

環境水試料中セレンの目視蛍光定量システムの構築

藪谷智規¹, 飯沼明子¹, 横田昌幸¹, 本仲純子¹, 林由佳子¹

Development of a visual fluorometric determination method for selenium in environmental water samples

by

Tomoki YABUTANI, Akiko IINUMA, Masayuki YOKOTA, Hideyuki KISHIMOTO,
Junko MOTONAKA, Yukako HAYASHI

Selenium(IV) and Se(VI) were visually detected and determined based on fluorometric derivatization used by 2,3-diaminonaphtalene (DAN) and β -cyclodextrin (β -CD) / sodium dodecyl sulfate (SDS) as fluorometric enhancer. The visual determination of Se was achieved by removing non-reacted DAN, which causes severe interferences and shows high background for visual determination, with a cation exchange treatment. The cation exchange treatment provided over 90% of its removal efficiency without loss of Se-DAN. In order to determine Se(VI), Se(VI) was converted to Se(IV) based on the reduction of the treatment under 6 mol l⁻¹ HCl at 110 °C. Se(IV) and Se(VI) in a river water and a seawater sample could be quantitatively recovered through the Se-DAN derivatization and the cation exchange treatment. Under the optimal condition for visual determination of Se, the fluorometric color was visually detected from 20 μ g l⁻¹ to 5000 μ g l⁻¹ of Se(IV) and from 100 μ g l⁻¹ to 5000 μ g l⁻¹ of Se(VI) and the difference of the color every 20-50 μ g l⁻¹ was distinguished.

Keywords: Selenium, visual determination, fluorometry, 2,3-diaminonaphtalene, cation exchange

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフ
システム部門物質機能化学講座
Department of Chemical Science and technology,
Institute of Science and Technology, The University
of Tokushima

*連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1

1. 緒言

現在、重金属をはじめ微量元素は誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、ICP 発光分析(ICP-AES)、原子吸光分析(AAS)等の装置使用により、測定が可能である。しかし、これらの装置は高価であり大型なため、簡易モニタリングへの適用は困難である。そのため、汚染状況の把握には、簡易分析法による1次スクリーニングを

実施し、疑わしいサンプルを精密分析で2次スクリーニングに適用することが望ましい。

簡易分析法には大きく分類して、目視分析法と小型簡易機器を利用した分析法が存在する。目視分析法としては、試験紙法や比色法がある。小型簡易機器分析法としてはpHメータ、ガスセンサーなどに代表される小型センサーが存在する。これらの分析法は、一般的に小型かつ簡便な取り扱いが可能、現場分析への適用などの長を有しており、1次スクリーニング法として有用である。しかし、選択性と感度に関しては改善の余地がある。

本研究で対象としたセレン(Se)は生体必須微量元素であるとともに、その過剰摂取は毒性を示すことから、水質基準(上水 $10 \mu\text{g l}^{-1}$ 、排水 $100 \mu\text{g l}^{-1}$)が定められている。ゆえに、環境中濃度の監視は環境汚染を把握する上で非常に重要である。Seの分析法としては、現在、誘導結合プラズマ質量分析法(ICPMS)、高分解能ICPMS、水素化物発生法-ICPMSおよび発光分析法(ICPAES)、原子吸光分析法(AAS)、原子蛍光法(AFS)、ストリッピングボルタンメトリー(SV)、蛍光光度法がある。¹⁾ 蛍光分析法は吸光分析法と比較し、適用できる対象物がやや限られるが、励起スペクトルとともに蛍光スペクトルが測定可能であり、感度、選択性も高く、微量元素の定量に適した分析法である。Seの蛍光検出法としては、Scheme 1に示したように、2,3-ジアミノナフタレン(DAN)と Se(IV) との錯体形成反応により生じる4,5-ベンゾピアセレンオール(Se-DAN)の蛍光を利用する方法が報告されている。²⁾ Se-DANの蛍光は極性溶媒中では極めて弱く、定量法として用いるには蛍光強度を増強する必要がある。従来、蛍光増強操作としてSe-DANを非極性溶媒中に抽出する試みが行われており、その検出限界は $0.01 - 0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ と報告されている。^{3,4)} この方法は高感度な定量法であるが、有機層抽出による濃縮プロセス等の複雑な操作が必要とされる。また、抽出操作に用いられる有機溶媒は環境への負荷を考慮し使用量を最低限にとどめる工夫が求められる。そのため、抽出操作を用いないSe蛍光定量として、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) / β -シクロデキストリン(β -CD)を添加する方法が報告されている。^{5,6)} この方法ではSe-DANの蛍光が、SDSと β -CDの添加により著しく増大する。Se-DANの蛍光増強は、Se-DAN / SDS / β -CD から成る包接錯体(ホスト-ゲスト錯体)を形成することに起因している。 β -CDの空孔内部にSe-DANとSDSの複合体が包接され微視的環境が非極



