〔衛 生 化 学〕
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
18 (4) 237-242 (1972)

セレン関連化合物に関する研究 (第1報)

セレンのガスクロマトグラフィー¹⁾

中室 克彦, 佐谷戸安好,
外村 正治,^{2a)} 小瀬 洋喜^{2b)}
国立衛生試験所,^{2a)} 岐阜薬科大学^{2b)}

Studies on Selenium Related Compounds. I.
The Determination of Selenium by Gas Chromatography¹⁾

KATSUHIKO NAKAMURO, YASUYOSHI SAYATO,
MASAHARU TONOMURA,^{2a)} and YOUKI OSE^{2b)}
*National Institute of Hygienic Sciences^{2a)} and
Gifu College of Pharmacy^{2b)}*

(Received December 7, 1971)

As a hygienic chemical study on the treatment and on the influence of selenium to humans, micro-determination of selenium in various kinds of sample was investigated. Selenium (IV) in the sample was converted to selenium (IV) by heating in hydrochloric acid of concentration above 17%. Treatment of selenium (IV) with 4-chloro-*o*-phenylenediamine at pH 1 in a boiling water-bath gave 5-chloropiaselenol quantitatively. 5-Chloropiaselenol thus obtained was extracted with benzene at pH 1 and determined by ECD gas chromatography with 15% OV-17 Chromosorb W. High sensitivity of this method enables determination of 0.05 ppm of selenium and the calibration curve is linear up to 0.8 ppm. This microdetermination method is considered to be applicable to various kinds of samples such as river water, food, and animal tissues.

緒 言

化学工業の発展にともない、原料または製品としての毒劇物の遠隔地への輸送、工場または事業場における処理やそれらの排棄量は増加の傾向をみつつあるが、毒劇物については、科学的基礎研究に基づく安全対策の確立が万全とはいえない現状である。そのため著者らは毒劇物安全処理対策を確立し、環境保全に寄与するため、その処理方法と、それらの人体への影響等を衛生学的見地から研究するための一環として、まず、各種試料中からのセレンの分析定量法を確立するための検討を行なった。

セレンの定量には、桐榮ら³⁾がセレンと 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミン とにより 5-クロロピアセレンオールを生成させ、これをガスクロマトグラフィーによって定量を行なった報告があるが、この報告は反応条件をはじめ、分析上の基礎的検討がなされておらず、生物代謝物からの測定または各種試料についての標準試験法として採用できない欠点がある。

著者らは、セレンと 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミン との反応条件、反応生成物の有機溶媒を用いる濃縮操作ならびにガスクロマトグラフィー測定上の条件について基礎的研究を行ない、各種試料に含有するセレンの分析

1) 日本薬学会東海支部例会，静岡，1971年9月発表。

2) Location: a) *Kamiyōga, Setagaya-ku, Tokyo* (東京都世田谷区上用賀); b) *Mitahora, Gifu* (岐阜市三田洞)。

3) Kyoji Tōei, Susumu Nakashima, *Talanta*, **15**, 1475 (1968)。

に適用しうる新知見を得たので報告する。

実験の部

試薬の調製 ① 0.5% 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミン溶液：4-クロロ-*o*-フェニレンジアミン ($\text{NH}_2 \cdot \text{Cl} \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{NH}_2$) 0.5 g をはかり、10 ml のメチルアルコールに溶かし、水を加えて全量 10 ml とする。

② セレン (IV) 標準溶液：金属セレン (99.95% 以上) 0.500 g を精秤し、硝酸約 10 ml を加え、加熱溶解する。さらに加熱を継続して酸化窒素を除去する。冷後水 500 ml を加え、これを原液とする。この原液を 1000 倍希釈して、セレン (IV) 標準溶液とする。

セレン (IV) 標準溶液 1 ml = 1 μg Se (IV)

③ セレン (IV) 標準溶液：セレン酸 (H_2SeO_4) 1.4247 g を精秤し、水 500 ml を加え原液とする。この原液を 1000 倍希釈してセレン (IV) 標準溶液とする。

セレン (IV) 標準溶液 1 ml = 1 μg Se (IV)

④ セレン (IV) メチルアルコール標準溶液：セレン (IV) 標準溶液原液をメチルアルコールを用い、100 倍に希釈する。

セレン (IV) メチルアルコール標準溶液 1 ml
= 10 μg Se (IV)

