphtalene (DAN) on an adsorbent in a micorcolomn. Modification with β -cyclodextrin on octadecyl functional groups (C₁₈)-modified beads as adsorbent of Se-DAN enhanced the florescence. A detection limit of 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Se with a linear range up to 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ was obtained. The determination scheme was successfully applied to the analysis of a sample of tap water.

Keywords: selenium, visible determination, diaminonaphtalene, microcolumn

¹徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
Department of Chemical Science and Technology, Institute
of Science and Technology, The University of Tokushima

²徳島大学大学院先端技術科学教育部
Department of Chemical Science and Technology,
Graduate School of Science and Technology, The

University of Tokushima

³ 徳島大学工学部化学応用工学科

Department of Chemical Science and Technology, Faculty
of Engineering, The University of Tokushima

*連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

1. 緒言

セレン (Se) 及びSe化合物は、ガラス製品や窯業製品、半導体材料、太陽電池や映画用フィルム、赤外線偏光子、顔料、増感剤、脱水素剤、起泡剤等の原料として利用されている。また、鉄鋼スラグや石炭焼却灰などの廃棄物等にも比較的高濃度に含まれている。Seは生体必須元素の一つであり、その作用及び機能は他の多くの必須元素と強い相関を有する。¹⁻³⁾また、生体における適正濃度範囲は狭く、欠乏や過剰が原因となる中毒症状を引き起こされやすい元素である。⁴⁻⁶⁾そのため、各種環境基準に規制値が定められている(水道水・地下水 0.01 mg L^{-1} 以下、排水基準 0.1 mg L^{-1} 以下)。Seの公定分析法として、一般的に水素化物発生原子吸光法、プラズマ分光分析法が用いられているが、大型、高価であるため、汚染状態の現場モニタリングには不向きである。^{6,7)}現在、様々な対象物質に対して試験紙、バックテストなどの簡易試験法が存在する。⁸⁾しかし、Seについては簡易分析用製品として頒布されているものは無く、簡易分析の報告例は小型蛍光分光器を利用した方法⁹⁾や小型シリンジを利用した固相抽出-フロー蛍光検出法¹⁰⁾など非常に少ないのが現状である。

我々のグループはこれまでSe(IV)の選択的蛍光誘導体化試薬である、2,3-ジアミノナフタレン(DAN)を用いて陽イオン交換/Se(IV)-DAN パッチ式目視検出、TLCを用いたSe目視定性蛍光分析法について報告した。¹¹⁾しかし、従来法では色差を目視で確認するだけであり、Seの存在の有無を判定する半定量にとどまっていた。そこで、本研究では、定量性と操作性の向上を目指して、濃度情報を蛍光着色長に変換する客観指標化を試みた。具体的には、マイクロカラムに充填した固相に蛍光物質であるSe(IV)-DANを吸着させることにより、

濃度に依存した蛍光着色長に基づいて定量するものである。目視着色のためのマイクロカラム充填剤には、オクタデシル官能基(C_{18})固相をベースに、Se(IV)-DANの蛍光増強剤として知られる β -シクロデキストリン(β -CD)の修飾による蛍光増強効果についても検討した。さらに、マイクロカラム内径、Se(IV)-DAN流速の最適化を行い、測定濃度範囲を決定した。さらに本方法を水道水の分析に適用した。