Scheme 1 A reaction of derivatization of Se(IV) with 2,3-diamino naphthalene.

性化することで、蛍光収率が向上するものと考えられる。増強剤による Se(IV) 蛍光定量の検出限界は $3 \mu\text{g l}^{-1}$ である。

Se濃度の広範囲、高密度なモニタリングを考慮すれば、このSe蛍光定量法をさらに簡便にすることが求められる。その一手法として目視定量があげられる。目による検出は特別な装置が必要とせず、安価であるため first screening method として有用となりえる。しかし、Se-DAN 蛍光法を目視定量に適用することを考えた場合に、 Se(IV) と DAN の反応系で得られる Se-DAN の他に DAN 自体も強い蛍光を有しているため、Se-DAN を目視により確認することは困難である。そのため、Se-DAN の蛍光法を目視により定量した前例は皆無であった。

そこで、本研究では、環境水中セレンの高感度簡易分析法の開発を最終目標とし、セレン蛍光分析法を目視定量法に応用したセレン目視蛍光分析法の開発を行った。陽イオン交換樹脂を使用した残存 DAN(モノプロトン化 DANH^+ 、ジプロトン化 DANH_2^{2+})除去によるSeの目視簡易定量を試みたので報告する。セレン蛍光誘導体の条件検討、時間安定性、妨害物質の調査を行い、6価セレン還元法の最適化によるセレン全量分析を行った。

2. 実験方法

2.1 試料・試薬

亜セレン酸ナトリウム(特級)、セレン酸ナトリウム(特級)、原子吸光用元素標準溶液、DAN(特級)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、塩化ヒドロキシルアンモニウム(特級)、SDS(一級)、 β -CD(特級)、クエン酸(結晶、食品添加物用)、クエン酸三ナトリウム(特級)はいずれも関東化学および和光純薬工業から購入して使用した。亜セレン酸ナトリウムおよびセレン酸ナトリウムを Milli-Q 水に溶解し、それぞれ Se(IV) 標準溶液と Se(VI) 標準溶液として使用した。DAN 溶液は DAN 20 mg、塩化ヒドロキシルアンモニウム 80 mg、EDTA 80 mg を 0.05 mol l^{-1} 塩酸 40 ml に 20 分間加熱溶解(60℃)させて、0.05%(w/w) DAN 溶液として調製した。なお、本溶

液は通常冷暗所で保存(保存期間:1ヶ月間を期限として)した。また、DAN 溶液は使用前にろ過(PTFE 製、DISMIC シリンジフィルター, 0.45 μm)を行った。SDS 648 mg、 β -CD 4.25 g を Milli-Q 水 250 ml に溶解させ、蛍光増強剤(SDS = 9 mmol l^{-1} , β -CD = 15 mmol l^{-1} , SDS / β -CD = 0.6)として使用した。

