

報 文

界面活性剤を用いる微量水素イオン測定用フローインジェクション/化学発光分析システム

石井幹太[®], 大久保直子, 馬場民恵*, 山田正昭, 鈴木繁喬**

(1988 年 6 月 27 日受理)

臭化ジドデシルジメチルアンモニウム二分子膜集合体(ベシクル)溶液中で水素イオン/エオシン Y/アルカリから成る新しい化学発光反応系を見だし, その系を FIA に組み込んだ微量水素イオン測定用 FIA/化学発光計測システムを開発した. 本フローシステムは 2 流路から構成される. 20 μ l 試料注入法において, 水素イオンの検出限界は 2×10^{-6} M, 定量範囲は 6×10^{-6} M $\sim$ 4×10^{-3} M, 分析速度は 360 h⁻¹, 再現性は相対標準偏差で 1.0% 以内 (5×10^{-5} M 水素イオン溶液を 10 回繰り返し分析) である. 本化学発光反応の選択性は良く, 水素イオンに次いで大きな化学発光応答を与えるシアニ化カリウムでも水素イオンの化学発光応答を 100 としたときの相対モル応答で約 2.5% であった. 又, 本化学発光反応に対する他成分による干渉も小さく, 1×10^{-5} M 水素イオン溶液を 2 ml/min の流量で流す連続試料注入法を用いた場合, その化学発光応答は 10^{-4} M シアニ化カリウム溶液によって初めて影響を受けるもののその程度は相対誤差でわずか 0.4% であった.

1 緒 言

化学発光分析法(以下 CL 分析法と略記)は感度に優れることや装置化の簡便さなどから活発な研究が展開されている^{1)~5)}. 著者らは, CL 分析法の拡大を図るため新しい CL 反応系の発見に努めており^{6)~8)}, その一手段として界面活性剤ミセルや二分子膜集合体(ベシクル)のような配向性分子集合体を CL 反応の反応媒体として活用してきた^{9)~11)}. これは, 配向性分子集合体を含む溶液中で CL 反応を行わせると, CL 効率及びエネルギー移動効率が著しく向上する場合があります^{9)~12)}測定感度の向上などに役立つためである.

ところで, 水素イオンの分析は電極法が一般的である. しかし, 微量の水素イオンの測定や非水系でのその測定においてはイオン強度の調整が必要となるなどの問題がある. 又, 生体系などでの測定, 例えば血液中での微量水素イオンの定量などではタンパク質の電極表面への付着などにより測定値の再現性を低下させることなども生

じる. 従って, これらを解決するためにも微量水素イオンの新しい定量法の確立が必要と考える.

著者らは, 臭化ジドデシルジメチルアンモニウム(DDAB)二分子膜集合体(ベシクル)溶液中でアルカリ/水素イオン/キサントゲン系色素から成る新しい CL 反応を見いだした. そこで, この CL 反応系を検出系に用いた微量水素イオン測定用 FIA/CL システムについて検討したところ, 感度, 選択性などの分析化学的特性に優れたフローシステムを開発できたのでここに報告する.

2 実 験

2.1 装 置

FIA/CL フローシステムを Fig. 1 に示す. 本システムは 2 流路(L₁, L₂)から構成されている. 検出器の構造, 及びその中に設置されたフローセルは既報¹¹⁾と同じである. 試薬溶液などの送液には内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm のテフロン製細管を使用した. 流路 L₁ と L₂ の試薬溶液を十分に混合するため流路 L₁ と L₂ の合流点から試料注入器(S)に至るまでの間に内径 1.0 mm, 外径 2.0 mm, 長さ 1 m のテフロン製混合コイルを設置