⑤ 5-クロロピアセレンノール標準溶液：5-クロロピアセレンノール 137.745 mg を精秤し、ベンゼン 500 ml を加えて原液とする。これを 100 倍希釈し、5-クロロピアセレンノール標準溶液とする。

5-クロロピアセレンノール標準溶液 1 ml = 1 μg Se

⑥ カラム充填剤：液相として SE-30, OV-1, OV-17, DEGS を 15% の濃度でクロモソルブ W (80—100 μm シュ) にコーティングしたものを使用。

装置 ① ガスクロマトグラフ：日本電子(株), JGC-810 型ガスクロマトグラフ (ECD) を使用。

② ガスクロマトグラフ用カラム管：内径 4 mm, 長さ 2 m ガラスカラムを使用。

5-クロロピアセレンノールの合成⁴⁾ 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミン 1.4 g をメチルアルコール 10 ml に溶かしたものに、亜セレン酸 1.3 g を水 5 ml に溶かしたものを加え反応させ、ついで、10% 塩酸を用いて塩酸酸性にし、生ずる沈澱をろ過後乾燥を行ない、*n*-ヘキサンより再結晶を行なう。本物質は白色針状結晶, mp 119°。

試験操作 a. 液体試料の場合——(i) セレン (IV)：試料 40 ml を 100 ml の比色管にとり、10% 塩酸 10 ml と 0.01 M EDTA 溶液 5 ml を加える。ついで 0.5

% 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミン溶液 2 ml を加え、沸騰水浴中で 5 分間加熱する。冷後、これを分液ロートに入れ、ベンゼン 5 ml を加え、1 分間振盪し、ベンゼン層を縮ろ過し、これに無水硫酸ナトリウム約 0.5 g を加え脱水し、これをガスクロマトグラフィーの検液とする。この検液 2 μl をガスクロマトグラフィーに注入し、保持時間より 5-クロロピアセレンノールのピークを確認しピークの高さを測定する。

また、セレン (IV) 標準溶液の 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml について同様の操作を行ない、検量線を作成する。これより得た値を A とする。

(ii) セレン (IV)：試料 20 ml を 100 ml の比色管にとり、塩酸 20 ml を加え、沸騰水浴中で 5 分間加熱する。冷後、これを NH_4OH で中和する。以下 (i) と同様の操作を行なう。これより得た値を B とする。

セレン (VI) = B - A

b. 固体試料の場合——試験溶液の調製：試料 0.5—1.0 g を精秤し、五酸化リンデシケーター中で一昼夜乾燥したのち、1 N 塩酸 20 ml を吸収液とし、メチルアルコール 0.5 ml を燃焼補助剤として酸素ポンプ燃焼操作⁵⁾を行ない、試料を燃焼疎解する。吸収液を 100 ml の比色管にとり、水を洗浄液として用い、洗液を合して 40 ml とする。

定量：試験溶液 40 ml に 0.01 M EDTA 溶液 5 ml を加え、以下 (i) と同様の操作を行ない定量する。

ガスクロマトグラフィー測定条件 検出器：電子捕獲型検出器 (ECD) (^{63}Ni)。

カラム温度：210°

検出器、注入器温度：220°

キャリアーガスおよび流量： N_2 , 50 ml/min

結果

1. ガスクロマトグラフィー測定条件の検討

a) 固定相液体の選択について ガスクロマトグラフィーにおいて分離のよい安定したピークを得る目的でクロモソルブ W を固定相担体とし、SE-30, OV-1, OV-17, DEGS などの固定相液体について 5-クロロピアセレンノール標準溶液を用いて、ピークの保持時間、分離能、感度などについて検討を行なった。すなわち Fig. 1 のごとく、高沸点物質である 5-クロロピアセレンノールの測定において、それぞれの固定相液体使用時のカラム条件の最も良好な測定条件を設定し、そのピークパターンについて比較検討した結果、液相として 15% OV-17

4) Eugene Sawicki, Albert Carr, *J. Org. Chem.*, **19**, 1163 (1954).

5) 浮田忠之進, 大沢利昭, 井村伸正, 外村正治, 佐谷戸安好, 中室克彦, 菅野三郎, 福井昭三, 金子幹宏, 石倉俊治, 与那覇政憲, 中村 俊 衛生化学, **16**, 258 (1970).

Fig. 1. Peak Pattern of 5-Chloropiaselenol on the Various Column Condition by Gas Chromatography

Fig. 2. Influence of the Various pH Value on the Productive Rate of 5-Chloropiaselenol
The amount of Se (IV) added was 10 μ g.