実試料として徳島県吉野川中流(徳島県美馬市)より河川水、徳島県吉野川河口付近(小松海岸)より海洋水を採取した。採取後、試料を直ちにろ過し、0.1 mol l^{-1} HNO_3 溶液に調製した。調製後の溶液は使用前まで冷蔵庫中で保存した。

2.2 セレン目視蛍光分析法

Se 溶液 5 ml、0.05%ジアミノナフタレン(DAN)0.5 ml、1 mol l^{-1} HCl 30 μl を褐色バイアルに添加し 90 \times 5 分間加温した。SDS/ β -CD 溶液 1.5 ml を添加し、陽イオン交換を行った。陽イオン交換樹脂は強酸性陽イオン交換樹脂 (Amberlite 200, 関東化学) を用いた。陽イオン交換は陽イオン交換樹脂 100 mg を蛍光誘導体化後の試料へ添加後、しんとう器で 230 rpm \times 10 分しんとうした。緩衝液(pH 4) 1 ml 添加し、ブラックライトによる目視測定($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$)及び蛍光測定($\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$)を行った。

Se()の還元処理は、6 mol l^{-1} HCl 存在下で 110 \times 10 分加温して行った。

3. 実験結果及び考察

3.1. 未反応 DAN の除去

Se-DAN の水溶液中による蛍光は極めて弱く、蛍光増強剤添加により水溶液中で蛍光スペクトル($\lambda_{\text{ex}}=375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=551 \text{ nm}$)検出可能である。(Fig. 1) 蛍光誘導体化後の試料には未反応 DAN が共存するため、Se-DAN が強い蛍光が Se-DAN の目視検出に妨害を与える。DAN の酸解離定数 $\text{pK}_{\text{a}1}$, $\text{pK}_{\text{a}2}$ はそれぞれ 2.11, 0.50 である。⁶⁾ 蛍光誘導体化条件は pH2 であり、この pH ではモノプロトン DAN(DANH^+)の形態で存在する。そこで、 DANH^+ の陽イオン交換樹脂による除去を試みた。未反応 DAN 除去率の pH 依存性および緩衝液使用 DAN 除去について評価した結果を Fig. 2 に示す。DAN の蛍光スペクトルの極大蛍光波長は 410 nm, Se-DAN は 550 nm である。陽イオン交換処理後は 550 nm の蛍光はそのまま維持されており、410 nm の蛍光はほとんど見られなくなった。また、陽イオン交換処理時の pH について最適化したところ、pH 2 において除去率が 90%以上得ら

れた。さらに、陽イオン交換樹脂量としんとう時間では、Se(VI)500 $\mu\text{g l}^{-1}$ 5 ml 試料に対して、それぞれ 100 mg, 10 分 (230 rpm) の最適化条件を得た。

陽イオン交換樹脂処理時に Se-DAN が陽イオン交換樹脂に吸着する可能性がある。この場合、Se-DAN が損失するため、感度への影響が懸念される。そのため、Se-DAN 誘導体化直後と蛍光増強剤である SDS / β -CD 添加後の 2 カ所のタイミングで、陽イオン交換樹脂による処理を実施することで、陽イオン交換時の Se-DAN の損失を調査した。その結果、Se-DAN 誘導体化反応直後に陽イオン交換樹脂処理を行った場合、10-20%の

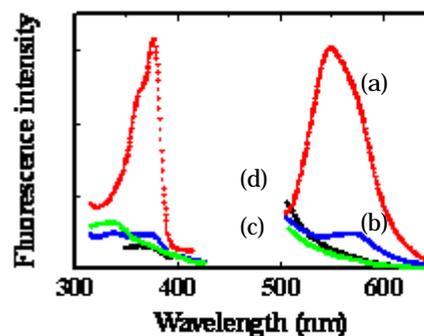


Fig. 1 The fluorescence excitation and emission spectra of Se-DAN without and with SDS / β -CD, β -CD, and SDS