* 杏林大学保健学部化学教室: 192 東京都八王子市宮下町 476

** 東京都立大学工学部工業化学科: 181 東京都世田谷区深沢 2-1-1

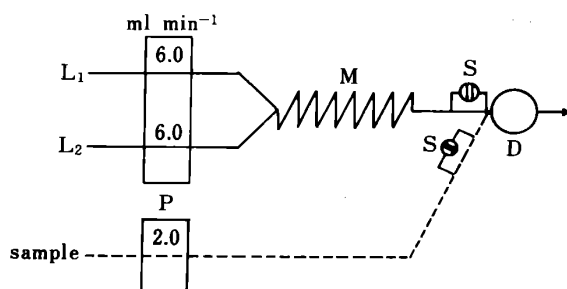


Fig. 1 Schematic diagram of the flow system for hydrogen ion determination

L_1 , L_2 : flow lines; P: peristaltic pump; M: 1 m long mixing coil; S: 20 μ l sample injector; D: detector. Recommended conditions: $L_1 = 1 \times 10^{-4}$ M Eosin Y, 2×10^{-3} M didodecyltrimethylammonium bromide & 1×10^{-5} M tetraethylenepentamine; $L_2 = 1 \times 10^{-3}$ M sodium hydroxide. Explanation for the dotted flow line is present in the text.

した。試料注入器からフローセルまでの距離はできるだけ短く（約 3 cm）設定した。送液にはペリスタ式ミニポンプ（P: アトー製二連動式 SJ-1220 型）を、試料注入には 20 μ l の試料注入器（Rheodyne 製 7125 型）を使用した。

2.2 試薬

試薬類は関東化学製又は和光純薬工業特級試薬をそのまま使用した。

界面活性剤は、陽イオン性、陰イオン性及び非イオン性の 3 種類を検討した。界面活性剤溶液は以下の手順で調製した。ミセルあるいはベシクルを形成する臨界濃度（一般的に約 10^{-3} M 程度）以上で、界面活性剤の溶解を早めるためとミセルなどの形成を促進するために超音波（最大出力 200 W; MRK SONO-Cleaner CA-20 型; KAIJO DENKI）を 30 分間照射して界面活性剤溶液を調製した。次いで、ミセルについては 30 分間静置し、又ベシクルについては小さいベシクル構造¹³⁾¹⁴⁾となるよう 30 分間静置して用いた。

反応試薬及び錯化剤溶液は 10^{-2} M 溶液を調製し、目的に応じて蒸留水（蒸留後脱イオンした水; YAMATO 製 Auto Still Model WA-715）で希釈して用いた。なお、使用した蒸留水中の不純物、特に金属類は ICP 分析において 10^{-8} M 以下のレベルであった。

界面活性剤と反応試薬の混合溶液は、調製した界面活性剤溶液に反応試薬溶液を加えた後超音波照射を 15 分間行い調製した。更に 15 分間静置後使用した。

共存物質の影響を調べるために、陽イオン及び陰イオン溶液を合計 35 種類調製した。各試薬溶液は 10^{-2} M 溶液を調製し、目的に応じて蒸留水（蒸留後脱イオンした水）でその都度希釈して使用した。不安定な試薬溶液についてはその都度新しく調製した。

2.3 水素イオン標準溶液

水素イオン標準原液は市販の塩酸を希釈して調製し、炭酸ナトリウムを標準物質とした中和滴定法¹⁵⁾（指示薬; メチルオレンジ及びフェノールフタレイン）により標定して用いた。

