報 文

界面活性剤共存下における 1,10-フェナントロリンを用いる
コバルト(II) の化学発光定量渡辺 邦洋^{®*}, 山 崎 剛^{*}, 板垣 昌幸^{*}Chemiluminescence determination of cobalt(II) with 1,10-phenanthroline
in presence of surfactantsKunihiro WATANABE, Tuyoshi YAMASAKI and Masayuki ITAGAKI^{*}

^{*}Department of Industrial Chemistry, Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo,
2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278

(Received 25 March 1996, Accepted 7 May 1996)

The micellar enhanced chemiluminescence method using 1,10-phenanthroline to determine small amounts of cobalt(II) was investigated by the flow injection method. The proposed flow system is comprised of three flow lines for cobalt(II), 1,10-phenanthroline and hydrogen peroxide, respectively. The effects of cationic surfactant micelles with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), zephiramine (Zeph), cetylpyridium bromide (CPB), etc. upon the chemiluminescence (CL) determination of cobalt(II) are described. Among the examined cationic surfactants, CTAB provided the highest enhancement, with a CL intensity approximately 110 times higher than that in the absence of surfactant. The authors also investigated the mechanism of CL-enhancement by spectrophotometry and fluorometry. The role of the micelle was revealed through the 3D spectra of cobalt(II)-phenanthroline complex formation, that is, the micelle enhanced the rate of chelate reaction by concentrating Co ion as the anionic species. The formed cobalt(II) chelate was concentrated into micelles. As a result, the concentration of cobalt(II) chelate decreased to 67% in aqueous phase. The high fluorescence intensity of 3,3'-diformyl-2,2'-dipyridyl produced by the cobalt(II)-catalyzed oxidation of 1,10-phenanthroline with hydrogen peroxide was measured. It was found that the intensity of the fluorescence was enhanced 1.4 times in the presence of CTAB. The limits for the determination of cobalt(II) were 5.0 ppb (20 μ l sample injection) and 1.0 ppb (continuous sample flow at a sample feed speed of 0.8 ml/min) under the optimum conditions.

Keywords : chemiluminescence; 1,10-phenanthroline; cobalt(II); surfactant; micelle; FIA.

1 緒 言

近年, 化学発光分析 (以下 CL と略記) の用途は高

感度であることから多岐にわたり, 生化学, 臨床化学, 及び環境化学分析など広く利用されるようになった^{1)~3)}. しかし, 液相で行う CL は感度は高いが, 選択性に欠ける短所を持つ. そのため選択性改善のための反応場の検討, 酵素反応の特異性の利用などの研究が多

^{*} 東京理科大学理工学部工業化学科: 278 千葉県野田市
山崎 2641

くなされている⁴⁾⁵⁾。その中で界面活性剤分子集合体を CL の反応場とし、選択性及び感度の向上を目的とした研究が注目されている⁶⁾⁷⁾。しかし、そのメカニズムを詳細に検討した報告⁸⁾は少なく、明確な結論は得られていない。著者らは既報⁹⁾で 1,10-フェナントロリン (Phen)-H₂O₂ 系 CL においてのミセル増感効果は鉄キレート濃縮効果がその一因であることを報告した。本報では CL により Co(II) の微量定量条件を求め、更にミセル増感効果に寄与する金属の錯形成速度の促進、金属イオンの電荷、発光化学種の濃縮の観点から検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

Phen, 過酸化水素, 水酸化ナトリウム, テトラエチレンペンタミン (TEPA), 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB), ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬製 (特級) のものを用いた。ゼフィラミン (Zeph) は同仁化学製を用い、ヘキサデシルジメチルエチルアンモニウムブロミド (CEAB) は東京化成製のものを用いた。各試薬溶液はその高濃度溶液を調製し、目的に応じて再蒸留水で希釈して使用した。Co(II) は原子吸光分析用コバルト標準溶液を再蒸留水で希釈して調製した。