The samples were Se-DAN in water (Se concn. 0.63 $\mu\text{mol l}^{-1}$) containing fluorometric enhancers as follows;
(a) 6 mmol l^{-1} SDS, 10 mmol l^{-1} β -CD
(b) 10 mmol l^{-1} β -CD
(c) 6 mmol l^{-1} SDS
(d) water

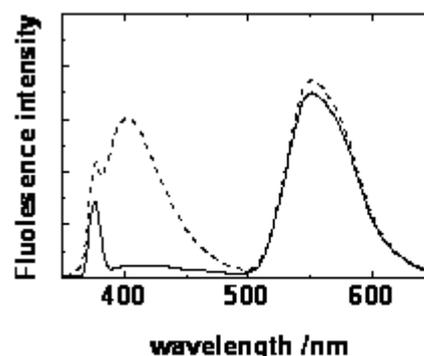


Fig. 2 The fluorescence emission spectra of Se-DAN in the samples before (dotted line) and after (solid line) the removal treatment of DAN by cation exchange resin.

Table 1 Recovery of Se(IV) and Se(VI) in river water and seawater sample in the Se-DAN analytical procedure^{a)}

Sample	Se concentration (mg l ⁻¹) ^{b)}		Recovery(%)			
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)		Se(VI)	
Riverwater	0.1	-	108	± 4	-	-
	2.0	-	98	± 2	-	-
	0.04	0.06	101	± 9	104	± 12
	0.4	0.6	97	± 3	112	± 20
Seawater	0.1	-	103	± 3	-	-
	2.0	-	101	± 3	-	-
	0.04	0.06	96	± 4	98	± 13
	0.4	0.6	102	± 3	98	± 5

a)The Se-DAN analytical procedure consisted of the Se-DAN derivatization, the cation exchange treatment for removal of non-reacted DAN, and the fluorometric measurement with the fluorophotometer. The pH condition was adjusted to be pH 2 in the Se-DAN derivatization and pH 4 in the fluorometric measurement. A 100 mg of the strong cation exchange resin and 220 rpm×10 min for mechanical shaking were used in the cation exchange treatment for removal of non-reacted DAN. The measurement of the analytical samples was performed in the fluorometric condition of $\lambda_{ex}=375\text{ nm}$ and $\lambda_{em}=550\text{ nm}$).

Se-DAN が損失していることが判明した。一方、-CD/SDS 添加後の陽イオン交換処理では、5%以下の損失であった。-CD/SDS 存在下では、Se-DAN は -CD に包接しており、-CD 自体の親水性のため、樹脂表面への Se-DAN の吸着が抑制されたものと考えられる。従って、陽イオン交換樹脂添加プロセスは蛍光増強剤添加後に行うことが最適であることがわかった。

本研究で使用した DAN は Se(IV)と選択的に反応し Se-DAN を与える。しかし、環境水中 Se の存在形態は Se(IV)及び Se(VI)であり、環境水中全 Se 濃度定量には、還元操作が必要となる。本研究では、塩酸還元法による Se(IV)の Se(VI)への還元を行った。⁷⁾なお、本研究では簡易定量法の開発を目指しているため、還元に費やす時間を 10 分と短く設定し、その他条件検討を行った。Se(VI)の還元率は、一定濃度の Se(VI)を還元処理した後に、Se-DAN 誘導体化して蛍光強度を測定し、その蛍光強度を同濃度の Se(IV)の蛍光強度と比較して算出した。

Se(VI)の Se(IV)への還元には塩酸濃度と反応温度が最も重要な因子として考えられる。結果として、塩酸が高濃度(6, 12 mol l⁻¹)、反応温度 100 °C の場合、ほとんどの Se(VI)は Se(IV)へ還元された。本研究では、試薬からのコンタミと経済的理由で還元操作に使用する塩酸濃度を 6 mol l⁻¹ とした。また、反応温度の結果では、90 °C では十分に還元されず(還元率 80%)、100 °C ではやはり反応の不均一さのために精度が悪い

(RSD15%)結果が得られた。しかし、110 %以上では還元率のばらつきも比較的小さかった。この条件下での Se(VI)の還元率は 102 ± 8 %であった。

