ノ ー ト*

2,3-ジアミノナフタレンを用いる蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる鉄鋼中の微量セレンの定量

村本 太平¹, 嶋原 正太¹, 清水 得夫¹, 上原 伸夫^{®2}

Fluorometric Determination of Trace Amounts of Selenium in Steel by High-Performance Liquid Chromatography with 2,3-Diaminonaphthalene

Taihei MURAMOTO¹, Shota SHIGIHARA¹, Tokuo SHIMIZU¹ and Nobuo UEHARA²

¹ Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Utsunomiya University, 7-1-2, Yoto, Utsunomiya-shi, Tochigi 321-8585

² Graduate School of Engineering, Utsunomiya University, 7-1-2, Yoto, Utsunomiya-shi, Tochigi 321-8585

(Received 14 April 2005, Accepted 27 July 2005)

A novel method for the determination of trace amounts of selenium in iron and steel has been demonstrated by a HPLC using 2,3-diaminonaphthalene (DAN) as a derivatizing reagent. Certified reference materials of iron and steel were used to prepare digestive samples by decomposition with hydrochloric acid and nitric acid followed by phosphoric acid huming. Selenium(IV) in the digestive samples was extracted with DAN into cyclohexane. The 100 µl of cyclohexane phase was injected into the HPLC with fluorometric detection. Cyclohexane - tetrahydrofuran (90 : 10 v/v) mixture was used as an eluent and effluent was monitored at 380 nm and 530 nm as excitation and emission wavelength, respectively. A linear calibration was observed in the selenium concentration range from zero to 6.0 ng/ml. The detection limit (3σ) of Se(IV) was 0.12 ng/ml, which corresponded to 0.12 ppm in iron and steel samples. The good agreement between determined values with both the proposed method and GD-MS indicates that the proposed method is of great promise for the determination of selenium present in iron and steel.

Keywords : 2,3-diaminonaphthalene; selenium; HPLC; iron and steel; determination.

1 緒 言

高純度鉄中に微量の元素を添加する方法は、鉄鋼材料の高性能化を図る有効な手段の一つとして古くから用いられている。例えば、鋼に微量のセレンを添加することにより、鋼材としての被削性が向上することが知られている。このため、セレンは快削鋼や快削ステンレス鋼用の添加剤として用いられている。快削鋼や快削ステンレス鋼におい

て、その被削性を制御するためには、セレンの添加量を ppm レベルで制御する必要がある¹⁾。このことから、他の微量元素と同様に鉄鋼試料中に含まれる微量セレンの高感度かつ高精度な定量法の開発が望まれている。

鉄鋼中に含まれる微量セレンを定量する方法として、現在、原子スペクトル法が最も有効な分析法としては用いられている。例えば、黒鉛炉原子吸光分析と共沈法とを組み合わせることにより、鉄鋼試料の分解液中に含まれるセレンが定量下限 0.02 µg/g で定量されている²⁾。また、高出力窒素マイクロ波誘導プラズマ発光分析 (N₂-MIP-AES) では、試料導入法に水素化物発生法を用いることによって、セレンの検出限界として 0.86 ng/ml が達成されてい

* 若手研究者の初論文特集

¹ 宇都宮大学工学部応用化学科: 321-8585 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2

² 宇都宮大学大学院工学研究科エネルギー環境科学専攻科: 321-8585 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2

る³⁾。

一方、原子スペクトル法によって得られる測定値の信頼性を保証する上で、原理の異なる分析法によるクロスチェックは重要かつ不可欠である。吸光光度法は信頼性の高いセレン分析法として古くから用いられており、有力なクロスチェック法になりうるものと考えられる。例えば、JISでは、鉄鋼中の微量セレンの測定法として2,3-ジアミノナフタレン (DAN) を用いる抽出吸光光度法が規定されている⁴⁾。この分析法では比較的簡便な操作で、10～400 µg/g のセレンを含む鉄鋼試料に適用できる。しかし、この方法の適用範囲では、原子スペクトル分析法のクロスチェックを行うことは難しい。一般に、吸光光度法を鉄鋼中の微量元素の定量に適用するのは、感度の点から困難である。