2.2 装 置

本報で用いた FIA システム及び検出法は既報⁹⁾と同様である。三次元スペクトル測定には島津フォトダイオードアレイ紫外・可視検出器 SPD-M6A を使用した。原子吸光測定には島津製作所製原子吸光分光光度計 AA-660G を使用した。ミセル粒子径の測定には Malvern 製 sub-micron particle analyser system 4700c 微粒子解析計を使用した。

2.3 原 理

Co(II) は Phen と容易に錯体 Co(Phen)_n^{2+} ($n=1\sim 3$) を生成する。

この Co(Phen)_n^{2+} は Cu(Phen)_n^{2+} と同様⁸⁾に接触的に過酸化水素を分解し、スーパーオキシドラジカル陰イオン ($\cdot\text{O}_2^-$) を生成させると考えられる。

この $\cdot\text{O}_2^-$ が Phen と反応し {式(6)}、1,2-ジオキセタン誘導体を生成、更に分解を経た後、励起状態の 3,3'-ジフォルミル-2,2'-ジピリジルを生成して CL が生じると推定される¹⁰⁾。

3 結果及び考察

3.1 定量条件の検討

FIA システムと各流量は既報⁹⁾とほぼ同様であり、 L_1 & L_2 : 0.4 ml/min, L_3 : 0.8 ml/min とし総流量 1.6 ml/min で行った。試薬濃度の最適条件を検討した結果は次のようであった。 L_1 中の試薬濃度は Phen $\{6.0 \times 10^{-5} \text{ M (mol/l)}\}$, 界面活性剤, 水酸化ナトリウム (0.05 M), L_2 は過酸化水素 (0.72%) であり, L_3 はキャリアー液 (蒸留水) である。このときの排水中の最適 pH は 9.5 であった。界面活性剤である CTAB は $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ から $1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$ の範囲では $7.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ のとき最大のピーク高さが得られた (Fig. 1)。サンプル量は 200 μl , 反応コイルは 40 cm で最大ピーク高さを示した。

3.2 界面活性剤の影響

特定の界面活性剤を本報の CL 系に添加すると著しく感度が増大する。これはスーパーオキシドラジカル陰イオン ($\cdot\text{O}_2^-$) がミセル界面に濃縮されて疎水性の反応場で Phen と効率よく反応することによる⁸⁾。又、界面活性剤は過酸化水素の分解で生じるヒドロキシルラジカルを捕獲することで、ヒドロキシルラジカルとスーパーオキシドラジカル陰イオンとの反応を防ぐ。更に既

Fig. 1 Effect of CTAB concentration on relative peak height
1,10-Phenanthroline: 6.0×10^{-5} M; Sodium hydroxide: 0.05 M; Hydrogen peroxide: 7.2%; Co(II): 40 ppb

Table 1 Effect of surfactants on the CL signal for Co(II)

Surfactant	Conc./ 10^{-3} M	CL intensity
None	—	1
Cationic		
DTAB[C ₁₂ H ₂₅ N(CH ₃) ₃]Br	50	50
TTAB[C ₁₄ H ₂₉ N(CH ₃) ₃]Br	35	60
CTAB[C ₁₆ H ₃₃ N(CH ₃) ₃]Br	7.5	110
CEAB[C ₁₆ H ₃₃ (C ₂ H ₅)N(CH ₃) ₂]Br	10	85
CPB[C ₅ H ₅ NCH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃]Br	1	1.4
Zeph[C ₁₄ H ₂₉ (C ₆ H ₅ CH ₂)N(CH ₃) ₂]Cl	10	80
Anionic		
SDS[C ₁₂ H ₂₅ OSO ₃]Na	5	1.2
SDBS[C ₁₂ H ₂₅ C ₆ H ₄ SO ₃]Na	5	1.2
Nonionic		
Brij35	2.5 g/100 ml	13
Triton X-100	2.5 g/100 ml	10

DTAB: dodecyltrimethylammonium bromide; TTAB: tetradecyltrimethylammonium bromide; CTAB: cetyltrimethylammonium bromide; CEAB: cetyldimethylethylammonium bromide; CPB: cetylpyridinium bromide; Zeph: zephiramine; SDS: sodium dodecylsulfate; SDBS: sodium dodecylbenzenesulfonate; Conditions—L₁: 6.0×10^{-5} M 1,10-phenanthroline; 0.1 M sodium hydroxide; L₂: 12.0% hydrogen peroxide, 20 μ l injection of 40 ppb Co(II) solution.