Table 1 にこれまで最適化した条件下を用いて、実試料での Se(IV)と Se(VI)の添加回収実験を実施した。この添加回収実験とは、蛍光誘導体化処理と陽イオン交換処理における総合的な Se-DAN の回収率を見積もるものである。なお、Se(VI)の回収率の算出法は、全 Se 及び Se(IV)回収率を算出し、全 Se 分から Se(IV)分を差し引くことで Se(VI)回収率を求めた。その結果、河川水・海水ともに添加・回収試験から、100%に近い高回収率を得た。また、Se(IV)では、その回収率精度は RSD 換算で 10 %以内の結果となった。ただし、Se(VI)ではやや測定精度が Se(IV)に比べて低下した。要因として、Se(VI)の還元操作に伴う精度悪化が考えられる。また、海水中的の高濃度塩分は Se-DAN の回収には大きく影響しないことが判明した。

3-2. 目視蛍光評価

これまでの蛍光誘導体化と陽イオン交換処理の最適化条件下において、目視蛍光定量を行った。Fig. 3 に Se(IV)濃度に対する Se-DAN 蛍光色変化及び基準色を示す。

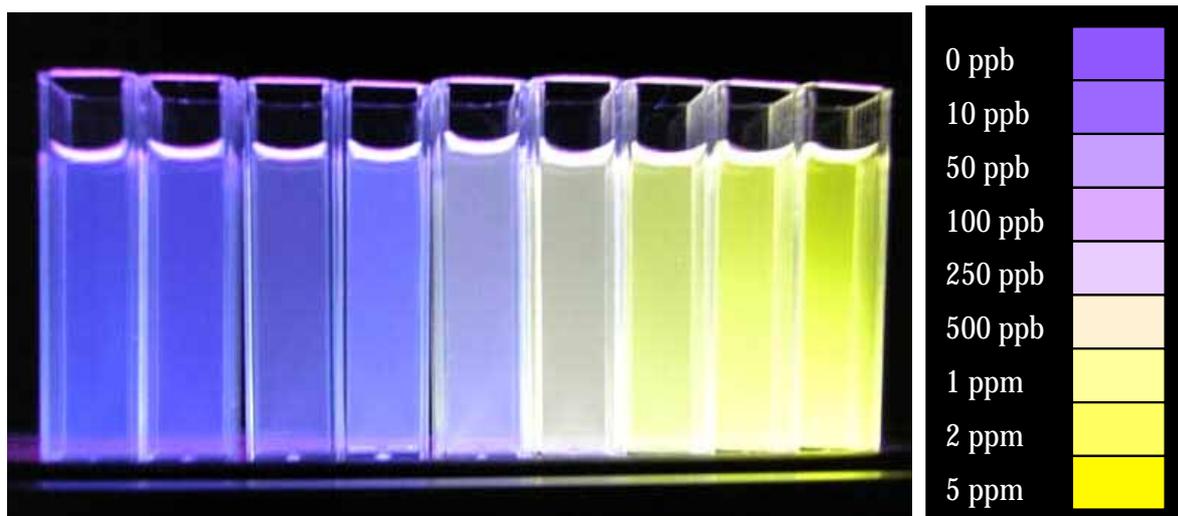


Fig. 3 Color transition with the concentration change of Se-DAN in the visual determination method..