2. 実験

2.1. 試薬、試料および装置

Se(IV)標準溶液は、和光純薬製の亜セレン酸ナトリウムをMilli-Q水に溶解させたものを利用した。DANおよび β -CDは関東化学製の特級品を使用した。なお、実験に利用したDAN標準液は次に示す常法によって調製された。¹²⁾DAN 20 mg、塩化ヒドロキシルアンモニウム 80 mg、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA-2Na) 80 mgを 0.05 mol L^{-1} 塩酸 40 mLに加熱溶解させた($60 \text{ }^\circ\text{C} \times 20 \text{ 分}$)。ここで得られた 0.05 \% (w/w) DAN溶液は冷暗所で保存した(4°C , 保存期間: 1ヶ月)。DAN標準液は使用の都度、あらかじめディスポーザブルフィルター(DISMICシリンジフィルター, $0.45 \text{ }\mu\text{m}$)によりろ過した。Se(IV)溶液 5 mL、 0.05 \% (w/w) DAN溶液 0.5 mL、 1 mol L^{-1} HCl 30 μL をそれぞれ混合し、 90°C で5分間加温した。未反応のDANを除去するために、100 mgの強酸性陽イオン交換樹脂(Amberlite 200CT (Na^+ 型)、和光純薬)を添加し、振とう($220 \text{ rpm} \times 30 \text{ 分}$)した。陽イオン交換樹脂処理の後、Se(IV)-DAN蛍光誘導体化溶液をシリンジポンプにてカラムに通液した。本研究に使用した水は全てMilli-Q水を使用した。妨害物質の検討などに使用した金属、陰イオン溶液は、関東化学製原子吸光分析用、化学分析用標準溶液 1000 mg L^{-1} を希釈して調製した。実試料の水道水は $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ テフロン製メンブランフィルターにてあらかじめ濾過したものを利用した。

蛍光の目視には、Spectroline製のブラックライト(波長 365 nm)を利用した。デジタルカメラにはPanasonic製LUMIX DMC-FX35(1010万画素)を用いた。 β -CD修

飾量の評価に用いた紫外可視吸光度計には、日本分光製 V-570 DSX を使用した。マイクロカラムの基板にはソーダ石灰ガラス板(縦 30 mm, 横 70 mm, 厚さ 2 mm)を用い、PMT 社製卓上型 NC 微細加工 (MICRO-MC2 Light) にて加工した。マイクロカラムのための溝の切削には、切削ドリル; $\phi 0.9$ mm の電着ダイヤモンドバーを使用し、切削条件; XY 軸方向速度 0.5 mm s^{-1} 、Z 軸方向速度 0.5 mm s^{-1} 、切削ピッチ 0.05 mm 、主軸回転数 40000 rpm にて実施した。

2.2. β -CD 固相の作製及び評価

β -CD 4.25 g を Milli-Q 水 250 mL に溶解させ、 15 mmol L^{-1} β -CD 水溶液として実験に使用した。 β -CD 修飾固相の作製法としては以下の通りである。 C_{18} 修飾シリカゲル微粒子に、5 mL メタノール、5 mL Milli-Q 水を通液し、続けて 15 mmol L^{-1} β -CD 水溶液を 6 mL、Milli-Q 水 5 mL を順次通液することで β -CD 吸着固相を得た。固相への β -CD 吸着量はフェノール硫酸法/UV 検出法により評価した。¹³⁾

また、 β -CD を固相に担持することによる Se(IV)-DAN 蛍光増強の確認実験には、 C_{18} 修飾薄層クロマトグラフィー用プレート(メルク製 RP18F, $4.5 \times 4.5 \text{ cm}$)を用いた。なお、実験条件は以下の通りである。TLC プレートをメタノール、Milli-Q 水、及び 15 mmol L^{-1} β -CD 水溶液の順に浸漬した。その後、 2.5 mg L^{-1} Se(IV)を含む DAN 溶液に TLC を浸漬し、乾燥させた。乾燥後、薄層部分を削ぎ落とし、ペレットを作成し、蛍光分光光度計($\lambda_{\text{ex}}=375 \text{ nm}$)にて測定した。 β -CD 未浸漬のペレットと比較し、 β -CD 修飾による固相の蛍光増強効果を調査した。

2.3. マイクロリアクタカラムを用いる Se(IV)-DAN 蛍光着色長の測定

マイクロリアクタカラム (長さ 50 mm、幅 0.9 mm、深さ 0.5 mm) 内に C_{18} シリカゲル(和光純薬製 Wakogel 100C18、粒径 63-212 μm 、カラムクロマトグラフ用)を充填した。メタノール、Milli-Q 水の順に通液した後、 15 mmol L^{-1} β -CD をさらに 2 mL 通液して、 C_{18} シリカゲル上に β -CD を疎水吸着させた。この β -CD 修飾 C_{18}

固相マイクロリアクタカラムに 0, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV)-DAN を 10 mL 通液した。ブラックライト($\lambda_{\text{ex}}=365 \text{ nm}$)を照射し、蛍光着色長を目視観察した。蛍光着色長の客観評価のために、マイクロリアクタカラムをデジタルカメラで撮影した画像をパソコンに取り込み、RGB 表色系として数値化した。