報において著者らは、ミセル表面が金属と Phen とのキレート生成速度を速めることと、そのキレートを濃縮する効果を見いだした。その効果は金属イオンの種類とミセルの種類により異なることから、Co(II) による CL について界面活性剤の影響を検討した。Table 1 で示した値は、界面活性剤を含まない場合の CL 強度を 1 とした場合の相対 CL 強度である。陽イオン界面活性剤 CTAB の添加が最大の増加を示し、発光強度は約 110 となった。そこで、CTAB によるミセル増感効果を詳細に検討した。

3.3 Phen キレート生成速度に対する界面活性剤の影響

ミセルは金属と Phen とのキレート生成速度に対して影響を及ぼす。そのことを明らかにするために、時間-吸光度三次元スペクトルを測定した。Phen 溶液 (6.0×10^{-3} M, pH 12.3) に界面活性剤 (1.9×10^{-3} M), Co(II) (3 ppm) 溶液を添加し、試料溶液を循環させながら吸収スペクトル変化を測定した。その結果を Fig. 2 (a) に示す。CTAB を添加した場合には急激に錯体の生成が速められているが、界面活性剤を添加していないとき {Fig. 2(b)} はこのような急激な変化は見せず、徐々にキレートを生成していく。次に陰イオン界面活性剤 SDS を用いた {Fig. 2(c)} 場合には、界面活性剤を添加しないときよりも生成速度は迅速となるが、CTAB ほどではない。そこで陽イオン界面活性剤は金属イオンに対しどのように働くのかを知るため次の実験を行った。

3.4 金属イオンの電荷

陽イオン界面活性剤を添加すると Phen 錯体の生成速度を速める。Phen はアルカリ性溶液中では中性の化学種と考えられる。従って、Phen は容易に水よりも極性の低いミセル界面に吸着する。そこでもう一方の反応化学種である金属イオンのアルカリ溶液中での電荷を検討した。所定の pH の電解液を含むパーパークロマトグラフィー用の濾紙の中心に Co(II) 溶液 (50 ppm) 0.03 ml を滴下した後、1200 V の電圧を濾紙の両端に印加し金属イオン錯体を泳動させた。Co(II) 錯体の検出にはチオシアン酸アンモニウム飽和溶液、4-メチル-2-プロパノンを使用した。溶液の pH が 10 のときには Co(II) 錯体が正極方向に 30 分間で 53 mm 泳動した。pH 2 の場合には負極方向に 73 mm の泳動となった。pH 7 前後付近では正負両極に泳動が見られた。従ってコバルトは pH 10 より高い pH では負に帯電しているものが多

Fig. 2 3-Dimensional spectra of Co(II)-1,10-phen complex forming in presence of surfactants

1,10-Phenanthroline: 6.0×10^{-4} M; Sodium hydroxide: 0.0125 M; Co(II): 3 ppm. a) CTAB 7.5×10^{-3} M, b) no surfactant, c) SDS 1.25×10^{-3} M

く存在する。よって、容易に陽イオンミセルに濃縮される結果、同様に濃縮された Phen との反応が促進されるものと考えられる。

3・5 金属錯体のミセルへの濃縮

既報で明らかにされたように CL 強度を高める一因が金属キレートのミセルへの濃縮によることから、Co-キレートのミセルへの濃縮率を調べた。初めに、光散乱

Table 2 The concentration of cobalt (II) in the bulk

CTAB/M	Found (AAS)
	Co (II), ppb
1.9×10^{-3}	25
1.9×10^{-5}	30

Conditions: 6.0×10^{-5} M 1,10-phenanthroline, 0.0125 M sodium hydroxide; Co: initial concentration in bulk; 30 ppb Co (II); CMC of CTAB: 1.9×10^{-4} M

