

ノ ー ト

セルロース混合ポリビニルアルコールを基質とする
室温りん光法におけるりん光強度再現性の向上北出 達也^{®*}, 北村 桂介*, 和田 穰*, 山本 恵理*Reproducibility improvement in the signal intensity of room-temperature
phosphorimetry on a poly(vinyl alcohol) solid substrate

Tatsuya KITADE, Keisuke KITAMURA, Yutaka WADA and Eri YAMAMOTO*

*Kyoto Pharmaceutical University, 5, Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607

(Received 4 October 1996, Accepted 29 November 1996)

The effects of the drying condition in a microwave oven and the surface form of a poly(vinyl alcohol) substrate on the room-temperature phosphorescence (RTP) intensity and its reproducibility were investigated by monitoring the *p*-amino benzoic acid (PABA) RTP intensity. The position of the substrate in the microwave oven used in the drying process severely affected the RTP intensity. Reproducible and intensive values were obtainable when the substrate was dried on an activated silica-gel layer in a small crucible fixed at the center of a rotating plate in a microwave oven. The calibration curve under this condition was linear from 0.2 to 1200 pmol/spot with a correlation coefficient of 0.999, and nearly intercepting the origin. Grooving the substrate surface with cross stripes before drying further improved the reproducibility of the RTP signal intensity of PABA with a relative standard deviation of 9.7%.

Keywords : room-temperature phosphorimetry; poly(vinyl alcohol); reproducibility of phosphorescence intensity; drying condition; form of substrate.

1 結 言

従来より用いられている低温りん光法は極めて高感度であるが、試料溶液を液体窒素で氷結し測定するため、装置が大掛かりで操作も煩雑となり、定性・定量分析への適用には制約を受ける。そこで、試料分子を汙紙、シクロデキストリン、イオン交換樹脂などの基質に固定化し、室温でりん光測定を可能とする固体基質室温りん光法 (RTP) が開発され^{1)~5)}、現在では汉紙が最も一般的な基質として用いられている^{6)~11)}。しかし、これらの方法は空気中の水蒸気や酸素によりりん光が消光する

ので、測定中試料室に大量の乾燥不活性ガスを供給し続けなければならない^{2)~4)12)13)}。又、基質として汉紙を用いた場合、含有されている妨害物質を除去するために煩雑な操作が必要であり¹⁴⁾、更に感度増強のためにタリウム等の有害な重原子を用いることもあり⁶⁾、高感度であるにもかかわらず日常分析法としては用されていない。そこで、著者らはポリビニルアルコール (PVA) に少量のセルロース (CLL) を混合し加圧成形した基質を用いれば、乾燥不活性ガスの供給や基質の前処理、そして重原子の添加を行うことなく高感度でかつ簡便な分析が可能になり、又試料溶液を滴下した基質の乾燥処理を電子レンジで行えば、迅速化を図れることを見いだ

* 京都薬科大学: 607 京都府京都市山科区御陵中内町 5

し¹⁵⁾, 更にこの基質が *p*-アミノ安息香酸やフェノチアジン系薬物の定量分析に応用可能であることを既に報告した¹⁶⁾. しかし, りん光強度の再現性については課題があった. その原因としては, 電子レンジ内での電磁波強度の不均一に起因する乾燥状態のばらつきや, 試料溶液を滴下した基質の乾燥過程で生じる基質表面の非平滑性等が考えられる. そこで, りん光強度の再現性の向上を目的として, 電子レンジ内での乾燥条件及び基質の形状についての検討を行った.

2 実 験

2.1 試 薬

基質素材として, PVA: 重合度 2000, けん化度 78~82 mol% (関東化学製) と, CLL: 薄層クロマトグラフ用, 繊維状 (ナカライテスク製) を用いた. 又, 発りん光性薬物として, *p*-アミノ安息香酸 (PABA): 特級 (関東化学製) を使用した. なお, すべての試薬は購入時の状態で使用した. 又, 溶媒はイオン交換水を原水とした蒸留水を用いた.

2.2 装 置

基質の加圧成形は赤外吸光分析用 KBr 錠剤成形器とハンドプレス (島津製作所) を用いた. りん光測定は F-3010 形分光蛍光光度計に付属のりん光測定装置 (日立製作所) を接続して行った.