さて、DAN はセレンの抽出吸光光度法用の試薬としてだけでなく、蛍光比色試薬としても優れている。このため、鉄鋼分析に使用されるほか、海水⁵⁾、地下水⁶⁾、堆積物⁷⁾中に含まれるセレンの定量に用いられてきた。また、DAN は微量セレンを定量するための蛍光検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用誘導体化試薬としても検討され⁸⁾、蛍光検出 HPLC により降水⁹⁾、海水¹⁰⁾、土壌¹¹⁾中のセレンが定量されている。DAN を誘導体化試薬とする蛍光検出 HPLC の感度は、抽出吸光光度法の感度を^{りょうが}はるかに凌駕し、原子スペクトル分析法の感度に匹敵する^{8)～11)}。そこで、ここでは、JIS 法に規定されている抽出吸光光度法と同程度の簡便さで、原子スペクトル分析法のクロスチェック法になりうる鋼中セレンの定量法を開発するために、DAN を誘導体化試薬とする蛍光検出 HPLC について検討した。

2 実 験

2・1 装置及び試薬

HPLC 装置は、プランジャー型ポンプ (日立製, L-6000 型)、サンプルインジェクター (Rheodyne 製, 7125 型, 100 µl サンプルループ)、カラムオープン (島津製, CTO-10AS VP 型)、蛍光分光検出器 (島津製, RF-10AXL)、記録計 (島津製, R-1231 型) から構成した。カラムは Mightysil RP-18 GP (関東化学製, 150 mm × 4.5 mm i.d., 粒子径 5 µm) を使用した。流量は 1.0 ml/min とし、励起波長及び検出波長はそれぞれ 380 nm, 530 nm とした。溶離液には、シクロヘキサンとテトラヒドロフランとの混合溶媒 (90:10) を用いた。

セレン標準溶液は、1000 mg/l セレン標準原液 (関東化学製) を必要に応じて適宜希釈して用いた。0.1% DAN 溶液は、DAN (Acros 製) 0.05 g 及び塩化ヒドロキシルアンモニウム (和光純薬製) 0.5 g を 0.1 M 塩酸 50 ml に加え、50℃ で 20 分間加温溶解した。冷却後、蛍光性不純物を除

去するために、DAN 溶液 50 ml 及びシクロヘキサン 25 ml を 100 ml 容分液漏斗に入れ、振り混ぜた後、蛍光性不純物を取り込んだシクロヘキサン相を捨てた。この操作を更に 2 回繰り返した。DAN 溶液は、毎回、使用の都度調製した。

テトラヒドロフランは高速液体クロマトグラフィー (関東化学製) を、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸は、電子工業用試薬 (関東化学製) を用いた。エチレンジアミン四酢酸・2 ナトリウム塩 (EDTA) (同仁化学製) は、試験研究用試薬を用いた。シクロヘキサン (関東化学製) は、蒸留精製したものを用いた。鉄鋼標準認証物質には日本鉄鋼連盟の鉄鋼認証標準物質 JSS001-4, JSS003-4, JSS173-5, 米国標準技術局 (NIST) の鉄鋼認証標準物質 1765 を用い、その他の試薬は分析試薬級のものを用いた。また、水は蒸留後、脱イオン化したものを Milli-Q 超純水製造装置 (Millipore 製) で精製したものを用いた。

2・2 鉄鋼の湿式分解と定量操作

鉄鋼試料 0.1 g を混酸 (濃塩酸 1.0 ml + 濃硝酸 1.0 ml) で加熱溶解した。放冷後、濃硫酸 0.2 ml 及び濃リン酸 0.2 ml を加え、硫酸白煙が生じるまで再び加熱した。残渣を室温まで放冷した後、濃リン酸 0.66 ml と少量の水を加えて完全に溶解させた。これを水で 100 ml としたものを鉄鋼分解液として用いた。