3. 結果と考察

3.1. β -CD の固相への修飾効果

固相上の強い蛍光は直接的に目視感度の向上につながる。そこで、Se(IV)-DAN の蛍光分析において一般的に蛍光増強剤として使用される β -CD の固相への修飾効果について確認した。マイクロカラムの充填剤に利用する固相を作製するにあたり、オクタデシル基(C_{18})修飾シリカゲル微粒子充填カラム上に β -CD 水溶液を通液することで β -CD を疎水性吸着させた。まず、 C_{18} 修飾シリカゲル微粒子への β -CD の最大吸着量についてフェノール硫酸法にて求めたところ、 β -CD 最大吸着量は 3 mmol g^{-1} であった。この条件で作製した固相に Se-DAN を塗布した際の固相の蛍光スペクトル測定を行った。その結果を Fig. 1 に示す。 β -CD 修飾固相では、 β -CD 未修飾固相と比較して Se(IV)-DAN の蛍光が強いことが確認された。Se(IV)-DAN の蛍光は β -CD と界面活性剤の共存下で強く蛍光増強されることが知られている。¹⁴⁾ 蛍光増強メカニズムとしては、直鎖アルキル分子が β -CD 分子の内部に包接され、 β -CD 内部の疎水場が強化されることで、蛍光が増強されるものと考えられている。したがって、 C_{18} 固相上のオクタデシル基が β -CD 内部に包接され、そこに Se-DAN が保持されることで、蛍光が増強されたものと考えられる。

3.2. マイクロカラムを用いる Se(IV)-DAN 蛍光着色長の測定

着色長へのカラム内径の影響を調査した。ここでは、カラム幅を一定とし、切削深さを変えることにより内径を変化させた。カラム長さ、幅はそれぞれ 50 mm と 0.9 mm、Se(IV)溶液の濃度・通液量はそれぞれ $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 、10 mL で固定した。その結果を Fig. 2 に示す。Fig.

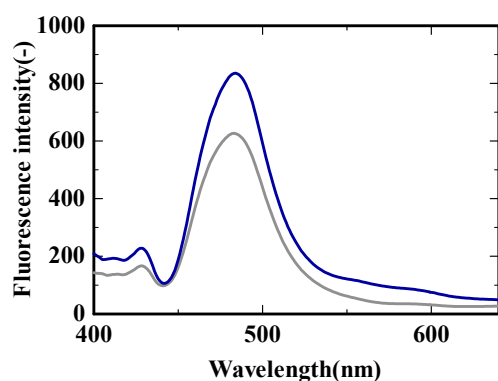


Fig. 1 Fluorescence spectra of Se(IV)-DAN on the C₁₈ silicagel microbeads with and without β-CD.

The sample was 2.5 mg L⁻¹ Se(IV) containing DAN solution.

Modified amount of β-CD was 3mmol g⁻¹.

Black and gray line indicate the spectrum observed on C₁₈ silicagel microbeads with and without β-CD, respectively.

The excitation wavelength was set at 375 nm.

2 (A)に示したように、マイクロリアクタ内径の増加に伴い着色長は短くなった。内径の増加に伴って単位長さあたりの充填剤量の増加するため、長さあたりのSe(IV)-DANの吸着量も多くなるため、Se濃度と試料注入量が一定条件では着色長が短くなったものと考えられる。この結果は、低濃度試料を対象とする場合、内径の細かいカラムを使用すれば、十分な着色長を得ることができ、感度を高くなることも示唆している。ただし、内径が細くなるほど、試料通液時の圧力が高くなること、充填剤の目詰まりによる試料通液のスタックなどが頻発する。したがって、本研究では、カラム深さを0.5 mmとして以後の研究を行った。また、試料注入速度については、Fig. 2(B)に示したように試料注入速度が0.5 mL min⁻¹付近で着色長はほぼ一定となった。

