蛍光高速液体クロマトグラフィーによる降水中の 極微量セレン(IV)及びセレン(VI)の定量

石川登志樹[®], 橋本 芳一^{*}

(1987 年 12 月 19 日受理)

降水試料中に含まれている極微量セレンの濃度を少量の降水試料を用いて測定する方法を確立した。本法によれば 2~10 ml の降水試料を用いて 10^{-12} g レベルの Se(IV 及び VI) を精度よく測定することができる。試料中の Se(IV) を 2,3-ジアミノナフタレンによって蛍光標識した後、シクロヘキサンによって抽出分離し、これを HPLC によって目的物質を分離し蛍光定量する。HPLC は固定相にオクタデシルシリカ、移動相にシクロヘキサンとテトラヒドロフランの混合溶媒 (80/20, v/v) を用いた。又、降水中に Se(IV) と共に存在する Se(VI) は、臭化水素酸を添加した後、加熱還元して Se(IV) として定量した。試料中の Se の測定値の相対標準偏差は、10 検体の試料について 4.0% であった。本法による降水中の Se の測定結果は、試料液量 400 ml を用いるコールドトラップを組み合わせた還元気化 AAS の結果との間に高い相関関係 ($r=0.96$) を示した。本法により毎時約 1.5 mm の降水中のセレン濃度を 20 分ごとに測定することができた。

1 緒 言

雨や雪などの降水は、大気中の混入物質をその降下中に捕そくするので、降水中の物質濃度の測定は大気中の物質の分布や反応などの挙動を知るうえで重要な手がかりとなる。一方、S や Te と同族のカルコゲン元素である Se は、これまでに大気、水などの環境試料について多くの測定が行われているが、一般に ppt レベルのものが多く、その定量値の報告は多くない。1965 年に Hashimoto ら¹⁾は放射化分析によって降雪中のセレンを初めて定量した。又鈴木²⁾が雨水中の Se の測定を行い、その平均濃度が 50 ng/l であることを報告しているが、これらの場合には 1 l 以上の試料を必要としている。その後の分析法の進歩によって微量 Se の定量法には、蛍光光度法³⁾や、黒鉛炉 AAS⁴⁾、還元気化 AAS⁵⁾ などが用いられるようになった。しかし、これらの方法には多量の試料を必要としたり、妨害物質の影響を無視できないなどの問題がある。中でも最も高感度な分析法として知られている 2,3-ジアミノナフタレン(DAN)を用いた蛍光定量法は、Se と DAN の反応時に生成する他の蛍光性物質を除去するための煩雑な操作を必要とする

ので操作を簡略化することが望まれる。例えば、Se と DAN の錯体であるピアセレンノールを TLC を用いて他の妨害物質から分離した後、蛍光定量する方法が、生体試料中の Se の定量に用いられ良好な結果⁶⁾が報告されている。又 Shibata ら⁷⁾は、蛍光検出器を備えた HPLC 装置を用いて水道水中の Se の分離定量を、山田ら⁸⁾は土壤中 Se の定量を行っており、極微量の Se を少量の試料で pg 程度まで定量可能であると報告している。

本研究では降水中の極微量 Se 濃度変動を価数別に迅速に定量するために、Se を DAN と反応させた後、蛍光検出 HPLC で妨害物質を分離して定量する方法について、その諸条件、特に移動相の組成について検討を行った。固定相には汎用性の高いシリカ-ODS を、移動相にシクロヘキサンとテトラヒドロフラン (THF) の混合溶媒を用いることによって、ピアセレンノールの分離及び分析感度において良好な結果が得られた。又、注入した試料のすべての成分が約 5 分で溶出するので、多数の試料を短時間で定量することが可能であった。雨水試料について本法による定量結果と還元気化 AAS によって求めた結果との間に良好な相関が認められたので、本法を雨水中の Se(IV) と Se(VI) 濃度の経時変化の測定に適用した。

* 慶応義塾大学理工学部応用化学科 : 223 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

2 装置及び試薬

2.1 装 置

HPLC 装置は, ガスクロ工業製 UNISIL 5C18 (4.6 mm ϕ ×250 mm) のカラムを装着したガスクロ工業(株)製高速液体クロマトグラフ Model 572 を用い, 検出器は島津製作所製分光蛍光 HPLC モニター RF-535 を使用した. 励起及び蛍光スペクトルの測定には日本分光製 FP-550 型分光蛍光光度計を用いた.

2.2 試 薬

Se(IV) 標準溶液: 和光純薬工業製原子吸光用標準溶液 (1000 ppm) を適宜希釈して用いた.

Se(VI) 標準溶液: 和光純薬工業製のセレン酸ナトリウム 0.2659 g を水に溶解し全容を 100 ml とした溶液 (1000 ppm) を適宜希釈して用いた.