を使用するとき、分離能がよく、他の液相を用いた場合のガスクロマトグラフィーにおけるベースラインの乱れや他のピークの出現を認めなかった。

d) カラム温度およびキャリヤーガス流量について
固定相液体として好適であった 15% OV-17 を使用したときのカラム温度およびキャリヤーガス流量の至適条件について検討を行ない、Table I, Table II の結果を得た。すなわち、Table I に示すごとく、カラム温度 190—230° においてピークの高さに大きな変動を認めない。また、Table II のごとくキャリヤーガス流量 30—60 ml/min においてピーク高の変動が小さいことを認めた。

2. 5-クロロピアセレンオール生成条件の検討

a) pH と反応時間について セレン(IV)と 4-クロロフェニレンジアミンの反応によって生ずる 5-クロロピアセレンオールが定量的に生成するための条件を左右す

TABLE I. Influence of the Various Column Temperature on the Stability of Peak Height by Gas Chromatography with 15% OV-17/chromosorb W

Column temperature °C	Peak height mm	Retention time min
170	33	12.7
	35	12.7
	34	12.7
190	58	6.8
	55	6.8
	56	6.8
210	66	4.2
	67	4.2
	68	4.2
230	53	2.7
	54	2.7
	56	2.7

condition of GC :

detector temperature 220°, injection temperature 220°
N₂ flow rate; 50 ml/min

The amount of Se (as 5-chloropiaselenol) applied was 10⁻³ μ g.

TABLE II. Influence of the Various N₂ Flow Rate on the Stability of Peak Height by Gas Chromatography with 15% OV-17/Chromosorb W

N ₂ flow rate ml/min	Peak height mm	Retention time min
30	63	6.5
	62	6.5
	62	6.5
40	64	5.1
	64	5.1
	65	5.1
50	66	4.2
	67	4.2
	66	4.2
60	64	3.5
	65	3.5
	66	3.5
70	73	3.2
	71	3.2
	69	3.2

condition of GC :

column temperature 210°, detect. temperature 220°
inject. temperature 220°

The amount of Se (as 5-chloropiaselenol) applied was 10⁻³ μ g.

る因子として、反応時の液性が考えられる。そのため、反応時の至適 pH を決定すべく、各種 pH における 5-クロロピアセレンオールの生成状態について検討を行なった。すなわち、Fig. 2 のごとく pH 5 以上では反応がほとんど進行せず、pH 1.0 付近で 5-クロロピアセレンオールが、ほぼ 100% 生成することを認めた。

また、反応時間が5-クロロピアセノール生成にどのように影響するかを沸騰水浴中で加温し検討したところ、5分間加温することにより、5-クロロピアセノールの生成が100%進行することを認めた。

3. 5-クロロピアセノール抽出条件の検討

a) 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンの妨害除去について 5-クロロピアセノールの生成に使用した試薬の4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンは、ガスクロマトグラフィー測定時において5-クロロピアセノールとはほぼ同様の保持時間を有するピークが出現する。そのためその影響を除くための検討を行なった。すなわち、4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンを用い、抽出時のpHを変化させベンゼン抽出を行ない、本物質がベンゼン層へ移行するか否かをガスクロマトグラフィーパターンについて検討を行なうに Fig. 3 の結果を得た。すなわち、4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンは pH 約 2.5 以上においてベンゼン層に移行を認めるが、pH 2 以下の強酸性において移行は認めず、ガスクロマトグラフィーにおいてピークは検出されないことを示した。

Fig. 3. Effect of the Various pH Value on the Peak Height of 4-Chloro-*o*-phenylenediamine by Gas Chromatography

The amount of 4-chloro-*o*-phenylenediamine added was 100 μ g.

b) 抽出時の塩酸濃度について a) において pH 2 以下において、4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンのガスクロマトグラフィーに対する妨害を除去しうること示す塩酸の濃度が、5-クロロピアセノールの抽出にどのような影響を有するか否かを検討した。すなわち、塩酸の各濃度について5-クロロピアセノールのベンゼン抽出効果を検討した。すなわち、Fig. 4 のごとく塩酸濃度 1-10 % において、ほぼ 100 % と良好な抽出率であることを認めた。

c) 抽出溶媒とその液量について 5-クロロピアセノールの抽出溶媒として、ベンゼンおよびトルエンについて、その抽出効果を検討し、Table III の結果を得た。すなわち、抽出溶媒としてはベンゼンを用いることにより、良好な回収率を得ることを認めた。また、抽出液量について検討したところ、ベンゼン 5 ml を用い、