調製した標準原液の濃度は 0.1002 M で、水素イオン標準溶液はこの原液を蒸留水（蒸留後脱イオンした水）で適宜希釈して調製した。

3 結果と考察

3.1 フローシステムによる基礎的検討

配向性分子集合体（界面活性剤）溶液中でアルカリとキサンテン系色素（エオシン Y など）を混合すると大きな CL 応答が得られる。しかし、この CL 反応系からキサンテン系色素を除くと CL 応答は得られない。これら色素は界面活性剤を含むアルカリ性溶液中での CL 反応において分光学的に著しい化学構造の変化が認められないので⁸⁾¹¹⁾、この色素は CL 応答を高めることに寄与していると考えられる。又、この CL 反応は時間の経過と共に少しずつ CL 応答が減少し、この CL 応答が認められるときに水素イオンを加えると CL 強度が再び増加した。一方、この CL 応答がすべて消失した後に同じ操作を行うと CL 応答は認められなかった。更に、本 CL 反応系にテトラエチレンペンタミン (TEPA) や EDTA のような錯化剤を加えると、CL 応答は加えない場合に比べて著しく減少した。そして錯化剤を添加しても、この CL 応答が認められる間に水素イオンを加えると CL 応答は増加した。従って、この CL 反応系はアルカリ共存下での試薬あるいは蒸留水中に含まれる微量金属が関与した反応系と考えられ、錯化剤をこの CL 反応がすべて消失しない程度に適度に加えると共にアルカリを色素とは別々にする必要がある。又、水素イオンとアルカリは中和すること、配向性分子集合体溶液中では水素イオンとキサンテン系色素とは CL 応答を示さないことから、本 FIA/CL システムの流路と試薬の構成は Fig. 1 のとおりとした。

3.2 FIA/CL システム

CL 応答に及ぼす試薬濃度、流量などの影響を調べ、

最大の CL 応答が得られる条件 (最適分析条件) を検索した。

3・2・1 界面活性剤の種類 試薬と流路の構成を Fig. 1 に示したように設定し, 各種界面活性剤溶液中での水素イオンの CL 応答について調べた。結果を Table 1 に示した。界面活性剤を用いない場合は CL 応答は認められないが, 臭化ジドデシルジメチルアンモニウムなど幾つかの陽イオン界面活性剤と Brij-35 非イオン性界面活性剤を用いたときに CL 応答が得られた。この CL 応答の大きさは DDAB に見られる二分子膜集合体 (ベシクル) で最大であり, 次に大きな CL 応答を示した Brij-35 の約 5 倍, 又同じ陽イオン性界面活性剤でもミセルを形成する臭化テトラデシルトリメチルアンモニウ

ムと比べて約 8 倍であった。従って, 最も大きな CL 応答を示す DDAB を使用することとした。

3・2・2 キサンテン系色素の種類 界面活性剤の選択の場合と同様な手法により, 幾つかのキサンテン系色素の CL 応答に及ぼす影響について検討した。結果を Table 2 に示した。色素を使用しない場合は CL 応答は認められなかった。最も大きな CL 応答を示したのはエオシン Y で, 次の大きな CL 応答を示したウラニンの約 5 倍であった。

3・2・3 試薬濃度と流量 流路 L_1 と L_2 の流量を共に 6 ml/min に定め, 各試薬濃度を変えて CL 応答の変化を調べた。なお, 水素イオン試料は 1×10^{-5} M 塩酸溶液を用いた。又, 試薬濃度を高くした場合は二分子膜集合体が破壊されるので, その集合体が形成され, 安定化できる $10^{-3} \sim 10^{-2}$ M レベルの比較的低い試薬濃度で CL 応答を調べた。最も大きな CL 応答を示した試薬濃度は 2×10^{-3} M DDAB, 1×10^{-4} M エオシン Y 及び 1×10^{-3} M 水酸化ナトリウムであった。なお, 水酸化ナトリウム溶液は 1×10^{-3} M を境に, 低濃度側では CL 応答が減少し, 又高濃度側でもそれは減少した。著者らはアルカリ溶液中での酸素の活性化, 例えばスーパーオキシドラジカルアニオンの生成¹⁶⁾などを考えており, その生成量がアルカリの濃度に依存しているものと考えている。又, そのラジカルアニオンが水素イオンの量によって過酸化水素に変化する¹⁶⁾ときの CL 応答が水素イオン量と相関するものと考えている。詳細は反応機構として検討中である。又, この試薬濃度のもとで各流路の流量を変化させた結果, $1 \sim 5.5$ ml/min の範囲では流量の増大と共に CL 応答も増加した。5.5~7.0 ml/min の範囲では CL 応答は一定となり, 7.0 ml/min 以上では CL 反応の一部がフローセル外で行われるために CL 応答は減少した。従って, 試薬溶液の消費を最少にするためと最大の CL 応答を得るために本 FIA/CL システムでの試薬濃度と流量は Fig. 1 に示したとおりに設定した。なお, この流量で流路 L_1 と L_2 の試薬の混合についても検討し, 混合コイルを 30 cm~4 m の範囲で変えた場合の CL 応答の変化を調べた。60 cm~4 m の範囲の場合は 30~60 cm の範囲の場合と比べやや高い CL 応答が得られたので混合コイルは 1 m の長さに設定した。