法により、CTAB のミセル粒子径と会合数を測定し分子量を求めた。その結果、粒子径 7.5 nm、会合数 49 であった。代表的陽イオン界面活性剤であるドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミドはそれぞれ 50 と 75 であることから、これらに比較するとほぼ同じか若干低い値であった。しかし、既報に述べた Zeph は 20 であり、それと比較するとかなり大きな値である。ミセル会合数の大きさが CL 強度に直接影響することはないが、ミセル構造を決定する要因でありミセルをキレート反応場として考えるとき、更に詳細な検討を必要とする分野であると考えられる。

会合数が 49 と求められたことから、ミセル分子量は 17900 と求められた。そこで、分子量 3000 以下のみを汙過するポリエーテルスルホン製フィルター (Filtron 製マクロセップ) を用いて、Co(II) 錯体を含むミセル溶液をミセル濃度が大きく変化しない程度に汙過し、その汙液中のコバルトの濃度をフレイムレス原子吸光法で測定した (Table 2)。CTAB の臨界ミセル濃度 (9.0×10^{-4} M) 以上である 1.9×10^{-3} M を用いた場合には仕込量より低い値となっており、臨界ミセル濃度以下 (1.9×10^{-5} M) では仕込量と変わらない量のコバルトの濃度が観測できた。コバルトキレートのミセル濃縮率 (ミセルへのコバルトキレートの濃縮割合) は Co(II) 溶液 30 ppb を用いた場合 33% であった。このとき、全量が 20 ml であり、CTAB の全ミセル体積は 0.3 ml に相当するから、金属錯体の分配比は 32 となる。Fe(III) (30 ppb) を用いて界面活性剤に Zeph を使用したときの Fe(III) キレートのミセル濃縮率は 17%、分配比 14 であるからコバルトキレートのミセル濃縮率が大きいことが分かる。ミセルがコバルトキレート濃縮することで、陽イオンミセル表面に濃縮されているヒドロペルオキシ陰イオン (HOO^-) との反応が促進され、その反応の結果生じる ($\cdot\text{O}_2^-$) が増大し CL 強度

Fig. 3 Excitation and emission spectra of 3,3'-diformyl-2,2'-dipyridyl

1,10-Phenanthroline: 6.0×10^{-5} M; Sodium hydroxide: 0.0125 M; Hydrogen peroxide: 1.8%; Co(II): 30 ppb. (A) CTAB 1.9×10^{-3} M; (B) none

が増すものと考えられる。

3・6 発光化学種のミセルへの濃縮

以前著者らが報告した蛍光定量法¹¹⁾により, 反応(6)の最終生成物 3,3'-ジフォルミル-2,2'-ジピリジルを定量した〔試薬濃度 Phen (6.5×10^{-5} M), H_2O_2 (1.8%), NaOH (0.0125 M), Co(II) (30 ppb), CTAB (1.9×10^{-3} M) 試料調製後, 50°C で 5 分間加熱〕。その結果, 330 nm に励起スペクトルの極大が見られ, 430 nm に蛍光スペクトルの極大が見られた。CTAB を添加したところ蛍光強度が約 1.4 倍増大した (Fig. 3)。限外濾過法を適用したところその濾液の蛍光強度が 0.29 倍となり, 蛍光強度に対するミセルの存在は大きい。一般に蛍光発光は溶媒としての水により消光され, 有機溶媒に抽出されると蛍光量子収率は増大する。ミセルが蛍光強度を増大する報告は多く見られることから, 発光化学種へのミセルの効果も大きいものと考えられる。