Fig. 3にデジタルカメラで撮影した蛍光着色のマイクロカラムイメージ及び着色長とRGB表色系の色彩強度との相関図を示す。なお試料注入速度1 mL min⁻¹、カラム深さ0.9 mmとして、Se(IV)濃度100 μg L⁻¹で実験を行った。暗室下、目視では20 mm前後で黄色から

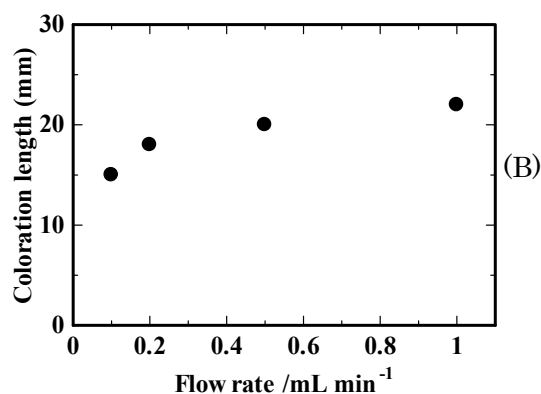
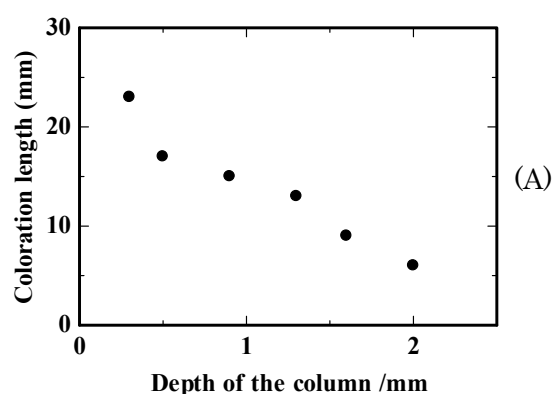


Fig. 2 Dependences of depth of the microcolumn (A) and flow rate of the sample (B) on the coloration length.

A sample of 10 mL of 100 μg L⁻¹ Se(IV) containing DAN solution was loaded to the microcolumn.

The excitation wavelength was set at 375 nm.

薄桃色への色彩変化を視認できる(Fig. 3(A))。また、Fig. 3(B)に示したようにRGB表色系では、G、B値に比べR値が色彩変化と良い相関にあることが判明した。これ以降の実験では着色の閾値をR値>150と定義した。

試料注入速度1 mL min⁻¹、カラム深さ0.9 mmとして、Se(IV)濃度10~250 μg L⁻¹間での着色長と濃度の相関を調査した。Fig. 4に着色長と濃度の相関を示す。着色長はSe(IV)の濃度増加に応じて伸長した。さらに、30~150 μg L⁻¹の範囲でR²=0.9₈と良好な直線性を示した。なお、100 μg L⁻¹Se(IV)時の着色長は、19.3±3.8 mmであった。また、検出限界としては、カラム入り口からの距離1 mmにおいて、R値150以上の値を与える濃度と定義した。その結果、20 μg L⁻¹ではR値120 ±10、30 μg L⁻¹でR値160 ±10 (n=3)であったため、本分析

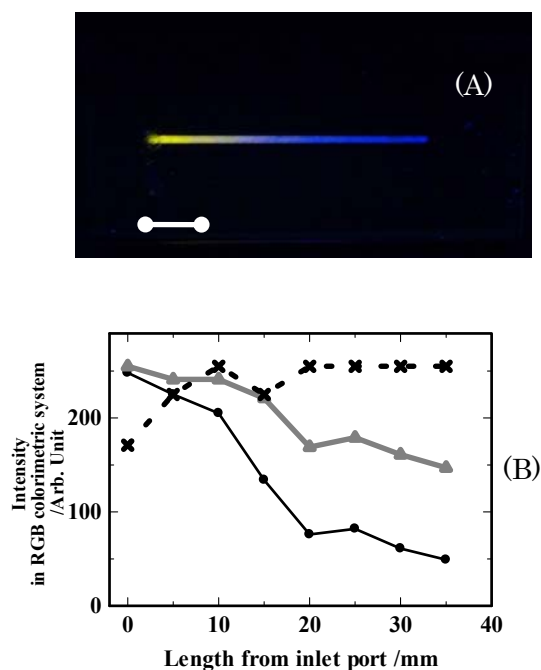


Fig. 3 Image of the coloration of the microcolumn (A) and relationship between intensity of color index in RGB colorimetric system and length from the inlet port of the microcolumn (B).