Fig. 4. Influence of the Concentration of HCl on Extraction of 5-Chloropiaselenol
The amount of Se (IV) added was 10 μ g

TABLE III. Extractive Efficiency of 5-Chloropiaselenol with Benzene and Toluene

Solvent	Amount added μ g	Recovery mean %
Benzene	5	102.1
	5	98.9
	5	98.9
	5	100.0
	5	103.3
Toluene	5	90.3
	5	94.6
	5	94.6
	5	93.5
	5	95.7

1 回抽出することにより、ほぼ 100 % の回収結果を示した。

4. セレン(VI) からセレン(IV) への還元条件の検討

各種試料中セレンを総セレン量として測定する場合、本法においてセレン(VI) が測定できないため、セレン(IV) をセレン(IV) に還元する必要がある。そのため、還元剤として、塩酸ヒドロキシルアミン、塩酸々性塩化第一スズ、亜硫酸ナトリウムなどについて検討を行なった結果、いずれの場合も良好な結果を得ることができなかった。しかしながら、塩酸々性で加温することにより、セレン(IV) への還元が進行することを認めた。そのため、塩酸の至適濃度を決定するため各種塩酸濃度のセレン(IV) からセレン(IV) への還元状態について検討を行なった。すなわち、Fig. 5 のごとく、約 17 % 以上の塩酸濃度で沸騰水浴中 5 分間加温することにより、セレン(VI) への還元が、ほぼ 100 % 進行することを認めた。

5. 検量線

本法における検量線について検討したところ、Fig. 6 のごとく、セレン(IV) 量 1.6 μ g 以下において直線性を示し、検出限界は 0.1 μ g である。また、本法による測定値の変動係数は 3 % 以下であり、バラツキの小さい再現性のよい結果を示した。

6. 共存金属イオンの影響について

セレン(IV) 量 10 μ g に各種金属イオンを添加し、0.01M

Fig. 5. Influence of the Concentration of HCl on the Reduction from Se (VI) to Se (IV)

The amount of Se (VI) added was $10\mu\text{g}$
Test solution was incubated for 5 minutes
in boiling water bath

Fig. 6. Calibration Curve of Se (IV) by Gas Chromatography

standard deviation of peak height : 0.81–1.54 mm
coefficient of variation : 1.53–2.88 %

EDTA 溶液 5 ml を加えた状態で抽出操作を行ない、ガスクロマトグラフィーによりセレン(IV)量を測定し、共存金属イオンの影響について検討した結果、 Fe^{2+} は $500\mu\text{g}$ 以下、また、 Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} , Mn^{7+} , Ni^{2+} , As^{3+} が $1000\mu\text{g}$ 共存してもセレン測定に妨害を与えない結果を示した。

7. 各種試料におけるセレンの回収実験

実際試料として河川水を用い、セレン(IV)およびセレン(VI)を添加し、回収実験を行ない、ガスクロマトグラフィーで定量するに、Table IV の結果を示した。すなわち、河川水においてセレン(IV)、セレン(VI)の回収率はいずれも90%以上の良好な回収率を示した。

また、セレンの人体への影響について検討するための基礎実験として、動物の臓器中セレンの測定が必要である。そのため、臓器からの回収実験を行なった。すなわち、ホモジナイズした臓器試料にセレン(IV)を添加し、五酸化リンデシケター中で一昼夜乾燥した試料を酸素ポンプ燃焼法により疎解し、疎解液中セレンを定量した結果、Table V のごとく、いずれの臓器においても90%以上の回収率を示した。

考 察

著者らは、毒劇物の処理および人体への影響に関する衛生化学的見地からの研究の一環として、各種試料中からのセレンの分析定量法を確立するために、検討を行な

TABLE IV. Recovery Test by Gas Chromatography of Se (IV) and Se (VI)

Sample	Amount added μg		Found μg	Recovery %
	Se(IV)	Se(VI)		
River water (Tamagawa)	0	0	0	
	5	0	5.00	100.0
	5	0	5.00	100.0
	5	0	5.05	101.0
	0	5	4.90	98.0
	0	5	5.00	100.0
	0	5	4.98	99.6
	5	5	10.00	100.0
	5	5	10.17	101.7
	5	5	9.85	98.5

TABLE V. Recovery Test by Gas Chromatography of Se (IV) added to Various Tissues of Rats