0.1 M EDTA-NaF 溶液: 3.72 g の EDTA·2Na と 0.42 g のフッ化ナトリウムを 100 ml の水に溶解して用いた.

0.1% DAN 溶液: Aldrich 製 2,3-ジアミノナフタレン 0.10 g を, 塩酸 ヒドロキシルアミン 0.50 g を含む 0.1 M 塩酸 100 ml に溶解したものを使用した. 本溶液は毎回使用直前に調製した.

2.3 定量操作

Se(IV) の測定操作は次のとおりである. まず試料溶液 2~10 ml を 25 ml 共栓付き試験管に取り 0.1 M EDTA-NaF 溶液を 1 ml 加え, 塩酸が 0.1 mol/l になるように塩酸を加える. これに 0.1% DAN 溶液を 3 ml 加え, 水浴上 50°C にて 20 分間加温した後, シクロヘキサン 1 ml と振り混ぜ, 生成したピアセレノールを抽出する. 抽出液の 100 μ l を蛍光 HPLC システムに導入し測定を行う. 固定相に UNISIL ODS カラムを, 移動相にはシクロヘキサンと THF の混合溶液 (80/20, v/v) を用いて, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 530 nm で定量を行う.

Se(VI) を定量するには試料溶液 10 ml を還流冷却管付きナス型フラスコにとり, 47% 臭化水素酸 6 ml を加えて 96°C で 30 分間加熱することによって四価に還元した後, Se(IV) の定量的場合と同様の操作を行う.

3 結果と考察

3.1 HPLC の移動相の条件

DAN 試薬と Se との錯体であるピアセレノールの各種溶媒中での励起及び蛍光スペクトルを Fig. 1 に示した. Fig. 1 は HPLC の移動相として一般的に用いられているアセトニトリルと, ピアセレノールの最適抽出溶媒であるシクロヘキサン溶媒中での励起及び蛍光スベ

クトルとを比較したものである. ピアセレノールは抽出溶媒の種類, 組成によって, 蛍光極大波長や蛍光強度が異なり, アセトニトリル中における蛍光強度はシクロヘキサン中の約 4 分の 1 程度となっている. これはピアセレノールの溶媒への溶解性から起因するものと考えられる. 従ってシクロヘキサンを HPLC の移動相として用いることが分析感度の点から見て最適であると考えた. しかし, 固定相として最もは用性の高い ODS を使用する場合には, 一般にはアセトニトリルのような極性溶媒を使用し, シクロヘキサンのような非極性溶媒は適していない. そこで固定相に ODS を用いた HPLC の移動相として使用可能であり, かつピアセレノールの蛍光強度の高い溶媒を得るために, シクロヘキサンに極性溶媒を混合した種々の溶媒⁹⁾を検討した. 実験例によれば, 芳香族化合物の分離の際, 分離時間を縮めるためにシクロヘキサンに THF を混合した溶媒を移動相として用いることによって, 良好な分離が達成されている¹⁰⁾ことから, 本研究においてこれをピアセレノールの分離に適用した. この場合の蛍光強度は Fig. 1 の (3) に示したようにシクロヘキサン 100% と比較して数% 程度の低下が見られるだけであった.

Fig. 1 Excitation and emission spectra of Se-DAN complex

(1) in cyclohexane, (2) in acetonitrile, (3) in cyclohexane/tetrahydrofuran (80/20, v/v)

移動相の組成を変化させた場合のピアセレノールの HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示した. (a) はアセトニトリル 100%, (b) (c) はシクロヘキサンと THF の混合溶媒で, 混合比は体積比で (b) が 80:20, (c) が 50:50 である. シクロヘキサンと THF の混合溶媒において, THF の比率が増加し 40% 以上になると (c) のようにピアセレノールの分離は不完全で, 蛍光強

Fig. 2 Chromatogram of Se-DAN complex

Column: UNSIL ODS 4.6 mm ϕ $\times$ 250 mm;
Flow rate: 1.0 l/min; Detection: fluorescence
(Ex.: 380 nm, Em.: 530 nm). (a) acetonitrile;
(b) cyclohexane/THF (80/20); (c) cyclohexane/THF (50/50)