The pH condition was adjusted to be pH 2 in the Se-DAN derivatization and pH 4 for visual measurement. A 100 mg of the strong cation exchange resin and 220 rpm × 10 min for mechanical shaking were used in the cation exchange treatment. The fluorometric color generated by radiation with a black light (λ = 365 nm)

結果として、0～5 mg l⁻¹Se(Ⅵ)濃度範囲において蛍光色変化を観測した。その蛍光色変化は青色から黄色への変化であり、溶液中に僅かに残存する未反応蛍光誘導体化試薬 DAN の青色から、Se 蛍光誘導体 Se-DAN の黄色への濃度変化に依存するものと考えられる。また、目視蛍光検出限界を決定するため、0～100 μg l⁻¹ (10 μg l⁻¹間隔)での蛍光色変化を 10 人以上で観察した。0 から 20 μg l⁻¹ 濃度上昇させた場合、蛍光色変化が観測可能であった。この結果より、Se(Ⅵ) 目視蛍光分析法の検出限界値を 20 μg l⁻¹と決定した。目視観測により色彩変化を分別できる Se(Ⅵ)濃度差は 20-50 μg l⁻¹であった。

Se(VI)含有試料に対して目視蛍光定量を実施した。0-5 mg l⁻¹の濃度範囲で蛍光の変化を目視蛍光変化を確認可能であり、検出限界値は 100 μg l⁻¹であった。Se(Ⅵ)目視蛍光定量と比較して、やや検出限界値が上昇しているが、これは Se(VI)から Se(IV)への塩酸還元時の希釈のため、Se 濃度は 10 倍希薄になっていることが要因として考えられる。

4. 結言

本研究では、環境試料中の広範囲かつ高密度なモニタリングが必要とされている Se を測定対象とし、目

視蛍光分析法による高感度かつ簡便な定量法の開発を目的とした。

Se(Ⅵ)の目視蛍光定量を行うにあたり、残存 DAN は大きな妨害となる強い蛍光を有する。そこで陽イオン交換樹脂により残存 DAN の除去を試みた。結果、pH2 で良好な DAN 除去率が得られた。陽イオン交換樹脂による Se-DAN の損失は 5%未満であり、Se-DAN の目視蛍光にはほとんど影響しないことが判明した。また、SDS/ -CD が陽イオン交換樹脂への Se-DAN の損失を抑制する効果を有していることが確認された。ブラックライトを使用した目視観測により色彩変化を分別できる Se(Ⅵ)濃度差は 20-50 μg l⁻¹であった。また、目視による検出限界は 20 μg l⁻¹となった。また、環境水中全セレン濃度定量の実施に向け、Se(IV)の塩酸還元に関して検討を行った。最適条件を 6 mol l⁻¹ HCl 中 110 °C × 10 分加温とした。Se(VI)に関しては、目視による検出限界は 100 μg l⁻¹となった。河川水・海水への添加回収実験においても、Se(IV)および Se(VI)ともに、ほぼ定量的に回収可能であり、分別定量の可能性について示された。

今後は固相抽出ディスク、カラムを用いた目視比色検出操作と濃縮操作を簡便かつ迅速に連動して行うシステムの構築を目指す。

謝辞

本研究は、平成 18 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) B. D. Wake, A. R. Bowie, E. C. V. Butler, P. R. Haddad : Modern preconcentration methods for the determination of selenium species in environmental water samples. *TrAC*, 23(7) 491-500, (2004).
- 2) J. H. Watkinson, : Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene. *Anal. Chem.*, 38(1), 92-97 (1966).
- 3) D. Wang, G. Alfthan and A. Aro : Determination of Total Selenium and Dissolved Selenium Species in Natural Waters by Fluorometry, *Environ. Sci. Technol.* 28, 383-387. (1994).
- 4) E. M. Rodriguez, M. T. Sanz and C. Diaz Romero : Critical study of fluorimetric determination of selenium in urine, *Talanta*, 41, 2025-2031, (1994).
- 5) 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*, 106, 3-9 (1992).
- 6) J. Pedro, F. Andrade, D Magnia, M Tudino, Adrian Bonivardi : On-line submicellar enhanced fluorometric determination of Se(IV) with 2,3-diaminonaphthalene, *Anal. Chim. Acta*, 516, 229-236, (2004).
- 7) J. Pettersson and Å. Olin : The rate of reduction of selenium(VI) to selenium(IV) in hydrochloric acid, *Talanta*, 38(4), 413-417 (1991).