Sample	Amount added Se(IV)	Found	Recovery
	μg	μg	%
Liver	0	0.67	
	5	5.45	97.6
	5	5.90	104.6
	5	5.65	99.6
Kidney	0	0	
	5	5.48	109.6
	5	4.84	96.8
	5	4.52	90.4
Heart	0	0	
	5	4.52	90.4
	5	4.84	96.1
	5	4.52	90.4
Spleen	0	0	
	5	4.80	96.1
	5	4.52	90.4
	5	4.70	94.1
Lung	0	0	
	5	4.63	92.5
	5	5.13	102.5

った。

まず、セレン(IV)と4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンとの反応生成物である5-クロロピアセレンールのガスクロマトグラフィー測定上の基礎的条件としての1つであるカラム充填剤は、Fig. 1のごとく15% OV-17を固定相液体に用いることにより、分離能がよく、感度、保持時間の点で良好であった。その結果、液相として15% OV-17を用いたときのカラム温度、キャリアーガス流量の至適条件は、Table I, Table IIより、カラム温度 210° 、キャリアーガス流量 50 ml/min が適当であることを認め、以後の検討をこれら条件で行なった。

つぎに、5-クロロピアセレンール生成時の至適 pH は Fig. 2 に示すごとく pH 1.0 付近、すなわち、2% 塩酸

濃度に調整することにより、5-クロロピアセノールの生成が定量的に進行することを認めた。

さらに、5-クロロピアセノール抽出時に 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンがベンゼン層に移行し、ガスクロマトグラム上に 5-クロロピアセノールとほぼ同様の保持時間を有して出現する。そのため、この 5-クロロピアセノール測定上の妨害を除去するための検討を行った。すなわち、Fig. 3 のごとく、5-クロロピアセノールを溶媒抽出する場合、pH 2 以下の強塩酸性にすることにより、4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンはベンゼン層に移行せず、セレン化合物である 5-クロロピアセノールのガスクロマトグラフィー測定における妨害を除去しうることを認めた。また、5-クロロピアセノールの抽出時の至適塩酸濃度は Fig. 4 のごとく、塩酸濃度 1—10 % において良好である。そのため、前述の 5-クロロピアセノール生成時の至適塩酸濃度 2 % を勘案し、抽出時の塩酸濃度を 2 % 付近で行なうことが効果的であることが考えられる。

また、各種試料中セレンを総セレン量として測定する場合、セレン(VI)をセレン(IV)にする必要がある。すなわち、Fig. 5 のごとく約 17 % 以上の塩酸濃度で 5 分間加温することにより、セレン(IV)への還元が満足に進行することを認めた。これはセレン(VI)が酸化性が強いことより

の反応が起こり、セレン(IV)へ還元されたものと考えられる。これら結果より、試料中のセレン(IV)の定量を行ない、総セレンとの差により、セレン(VI)の定量が可能であると考ええる。

また、本法の検量線はセレン(IV) 1.6 μg 以下において直線性を示し、検出限界 0.1 μg と感度が高く、測定

値の変動係数は 3 % 以下でバラツキも小さく、再現性の良い結果を示した。また、実際検体を用いたときの回収実験において、河川水および肝臓、腎臓、心臓などの動物臓器試料について行なったところ、Table IV, Table V のごとく、いずれも良好な回収率を示した。これら結果より、本測定法が各種試料に適用しうる方法であると考える。

結 論

以上の結果より、つぎのような結論を導きうるものと考ええる。

1) ガスクロマトグラフィーの充填剤として、15% OV-17/クロモソルブWを用いることにより、セレンの定量分析が可能であると考ええる。

2) セレン(IV)と 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンとの反応において、液性を pH 約 1.0、塩酸濃度を 2 % にすることにより、5-クロロピアセノールが定量的に生成するものと考ええる。

3) 5-クロロピアセノール抽出時の液性を pH 約 1.0 にすることより、過剰の 4-クロロ-*o*-フェニレンジアミンの妨害が除去でき、定量的にベンゼン抽出が可能であると考ええる。

4) セレン(VI)は 17 % 以上の塩酸濃度で加温するとセレン(IV)に完全に還元される。すなわち、試料中のセレン(IV)の定量を行ない、総セレンとの差により、セレン(VI)の分離定量が可能であると考ええる。

5) 本測定法は 0.8 ppm 以下において直線性を認め、検出限界が 0.05 ppm と精度が高く、バラツキもなく、再現性の良い結果を示した。また、本測定法は河川水や肝臓、心臓、腎臓、脾臓、肝などの臓器試料の各種試料に適用しうるものと考ええる。