度も低下する。又 THF の比率を低下させると感度は多少上昇するが目的物質がカラム内に保持され、溶出時間が長くなる。そこで移動相の最適組成を検討した結果、(b) に示したような混合溶媒 (80:20) を用いることにした。この組成の溶離液の最適励起波長は 378 nm、蛍光極大波長は 530 nm であった。しかし、HPLC-蛍光検出器の波長設定の都合を考慮して励起波長は 380 nm として測定を行った。又流速はカラム圧などを考慮して 1.0 ml/min としたところ、保持時間が約 4.0 分の位置にピアセレンールのピークが認められ、他の蛍光性物質 (DAN と考えられる) も 5 分程度ですべてが溶出するため、短時間に多くの試料の定量が可能であった。山田ら⁸⁾の方法ではピアセレンールの分離は非常によいが、HPLC に注入した試料がすべて溶出するのに 10 分以上を要している。これに対し本法は降水試料のように一度に多数の試料を採取し、迅速かつ蛍光強度の低下が誤差範囲を超えない時間内に定量しなければならない場合などにおいて有効である。例えば試料を前処理後 HPLC によって連続的に測定する場合、約 4 分ごとに試料を注入することができ、1 時間に 15 試料以上の測定が可能である。(a) のアセトニトリル 100% を移動相として用いた場合と比較しても (b) のほうが感度、分離及び分析時間などの点でかなり良好な結果が得られていることが分かる。

3.2 Se(VI) の定量

DAN 試薬は Se(IV) のみと定量的に反応するため、

Se(VI) は Se(IV) に還元して定量する。Se(VI) の還元法としては塩酸及び塩酸-臭化カリウムなどによる加熱還元が多く用いられているが⁹⁾、Se を DAN と反応させる際、試料溶液の pH を 1 に調整しなければならないので、還元時の酸濃度を高くすることは好ましくない。還元剤として塩酸を使用するときには 4 M 以上の濃度を必要とするので、より低い酸濃度で使える還元剤が望ましい。ここでは Shibata ら⁷⁾が用いた臭化水素酸による加熱還元法を採用した。Fig. 3 に臭化水素酸濃度の Se(VI) の還元率に及ぼす影響について検討した結果を示した。Fig. 3 は、実試料 (雨水) 10 ml に 47% 臭化水素酸を 4.0 ml 以上加え 2.2~4.0 M 臭化水素酸で加熱還元を行うとほぼ 100% の還元率を示す。そこで本研究においては 3.1 M 臭化水素酸 (47% HBr: 6 ml) で還元を行うこととした。

Fig. 3 Effect of the concentration of acid for reduction of Se(VI) to Se(IV)

Sample solution: snow melt spiked with 0.5 ng of Se(VI)/10 ml; Reduction: 30 min at 96°C

次に臭化水素酸による還元における Se(VI) の還元率に及ぼす還元時間の影響について検討した結果を Fig. 4 に示す。還流冷却管付きナス型フラスコに試料 10 ml と 47% 臭化水素酸 6.0 ml を加え、90°C で 0~60 分還元時間を変化させて検討を行った結果、Fig. 4 に見られるように 20 分以上ではほぼ 100% に近い還元率を示したので本研究では 30 分間の加熱による還元を行うこととした。

3.3 分析感度及び精度

本分析法の全過程における Se の損失を調べるために、添加回収実験を行った結果を Table 1 に示した。東京及び横浜地区において採取した降雪試料を溶解した

Fig. 4 Reduction of Se(VI) to Se(IV) by HBr with time

Sample solution: snow melt spiked with 0.5 ng of Se(VI)/10 ml; Reduction: 3.1 M HBr at 96 °C

Table 1 Recovery test of Se(IV) added in snow samples by the present method

Sample		Se(IV) added/ ng	Se(IV) found/ ng	Recovery, %
Site	Date			
Yokohama (Hiyoshi)	87. 3. 8	0	0.33	—
		0.5	0.81	97
		1.0	1.29	97
		2.0	2.21	94
Tokyo (Todoroki)	87. 1. 5	0	0.42	—
		1.0	1.55	109
	87. 2. 2	0	1.32	—
		0.4	1.68	97

Sample volume: 10 ml

後, メンブランフィルター (Millipore HA, 0.45 μ m) によってろ過したもの 10 ml に, Se(IV) を 0.4~2.0 ng 加え, 先に示した分析操作に従って定量を行った。Table 1 に示すように本実験の結果では 100% に近い回収率を示したので, 本分析法では全操作を通じて Se の損失が極めて少ないことが分かった。

本法の検量線は 5~200 pg の範囲において原点を通る良好な直線を与え, 降雪試料 (Se: 0.42 ng/10 ml) 10 回の繰り返し精度は 4.0% (相対標準偏差) であった。

3.4 還元気化 AAS とのクロスチェック

本分析法による雨水中の Se の定量値と還元気化 AAS によって求めた値とのクロスチェックを行った結果を Fig. 5 に示した。還元気化 AAS は田中ら⁴⁾のゴールドトラップを組み合わせた還元気化 AAS による天然水中の Se の定量法を降水に適用した。試料 400 ml に 0.2