3・2・4 CL 反応の選択性 フローシステム (Fig. 1) を用い, 水素イオン以外のイオン種 (1×10^{-5} M) を 20 μ l 注入したときの CL 応答について調べた。結果を Table 3 に示した。なお, 表中には TEPA を添加しない場合の CL 応答を 100 とし, TEPA を添加した場

Table 1 Effect of surfactants on the CL intensities of hydrogen ion

Surfactant (3×10^{-3} M)	Relative molar CL intensity, %	Surfactant (3×10^{-3} M)	Relative molar CL intensity, %
Cationic		Anionic	
DDAB ^{a)}	100	SDS ^{g)}	0
MTAB ^{b)}	13	Non-ionic	
STAC ^{c)}	13	Brij-35	20
CTAB ^{d)}	7	Tween 80 ^{h)}	0
CTAC ^{e)}	0	None	0
CEDAB ^{f)}	0		

a) didodecyldimethylammonium bromide (bilayer vesicle); b) tetradecyltrimethylammonium bromide (micelle); c) octadecylammonium chloride (micelle); d) hexadecyltrimethylammonium bromide (micelle); e) hexadecyltrimethylammonium chloride (micelle); f) hexadecylethyl-dimethylammonium bromide (micelle); g) sodium dodecylsulfate, h) 0.1% solution. Condition: as in Fig. 1 except for concentration of surfactant.

Table 2 Effect of dyes on the CL intensities of hydrogen ion

Dye (2×10^{-4} M)	Relative molar CL intensity, %
Eosin Y	100
Uranine	20
Brilliant Sulfoflavin	8
Rhodamine B	1
Eosin B	0
Pyronine B	0
None	0

Condition: as in Fig. 1 except for concentration of dye.

Table 3 Relative molar CL intensities of various species with the proposed system

Species (10^{-5} M)	Without TEPA	With TEPA [†]
HCl	100	100
KCN	3.2	2.5
Ascorbic acid	1.9	1.9
AlCl ₃	1.8	0.2
SnCl ₂	1.2	trace
Ni(NO ₃) ₂	1.1	trace
Pb(NO ₃) ₂	1.1	0
FeCl ₃	1.0	trace
Na ₂ CO ₃	0.8	0.8
ZnCl ₂	0.7	trace
Co(NO ₃) ₂	0.7	0
K ₂ Cr ₂ O ₇	0.7	0.5
NaNO ₂	0.6	0.5
CH ₃ COONa	0.5	0.5
K ₂ Cr ₂ O ₄	0.4	0.3
Na ₂ C ₂ O ₄	0.4	0.4
Na ₂ S ₂ O ₃	0.3	0.3
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	trace
EDTA	0.2	0
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0.2	0.2
NaI	0.2	0.2
Sodium citrate	0.1	trace
KSCN	0.1	trace
Na ₂ S	0.1	trace
Na ₂ HPO ₄	0.1	trace
Na ₂ SO ₃	0.1	trace
NaBr	0.1	trace
CdCl ₂	0	0
MgCl ₂	0	0
KClO ₃	0	0
Na ₂ SO ₄	0	0
MgCl ₂	0	0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0	0
HgCl ₂	0	0
NaF	0	0
NaCl	0	0

[†] 1×10^{-5} M teraethylenepentnamine. Condition : as in Fig. 1.