遠心沈殿管に鉄鋼分解液 1 ml, 0.2 M リン酸 4.5 ml 及び 0.5 M EDTA 水溶液 1.0 ml を入れ、水で 10 ml とした。その後、0.1% DAN 溶液 10 ml を加え、5 分間振り混ぜ、更にシクロヘキサン 10 ml を加えて振り混ぜることによって、4,5-ベンゾピアセレノールを有機相に抽出した。有機相を 100 µl HPLC に注入した。

3 結果及び考察

3・1 抽出及び HPLC の測定条件

鉄鋼分解液中のセレンの抽出は、JIS に準じて⁴⁾シクロヘキサンを抽出溶媒として用いた。シクロヘキサンは 4,5-ベンゾピアセレノール (セレン-DAN 錯体) の最適抽出溶媒であり、4,5-ベンゾピアセレノールはシクロヘキサン中において強い蛍光を示す。

HPLC の測定条件を検討するにあたって、移動相の組成は分析対象物の保持、注入する測定液との適合性などの点から、最も重要な条件の一つである。ここでは、鉄鋼分解液をシクロヘキサンで抽出したものを直接、HPLC に注入する時の、最適なシクロヘキサンとテトラヒドロフラン混合率 (以下、シクロヘキサン分率) を検討した。シクロヘキサン分率は 4,5-ベンゾピアセレノールのピーク高さ及び保持時間にほとんど影響を与えなかった。一方、試薬空試験のピーク形状はシクロヘキサン分率に大きく影響を受け

Fig. 1 Chromatograms of reagent blank of 2,3-diaminonaphthalene with various cyclohexane-tetrahydrofuran mixtures used as eluents

Mobile phase: cyclohexane-tetrahydrofuran (v/v) {(1) 70:30, (2) 75:25, (3) 80:20, (4) 85:15, (5) 90:10}; Flow rate: 1.0 ml/min; Column: Mightysil RP-18 GP(150 mm × 4.5 mm i.d.); Fluorescent detector: excitation 380 nm, emission 530 nm, Injection volume: 100 µl

た. この結果を Fig. 1 に示す. DAN が分解して生成する蛍光性不純物による空試験ピークは, シクロヘキサン分率の上昇 (すなわち, テトラヒドロフラン分率の低下) とともに小さくなった. シクロヘキサン分率を 90% としたとき, 蛍光性不純物のピークを十分に抑えることができた. Fig. 1 を詳しく観察すると, 空試験ピーク高さの低下に伴い, わずかにテイリングが観察されるようになった. これはシクロヘキサン分率の上昇に伴う移動相の極性の低下により, 窒素原子を含有する DAN の分解物が固定相から溶出しにくくなったためであると推測される¹²⁾.

最適なシクロヘキサン分率として, 90% シクロヘキサン-10% テトラヒドロフランを移動相として用いた時に得られた 4,5-ベンゾピアセレンールのクロマトグラムを Fig. 2 に示す. ここでは, 石川ら⁹⁾の報告に基づいて, 励起波長 380 nm, 蛍光検出波長 530 nm を用いた. 4,5-ベンゾピアセレンールは約 1.8 分に鋭いピークを与えた. この条件では, 試薬空試験のピークは, 4,5-ベンゾピアセレンールのピークにわずかに (0.15 分) 遅れて溶出した. Fig. 2 に示した 4,5-ベンゾピアセレンールのピークトップ

Fig. 2 Typical chromatogram of 4,5-benzopiazselenol. Mobile phase: cyclohexane-tetrahydrofuran (90:10, v/v), Amount of selenium injected: 0.4 ng. The other conditions including detector sensitivity are the same as those in Fig. 1.