3・7 検量線

最適条件での Co(II) の検量線は, 試料を 200 μ l 注

Fig. 4 Calibration graphs

1,10-Phenanthroline: 6.0×10^{-5} M; Sodium hydroxide: 0.05M; Hydrogen peroxide: 7.2%; CTAB: 7.5×10^{-3} M. ○: flow of the sample; ●: 200 μ l injection of the sample

入する注入法と, キャリヤー液中に Co(II) を含む連続法について作成した (Fig. 4)。注入法では 5~50 ppb, 連続法では 1~100 ppb の範囲で直線性を示し, Co(II) の 10 ppb における注入法の相対標準偏差は 8 回の測定で 4.3% であった。

3・8 共存元素の影響

最適条件下で, キャリヤー液に 10 ppb Co(II) 溶液を用い, その流れの中に各種金属イオンを含む 10 ppb Co(II) 溶液 200 μ l を注入し, Co(II) の CL 応答に対する各種金属イオンの CL 応答の比を相対誤差として調べた。Ni(II), Al(III), Zn(II), Cr(II), Cd(II), Mn(II) 及び Mg(II) は 50 倍量の存在で妨害しなかった。Pb(II), Cr(III) は 10 倍量まで, Fe(II), Fe(III) は 5 倍量まで妨害しなかった。しかし, Cu(II) は 0.02 倍量以上で妨害を示した。但し許容範囲を $\pm 10\%$ 以内の誤差とした。

以上述べたように, 本法では銅イオン定量に見られるような選択性はない。従って, 実試料に適用する場合にはあらかじめ分離する必要が生じるが, 陽イオン交換カラムを利用するポストカラム法の検出手段として利用するとき, 十分に利点が発揮できるものと考えられる。

文 献

- 1) 大野陽一, 保母敏行, 田村理佐子, 石井幹太: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 183 (1993).
- 2) J. H. Mike, T. J. Cleland: *Anal. Chim. Acta*, **259**, 73 (1991).
- 3) T. P. Chapin, K. S. Johnson, K. H. Coale: *Anal. Chim. Acta*, **246**, 469 (1991).
- 4) 石井幹太, 小池 充: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 173 (1993).
- 5) 大倉洋甫, 甲斐雅亮, 能田 均: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 259 (1994).
- 6) M. Yamada, H. Suzuki, S. Suzuki: *Anal. Lett.*, **17**, 251 (1984).
- 7) N. Dan, M. Ling, M. L. Grayeski: *Anal. Chem.*, **63**, 1766 (1991).
- 8) 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **35**, 373 (1986).
- 9) 渡辺邦洋, 山崎 剛, 板垣昌幸: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 407 (1996).
- 10) O. S. Fedorova, S. E. Olkin, V. M. Berdnikov: *Z. Phys. Chem. (Leipzig)*, **263**, 529 (1982).
- 11) 渡辺邦洋, 出村和章: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 809 (1994).

要 旨

1,10-フェナントロリンを用いたミセル増感化学発光系を利用し, フローインジェクション分析法による Co(II) の定量法を検討した. FIA システムは Phen 溶液, 過酸化水素溶液, キャリヤーとして再蒸留水の 3 流路からなり, Phen 溶液 {Phen (6.0×10^{-5} M), NaOH (0.05 M), CTAB (7.5×10^{-3} M); 0.4 ml/min}, 過酸化水素溶液 {H₂O₂ (7.2%); 0.4 ml/min}, キャリヤー {蒸留水; 0.8 ml/min} で行った. チューブ内径は 1 mm のものを使用した. 試料濃度と発光強度の関係は, 試料量 200 μ l 注入した場合には 5~50 ppb の範囲で, 連続的にキャリヤーに試料を流した場合には 1~100 ppb の間で直線性を示した. この反応系でミセル増感効果を検討した結果, ミセルは Co(II) と Phen のキレート生成速度を高めること, コバルトキレート及び化学発光種のミセルへの濃縮が一因であることを明らかにした. 又, CTAB からなるミセルの粒子径と会合数が求められ, 7.5 nm, 49 であることが分かった.