合との比較が直接できるよう配慮して記載した。試薬溶液に TEPA を加えない場合は Ni(II) や Cu(II) など 8 種の金属イオンとシアン化カリウム及びアスコルビン酸などに CL 応答が認められた。しかし、TEPA (1×10^{-5} M) を加えることで金属イオンに基づく CL 応答は消失したが、シアン化カリウムとアスコルビン酸などには CL 応答は残存した。水素イオンの CL 応答を 100 とした場合、その次に大きな CL 応答を示したシアン化カリウムでも水素イオンの CL 応答のわずか 2.5% であ

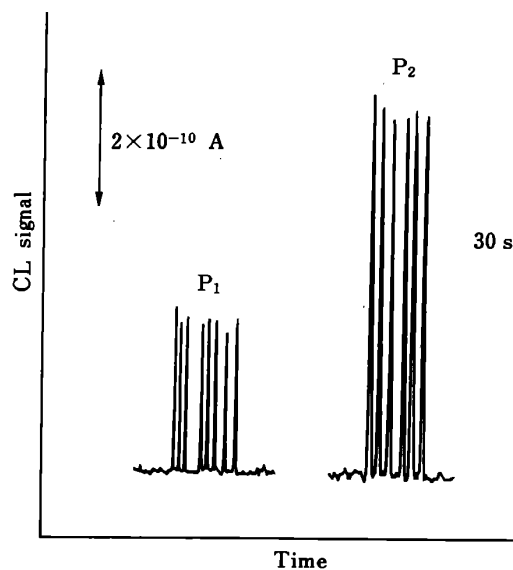


Fig. 2 Typical chemiluminescent profiles of hydrogen ion obtained by the proposed system

P₁ : obtained by *ca.* 5×10^{-5} M HCl solution; P₂ : obtained by *ca.* 5×10^{-5} M H₂SO₄ solution. Conditions : as in Fig. 1

り、本 CL 反応が水素イオンに対して選択的であることが認められた。

3.3 FIA/CL システムの分析化学的特性

最適分析条件 (Fig. 1 参照) で本 FIA/CL システムの分析化学的特性について調べた。

本分析システムによる水素イオンの CL 応答プロファイルを図 2 に示した。なお、図中には代表として硫酸及び塩酸の CL 応答を併記したが、これは塩酸からの水素イオンの量が強電解質の性質に基づいて硫酸と同じ挙動を示すか否かを示すためと、いかなる種類の強酸溶液を水素イオン標準溶液として使用できるかを示すため、及び CL 応答時間を示すためである。硫酸の CL 応答は塩酸のその 2 倍となっていることから、本システムでは硫酸、塩酸などの強酸溶液を水素イオン標準溶液として用いることが判明した。本研究では塩酸が一価の酸であることから、水素イオンの CL 応答と水素イオン量との関係を直接計算できるので水素イオン標準溶液として塩酸溶液を用いることにした。

3.3.1 検出限界と定量範囲 水素イオン標準溶液として用いた塩酸溶液のモル濃度と CL 応答との関係を Fig. 3 に示した。検出限界は 2×10^{-6} M であり、定量範囲は $6 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-3}$ M であった。