A sample of 10 mL of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV) containing DAN solution was loaded to the microcolumn.

The excitation wavelength was set at 375 nm.

The bar in Fig. 4 (A) indicates 10 mm of the length.

法における検出限界は 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ と決定された。

妨害物質の影響については、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 NO_3^- 、 Cl^- などの環境水中で主成分となるイオン種についてはそれらの存在濃度域でほとんど妨害が見られなかった。一方、 Fe^{2+} 、 NO_2^- 、 Cr(VI) が強く妨害した。 Fe^{2+} については DAN 溶液に添加した EDTA によりマスキング可能である。¹⁵⁾また、 NO_2^- については試料溶液を穏和に 2 分程度沸騰させることで妨害の抑制が可能であるとの報告がある。¹⁰⁾ Cr(VI) では蛍光波長 400 nm 付近に大きな妨害が現れるが、この妨害の発現機構が今のところ不明であるため、効果的なマスキングについては今後検討の必要がある。

実試料として水道水を用いて分析を行った。Se(IV)を水道水に既知濃度添加し、その際の着色長を純水への添加時と比較した。50、100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 時それぞれで着

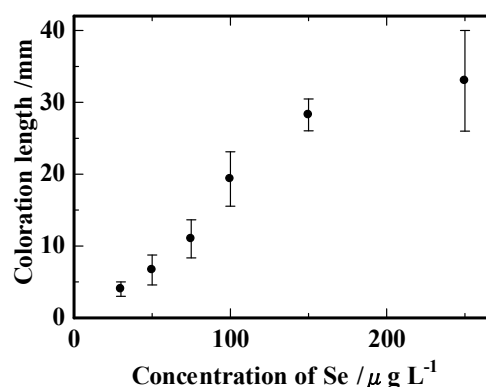


Fig. 4 Calibration curve in this determination method based on coloration length of microcolumn with visible fluorescence

A sample of 10 ml of Se(IV) containing DAN solution was loaded to the microcolumn.

The excitation wavelength was set at 375 nm.

色長の比(水道水試料/純水試料)が 1.07 ± 0.48 、 1.00 ± 0.27 であり、この Se 濃度範囲では水道水中に存在する成分が着色長に影響を与えないことが判明した。

4. 結言

セレン(IV)のマイクロカラム着色に基づく目視蛍光定量法を開発した。その結果、疎水性固相である C_{18} への $\beta\text{-CD}$ の修飾が、固相表面での Se(IV)-DAN の蛍光増強効果をもたらすことが判明した。固相上の Se(IV)-DAN の着色は、暗室下で薄桃色として視認可能であり、デジタルカメラ撮影のイメージを RGB 表色系として指標化すると、R 値と着色がよく相関することが判明した。着色長とマイクロカラムの内径は逆相関があり、また、流速は 0.5 mL min^{-1} 以上でほぼ着色長は一定となった。また、充填したカラムでは、Se(IV)の濃度に応じた着色長の伸長が見られた。実試料として、水道水に Se(IV)を添加し、純水添加時との着色長を比較したところ、ほぼ同一の着色長が得られた。検出限界は 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ であり、本法は簡易定量ながら、排水基準である 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ をクリアできる分析方法である。また、本法の検出限界値は誘導結合プラズマ発光分析法 (60 $\mu\text{g L}^{-1}$)、フレイム原子吸光分析法 (70 $\mu\text{g L}^{-1}$) などの機器分析とほぼ同等の検出限界を持つことが明

らかとなった。¹⁶⁾さらに本法は、マイクロカラム上で着色長を視認する簡易デバイスとしてだけでなく、機器測定の前処理用の分離濃縮デバイスとしても機能できるものと考えている。すなわち、1次スクリーニングを着色長で確認し、疑わしい(興味のある)サンプルについては、吸着した Se(IV)-DAN をメタノールなどで溶出し、蛍光分光器あるいは ICP-MS などで分析するという事も可能である。このようなデバイスは環境試料の1次スクリーニングと2次精密分析をつなぐデバイスとして位置づけることが出来る。