M EDTA 溶液を 20 ml, 12 M 塩酸を 40 ml 加え一晩放置した後, 10% テトラヒドロホウ酸ナトリウム 7.5 ml を用いて Se(IV) をセレン化水素に還元気化し, 原子吸光測定した。Fig. 5 に示すように本分析法による結果と還元気化 AAS による結果の間には良い相関関係 ($r=0.96$) が認められた。ちなみに田中ら⁴⁾は, 試料量を 400 ml としている。本分析法では 10 ml の試料中のセレンの定量を行うことが可能であり, 還元気化 AAS と比較して数十倍の感度を有し, このことは微量 Se の分析法として広く応用できることを示唆している。

3.5 降水中セレン濃度の変動

本法の応用例として, 横浜市港北区日吉において雨水を降り始めから 20 分ごとに採取し Se の濃度変化を測

Fig. 5 Comparison of the results of Se determination by the present method with those by conventional hydride generation/AAS method

Fig. 6 Concentration change of Se(IV) and Se(VI) in rain water samples with rainfall rate at Hiyoshi, Yokohama, Sept. 30, 1987

定した結果を Fig. 6 に示した。試料は採取後メンブロンフィルター (Millipore HA, 0.45 μ m) で吸引濾過し、試料溶液中の不溶成分を取り除いて塩酸により pH 1 に調整したものを用いた。同時に時間ごとの雨量も揚げたが、採取期間中は小雨で雨量が極めて少量の場合もあった。しかし本法においては少量の試料で測定可能なため、試料量が少ないことの測定への影響はなかった。本法によると降雨量 1 mm/h 以下の場合でも十分セレン濃度の変動を価数別に測定することができた。このほか本法は種々の応用が可能であり、特に環境試料中の微量 Se の分布の測定方法として有効であると考ええる。

(1987 年 10 月, 日本分析化学会)
(第 36 年会において一部発表)

文 献

- 1) Y. Hashimoto, J. W. Winchester : *Environ. Sci. Technol.*, **1**, 338 (1967).
- 2) 鈴木 款 : 天気, **25**, 794 (1978).
- 3) Y. Tamari : *Bunseki Kagaku*, **33**, E115 (1984).
- 4) I. H. Woo, K. Watanabe, Y. Hashimoto, Y. K. Lee : *Anal. Sci.*, **3**, 49 (1987).
- 5) 田中 茂, 中村 優, 横井英夫, 湯村正徳, 橋本芳一 : 分析化学, **35**, 116 (1986).
- 6) W. Funk, V. Dammann, T. Counturier, J. Schiller, L. Volker : *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **9**, 24 (1986).
- 7) Y. Shibata, M. Morita, K. Fuwa : *Analyst* (London), **110**, 1269 (1985).
- 8) 山田秀和, 服部共生, 松田 聡, 康 峪梅 : 分析化学, **36**, 542 (1987).
- 9) Y. Shibata, M. Morita, K. Fuwa : *Anal. Chem.*, **56**, 1527 (1984).
- 10) "LC Column Report Methods Development Guide", Du Pont Co., Instrument Products, Scientific and Process Division.

☆

Determination of trace amount of selenium (IV) and selenium(VI) in precipitation by fluorescence HPLC. Toshiki ISHIKAWA and Yoshikazu HASHIMOTO (Department of Applied Chemistry, Keio University, 3-14-1, Hiyoshi, Yokohama-shi, Kanagawa 223)

A simple and sensitive method for determination of Se(IV) and Se(VI) in rain and water samples was developed, by using reverse phase HPLC with a fluorometric detector. The sample water (2 to 10 ml) was adjusted to pH 1, then warmed with 3 ml of 0.1% 2,3-diaminonaphthalene (DAN) and 1 ml of 0.1 M EDTA-NaF at 50 °C for 20 min to form a piaseenol. The complex was extracted with 1 ml cyclohexane, and a 100 μ l portion of the extract was passed through an HPLC column (UNISIL ODS) with a mixture of cyclohexane and tetrahydrofuran (80/20, v/v) as a mobile phase. Piaseenol in the effluent was monitored with a fluorometric detector (excitation at 380 nm and fluorescence at 530 nm). Se(VI) was determined after reduction to Se(IV) by adding 6 ml of 47% HBr to 10 ml sample, and then heating at 96 °C for 30 min. The recovery of Se in this method was 98% with spiked Se(IV), 0.4~1.0 ng. The correlation coefficient of the results between this technique and AAS with the hydride generation/cold trap technique (HGAAS) was 0.96 ($n=9$). This technique was advantageous over conventional HGAAS that requires preconcentration from about 400 ml precipitation water. This technique was applied to the field experiments, and Se(IV) and Se(VI) in the precipitation were measured at every 20 min even when the rate of precipitation was less than 1 mm/h without either any pretreatment or special apparatus.

(Received December 19, 1987)

Keyword phrases

time sequence analysis; Se(IV) and Se(VI); precipitation sample; HPLC with fluorometric detector.