の保持時間において測定した試薬空試験のピーク高さは, 4,5-ベンゾピアセレンールのピーク高さに比べ 2.8% であった. 検量線作成においては空試験ピークをあらかじめ差し引いておくので, 空試験ピークの重なりは定量の妨害にはならなかった. また, 得られたクロマトグラムには, これら以外のピークは観察されなかった. 本法による一回の測定は 5 分以内で終了するので, 1 時間に 12 試料以上の連続測定が可能である.

3.2 検量線, 検出限界及び精度

本法の検量線はセレンの濃度 0~6.0 ng/ml の範囲において, 原点を通る良好な直線 ($R = 0.998$) となった. 試薬空試験を繰り返し 8 回測定し, 得られたピーク高さの標準偏差の 3 倍と定義した検出限界 (3σ) は 0.12 ng/ml となる. この値を, 鉄鋼分解の手順に従った場合の含有量に換算すると 1.2 µg/g となった. この値は, N_2 -MIP-AES の検出限界 0.86 ng/ml³⁾ と比べて優れており, 既に報告されている DAN を用いる蛍光検出 HPLC^{8)~11)} の検出限界と比べてほぼ同程度である. また, 検出限界の 10 倍濃度である 1.2 ng/ml における相対標準偏差 ($n = 4$) は 4.7% であった.

3.3 共存元素の影響

ここでは, 銅, バナジウム, ニッケル, モリブデン, アルミニウム, チタン, クロム, マンガン, コバルト, ジル

Table 1 Effect of molar ratio of diverse elements on relative fluorescent intensity for 4,5-benzopiazselenol

Element	Molar ratio ([Element]/[Se])							
	0	10	25	50	100	1×10^3	1×10^4	1×10^5
Cu(II)	100	95.3	89.7	86.4	74.1	—	—	—
	100	(98.3)	(101.6)	(99.0)	(103.7)	—	—	—
V(V)	100	—	—	100.7	92.9	—	—	—
	100	—	—	(104.2)	(84.4)	—	—	—
Ni(II)	100	—	—	97.6	94.8	—	—	—
	100	—	—	—	(105.0)	—	—	—
Mo(VI)	100	—	—	103.0	94.8	—	—	—
	100	—	—	—	(98.9)	—	—	—
Al(III)	100	—	—	—	98.5	—	—	—
Ti(IV)	100	—	—	—	96.0	—	—	—
Cr(III)	100	—	—	—	101.8	—	—	—
Mn(II)	100	—	—	—	103.8	—	—	—
Co(II)	100	—	—	—	100.1	—	—	—
Zr(IV)	100	—	—	—	96.0	—	—	—
Nb(V)	100	—	—	—	97.9	—	—	—
Fe(III)	100	—	—	—	—	102.0	87.9	—
	100	—	—	—	—	(101.5)	(99.1)	(96.2)

Se: 1.5×10^{-8} M (1.2 ng/ml), Numerical value in parenthesis denotes relative intensity obtained with 0.05 M EDTA.

Table 2 Analytical results of Selenium for certified reference materials of iron

Samples	Se added / $\mu\text{g g}^{-1}$	Se found ^{a)} / $\mu\text{g g}^{-1}$	Reference value ^{b)} / $\mu\text{g g}^{-1}$
NIST 1765	—	34.3 ± 0.4 ($n = 3$)	33.2
JSS 001-4	0	< 0.12	—
	20	18.7 ± 0.02 ($n = 3$)	—
JSS 003-4	0	< 0.12	—
	20	18.7 ± 0.02 ($n = 3$)	—
JSS 173-5	0	< 0.12	—
	20	19.2 ± 0.02 ($n = 3$)	—

a) mean $\pm$ standard deviation (number of replicate), b) Reference value is determined by GD-MS.

コニウム, ニオブ及び主マトリックスである鉄について, セレンの定量に及ぼす影響を調べた. JSS シリーズでは大部分の鉄鋼認証標準物質において, これらの元素の認証値が与えられている. 共存元素を添加しないときに得られた 4,5-ベンゾピアセノールのピーク高さを基準とし, 共存させた時のピーク高さを相対値として表した結果を Table 1 に示す. ここではセレンのみの測定溶液の蛍光強度と比較して $100 \pm 5\%$ 以内にあるとき, 妨害を受けないものとみなし, その濃度条件よりも低濃度では検討しなかった.