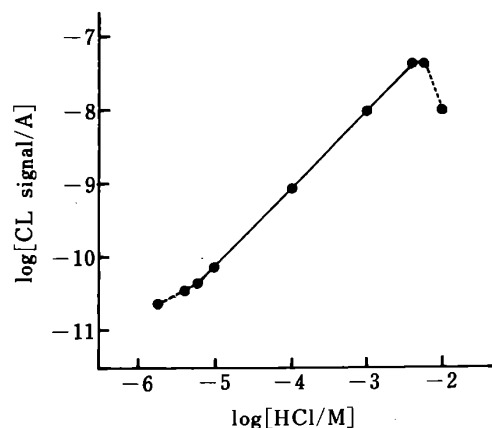


Fig. 3 Calibration graph for determination of hydrogen ion

Condition : as in Fig. 1

3.3.2 繰り返し精度と分析所要時間 5×10^{-5} M 塩酸溶液 20 μ l を用いて 10 回繰り返し分析したときの相対標準偏差は 1.0% であり, 再現性の良いことが認められた。又, Fig. 2 に示したように分析所要時間は短く, 1 試料当たり約 8 秒で分析を完了できた。

3.3.3 他成分による干渉 フローシステム (Fig. 1) の一部を改め, 新たに 1 流路を接合して水素イオンを連続的に注入できる試料連続注入フローシステム (3 流路) を組み立てた (Fig. 1 破線部分参照)。2 ml/min の流量で 1×10^{-5} M 塩酸溶液を連続して流し, その流れの中に各種イオンを $10^{-6} \sim 10^{-4}$ M の範囲にわたり 20 μ l 注入して干渉の程度を調べた。結果を Table 4 に示した。 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ M については CL 応答への影響は認められなかった。 10^{-4} M 溶液で初めて水素イオンの CL 応答への干渉が認められたが, 最も大きな干渉を示したシアン化カリウムでも相対誤差で 0.4% であり, 濃度比を考えた場合他の成分による本 CL 応答への干渉は無視できると言える。

ところで, フローシステムを用いた基礎的実験でも明らかなように, 本 CL 反応系には二つの種類がある。一つは水素イオン/エオシン Y/DDAB/水酸化ナトリウム (CL 反応 I) であり, 他はエオシン Y/DDAB/水酸化ナトリウム (CL 反応 II) である。本 CL 反応系では特別に酸化剤を加えていないので, 酸化剤の代わりにする化学種, すなわち溶存酸素が CL 反応に関係すると考えられる。そこで, CL 反応 I について脱酸素水を用いた CL 応答と, そうでない水での CL 応答を比較し

Table 4 Interference of various species with the proposed system

Species (10^{-4} M)	Relative error, %
KCN	0.4
K ₂ Cr ₂ O ₄	-0.3
K ₃ [Fe(CN) ₆]	-0.25
ZnCl ₂	-0.2
AlCl ₃	-0.15
Co(NO ₃) ₂	-0.1
Na ₂ C ₂ O ₄	-0.05

10^{-4} M solutions of Na₂S, ascorbic acid, Na₂SO₃, EDTA, Na₂S₂O₃, NaI, FeSO₄(NH₄)₂SO₄, SnCl₂, MnCl₂, KSCN, Ni(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂, sodium citrate, NaBr, Na₂SO₄, K₂Cr₂O₇, MgCl₂, HgCl₂, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, CdCl₂, Na₂SO₄, NaNO₂, Na₂HPO₄, CH₃COONa, NaF and Na₂CO₃. 10^{-5} M solution of each compound listed above did not interfere. Condition : as in Fig. 1; 20 μ l of each compound listed above was injected into the stream of 1×10^{-5} M HCl solution at a flow rate of 2.0 ml/min.

た結果, 前者の CL 応答のほうが著しく小さかった。又, 酸素を吹き込んだ水を用いた場合の CL 応答はそうでない水を用いた場合に比べて増大した。従って, CL 反応 I には溶存酸素が関与していると言える。反応機構については詳しく検討中である。