謝辞

本研究は、平成 22 年度工学部研究プロジェクトによる研究結果の一部をまとめたものです。研究助成を賜りました関係各位に深く感謝の意を表します。

参考文献

- (1) H. Haraguchi, *Metallomics as integrated biometal science*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 5-14.
- (2) A Kassu, T. Yabutani, Z.H Mahmud, A Mohammad, N Nguyen, B. M. Huong, G .Hailemariam, E. Diro, B. Ayele, Y. Wondmikun, J. Motonaka and F. Ota, *Alterations in serum levels of trace elements in tuberculosis HIV infection*, *Eur. J. Clin. Nutri.*, 2006, 60, 580--586.
- (3) N. V. Nhien, N. C. Khan, T. Yabutani, N. X. Ninh, A. Kassu, B. T. M. Huong, T. T. Do, J. Motonaka and F. Ota, *Serum levels of trace elements and iron deficiency anemia in adult vietnamese*, *Biol. Trace Element Res.*, 2006, 111, 1-10.
- (4) N. V. Nguyen, T. Yabutani, N. C. Khan, K. N. B. Le, N. X. Ninh, C. T. K. Le, J. Motonaka and Y. Nakaya, *Association of low serum selenium with anemia among adolescent girls living in rural Vietnam*, *Nutrition*, 2009, 25, 6-10.
- (5) N. V. Nguyen, K. C. Nguyen, T. Yabutani, C. T. K. Le, K. N. B. Le, J. Motonaka and Y. Nakaya, *Relationship of low serum selenium to anemia among primary school children living in rural Vietnam.*, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, 2008, 54, 454-459.
- (6) H. Li, Y. Luo, Z. Li, L. Yang, Q.Wang, *Nanosemiconductor-Based Photocatalytic Vapor Generation Systems for Subsequent Selenium Determination and Speciation with Atomic Fluorescence Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 2012 in press.
- (7) D. Rahmi, Y. Zhu, T. Umemura, H. Haraguchi, A. Itoh, K. Chiba, *Determination of 56 elements in lake Baikal water by high-resolution ICP-MS with the aid of a tandem preconcentration method* *Anal. Sci.*, 2008, 24, 1513-1517.
- (8) Kyoritu Chemical Check Laboratory Corporation web site, <http://kyoritsu-lab.co.jp/english/index.htm>
- (9) Y. Suzuki, N. Hasegawa, and S. Kawakubo, *Development of a Simple and Low-cost Device for Fluorometric Determination of Selenium in Water Samples*, *Anal. Sci.*, 2010, 26, 713-723.
- (10) A. M. Serra, J. M. Estela, B. Coulomb, J. L. Boudenne, V. Cerdà, *Solid phase extraction – Multisyringe flow injection system for the spectrophotometric determination of selenium with 2,3-diaminonaphthalene*, *Talanta*, 2010, 81, 572-577.
- (11) T. Yabutani, A. Iinuma, M. Yokota, H. Kishimoto, J. Motonaka, Y. Hayashi, *Development of a visual fluorometric determination method for selenium in environmental water samples*, *Tokushima Daigaku Daigakuin Soshitekunosaiensu Kenkyubu Kenkyu Hokoku*, 2008, 53, 46-51
- (12) K. Hiraki, O. Yoshii, H. Hirayama, Y. Nichikawa, T. Shigematsu, *Fluorometric determination of selenium in sea water*, *Bunseki Kagaku*, 1973, 22, 712-718.
- (13) M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*, *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350-356
- (14) Y-X. Zheng and D-H Lu, *Synergistic enhancement of the fluorescence intensity of 4,5-benzopiaselenol by surfactants and β -cyclodextrin in aqueous solution*, *Mikrochim. Acta*, 1992, 106, 3-9

(15) X. Huang, N. Jie, W. Zhang, Y. Yin and H. Shao, Study on the spectrophotometric determination of micro amounts of selenium(IV) with 2,3-diaminonaphthalene in the presence of sodium dodecylsulphate, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 354, 195-199.

(16) The Guide to Techniques and applications of atomic spectroscopy, Perkin-Elmer, Aug. 1985, p.5.