マスキング剤を添加しない場合, 1.5×10^{-8} M のセレンに対して, 銅は 10 倍, バナジウム, ニッケル及びモリブデンは 50 倍, 鉄を除くそれ以外の元素は 100 倍まで共存しても妨害を受けなかった. 一方, 鉄については, 10^3 倍では妨害を受けなかったが, 10^5 倍濃度では妨害を受けた. この結果から, 本法により直接, 鉄鋼分解液を測定することは難しいものと判断される. そこで, 次にマスキング剤について検討した. 鉄鋼分解液にマスキング剤として

0.05 M となるように EDTA を添加した. EDTA の添加は 4,5-ベンゾピアセノールのピークに影響を与えなかった. その一方, EDTA の添加により, 銅, ニッケル及びモリブデンについては 100 倍まで, また, 鉄については, 10^5 倍まで共存が可能となった.

3.4 鉄鋼試料の分析

本法によって鉄鋼認証標準物質を分析した結果を Table 2 に示す. 現在, セレンの認証値が与えられている鉄鋼標準物質の入手は困難である. 分析した鉄鋼認証標準物質のうち高純度鉄をベースとする JSS001-3 及び JSS003-4, 更に銅をベースとする化学分析用の JSS173-5 では, セレン含有量は検出限界以下であった. NIST1765 のセレン含有量は 34.3 ppm であり, グロー放電質量分析法 (GD-MS) による定量値 (33.2 ppm) と良く一致した. このときの相対標準偏差は 1.2% であった.

測定結果が検出限界以下となった JSS001-3, JSS003-4 及び JSS173-5 について, セレンの回収率を検討した. 結果

を Table 2 に合わせて示す. 各鉄鋼標準試料の鉄鋼分解液にセレンの含有量がそれぞれ 20 ppm (鉄鋼中の含有量として) となるように Se(IV) 標準溶液を添加し, ピーク高さから回収率を求めた. NIST1765 では, 定量値の相対標準偏差 ($n = 3$) が 1.2% であり, JSS シリーズでは回収率が 0.1 であった. この結果と N_2 -MIP-AES による定量値³⁾の相対標準偏差が 11~15% であることとを比較すると, 本法は高い再現性を有しているものと言える. また, 回収率が 93% 以上であることから, 本法は鉄鋼中のセレン定量において, 原子スペクトル法のクロスチェック法になりうるものと考えられる.

文 献

- 1) 日本金属学会, 日本鉄鋼協会編: “鉄鋼材料便覧”, p. 449 (1967), (丸善).

- 2) 高田九二雄, 芦野哲也, 板垣俊子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 383 (2001).
- 3) 中原武利, 李 一木, 竹内啓貴, 二村 実: 鉄と鋼, **85**, 13 (1999).
- 4) JIS G1233, 銅-セレンの定量方法 (1994).
- 5) 平木敬三, 由井 収, 平山 宏, 西川泰治, 重松恒信: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **22**, 712 (1973).
- 6) Y. Tamari, R. Hirai, H. Tsuji, Y. Kusaka: *Anal. Sci.*, **3**, 313 (1987).
- 7) 玉利祐三, 平木敬三, 西川泰治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **28**, 164 (1979).
- 8) Y. Shibata, M. Morita, K. Fuwa: *Anal. Chem.*, **56**, 1527 (1984).
- 9) 石川登志樹, 橋本芳一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **37**, 344 (1988).
- 10) 服部裕史, 中口 譲, 齊藤睦弘, 平木敬三: 日本海水学会誌, **55**, 333 (2001).
- 11) 山田秀和, 服部共生, 松田 聡, 康 峪梅: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 542 (1987).
- 12) J. Nawrocki: *J. Chromatogr. A*, **779**, 29 (1997).