又, 本フローシステムの特性を活用し, いり焼きコーヒー豆の品質管理分析などへの応用を検討中である。

終わりに, ICP 分析で御協力いただいた化学技術研究所中村 進博士に感謝致します。

(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) 辻 章夫, 前田昌子: ぶんせき, **1983**, 269.
- 2) 山田正昭, 鈴木繁喬: ぶんせき, **1985**, 104.
- 3) P. Van Zoonen, H. Bock, C. Gooijer, N. H. Verthors, R. W. Frei: *Anal. Chim. Acta*, **200**, 131 (1987).
- 4) L. J. Kricka, P. E. Stanley: *J. Biolumin. Chemilum.*, **1**, 223 (1987); **2**, 45 (1988).
- 5) M. R. Burkhardt, N. I. Maniga, D. H. Stedman, R. J. Paur: *Anal. Chem.*, **60**, 816 (1988).
- 6) M. Yamada, H. Kanai, S. Suzuki: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 1138 (1985).
- 7) 山田正昭: ぶんせき, **1987**, 879.
- 8) 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬: 分析化学, **35**, 542 (1986).
- 9) M. Kato, M. Yamada, S. Suzuki: *Anal. Chem.*, **56**, 2529 (1984).
- 10) M. Yamada, S. Suzuki: *Anal. Lett.*, **17**, 251 (1984); 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬: 分析化学, **35**, 373 (1986).

- 11) M. Ishii, M. Yamada, S. Suzuki : *Anal. Lett.*, **19**, 1591 (1986); 石井幹太, 山田正昭, 鈴木繁喬 : 分析化学, **35**, 955 (1986).
- 12) 妹尾 学, 木瀬秀夫訳 : “分子会合体とその触媒作用”, p. 82 (1978), (講談社); J. H. Fendler, E. J. Fendler : “*Catalysis in micellar and macro molecules systems*”, p. 19, 40 (1975), (Academic Press Inc., London).
- 13) T. Kunitake, Y. Okahata : *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3860 (1977).
- 14) N. Nakashima, S. Asakuma, T. Kunitake, H. Hotani : *Chem. Lett.*, **1984**, 227.
- 15) 荒木 峻, 村上徹朗, 鈴木繁喬 : “分析化学実験指針”, p. 56 (1966), (東京化学同人).
- 16) M. A. J. Rodgers, E. L. Power : “*Oxygen and oxy-radicals in chemistry and biology*”, p. 466 (1981), (Academic Press Inc., London).

☆

Flow injection system for chemiluminescent determination of hydrogen ion at low concentrations using organized surfactant media. Mikita ISHII, Naoko OHKUBO, Tamie BABA*, Masaaki YAMADA and Shigetaka SUZUKI** (*Chemistry Section, Kyorin University School of Health Sciences, 476, Miyashita-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192; **Department of Industrial Chemistry, Faculty of Technology, Tokyo Metropolitan University,

2-1-1, Fukazawa, Setagaya-ku, Tokyo 158)

A chemiluminescent reaction in didodecyldimethylammonium bromide bilayer vesicle solution is utilized to determine hydrogen ion at low concentrations by means of a sodium hydroxide/Eosin Y system. The flow injection system is composed of two flow lines: L₁, 2×10^{-3} M didodecyldimethylammonium bromide, 1×10^{-4} M Eosin Y and 1×10^{-5} M tetraethylenepentamine at a flow rate of 6 ml/min; L₂, 1×10^{-3} M sodium hydroxide at a flow rate of 6 ml/min. This method permits the selective determination of hydrogen ion at concentrations of 6×10^{-6} M (20 μ l sample injection). The sampling rate is about 360 h⁻¹, and the reproducibility is less than 1.0% in terms of relative standard deviation for a 5×10^{-5} M hydrogen ion injection (10 repeated tests). Potassium cyanide, which gives the strongest chemiluminescence signal next to hydrogen ion, produces a signal only ca. 2.5% that of hydrogen ion.

(Received June 27, 1988)

Keyword phrases

didodecyldimethylammonium bromide bilayer vesicle/hydrogen ion/Eosin Y/sodium hydroxide chemiluminescent reaction; FIA system with chemiluminescent detection; determination of hydrogen ion at low concentrations.