2.3 基質の調製

PVA を電動ミルで粉碎後, ふるいを用いて 63 μ m 以下の粉末を採取した. これに重量比で PVA : CLL=95 : 5 となるように薄層クロマトグラフ用繊維状 CLL を添加し, めのう製乳鉢と乳棒を用いて十分に混和した. この混合物 50 mg を, KBr 錠剤成形器とハンドプレスを用いて (打錠圧 4 t, 打錠時間 1 分) 直径 13 mm, 厚さ約 1 mm の円盤状の錠剤に加圧成形した. この錠剤の片面をセロハンテープで補強した後, 4×8 mm の小片に切断し, これを 30×8 mm に切断した OHP フィルムシートに両面テープではり付けた¹⁵⁾.

2.4 測定操作

既定濃度の PABA の水溶液 20 μ l をマイクロシリンジで基質表面全面に滴下し, 市販の電子レンジ (500 W) で 5 分間乾燥した. なお, 乾燥条件をなるべく統一するため, 電子レンジ内で複数枚の基質を同時に乾燥処理することは行わなかった. 乾燥後の基質を既報のスピンデル型試料ホルダー¹⁵⁾にはり付け, 分光光度計の

Table 1 Intensity and reproducibility of the RTP signal of PABA measured on the substrate dried under various conditions

	RTP intensity		
	Mean	SD	RSD/%
Condition I	116.4	85.4	73.3
Condition V [†]	277.3	36.9	13.3
PVA100%			
Condition V [†]	177.7	41.7	23.5

[†] Substrates were dried on the center of rotating plate in a microwave oven. $n=5$

試料室に挿入し, 乾燥不活性ガスを試料室に供給することなく直ちにりん光測定を開始した. 分光光度計の測定条件は, Ex バンドパス 5 nm, Em バンドパス 5 nm, レスポンス 2 秒とし, 励起波長 273 nm, りん光波長 421 nm に固定してりん光強度の時間変化測定を行い, そのときの最大りん光強度を用いて各評価を行った.

3 結果と考察

3.1 電子レンジ内での基質乾燥位置を特定しない場合のりん光強度とその再現性

電子レンジを用いて乾燥処理を行う場合, 最適な処理時間があり, その過不足がりん光強度の減弱を招くことは既に報告した¹⁵⁾. このことより, もし電子レンジ内に電磁波強度の不均一が存在するなら, 乾燥処理時間を一定にしたとき, 処理位置によってりん光強度が異なる可能性がある. 市販の電子レンジには位置による処理状態の不均一を軽減させるために, 回転皿が備え付けられているが, 処理対象物が小さい場合は回転皿の中央を中心とする同心円上では条件が平均化されるが, 中心から周辺方向での条件は平均化されず, 処理位置によるりん光強度のばらつきが予測される. 通常は処理ごとに作為的に処理位置を変えることはないと考えられるが, ここでは電子レンジ内での処理位置の違いによるりん光強度のばらつきについて検討するため, あらかじめ加熱した電子レンジの回転皿を静止させて, 乾燥処理ごとに試料溶液を滴下した基質 1 枚を回転皿上に置き, その位置を無作為に変えて 5 分間乾燥処理を行った (条件 I とする). ここであらかじめ回転皿を加熱するのは, 乾燥処理開始時に回転皿の温度をなるべく一定にするためである. このときのりん光強度とその再現性を Table 1 に示す. りん光強度は大きなばらつきを示し, 電子レンジ内において電磁波強度の不均一があり, これがりん光強度に影響を及ぼすため, 電子レンジ内の乾燥位置の選

Table 2 Effect of drying position of the substrate in a microwave oven on the reproducibility of the RTP signal of PABA

Condition		Distance from the center to substrate/cm						
		0	2	4	6	8	10	12
III	SD	26.2	11.9	12.6	11.1	11.1	9.1	4.4
	RSD, %	119.2	45.4	57.1	139.0	101.3	142.6	76.7
IV	SD	19.3	64.4	54.5	87.8	46.1	88.9	58.1
	RSD, %	11.4	55.9	52.8	83.8	99.0	66.4	151.2
V	SD	41.7	23.9	42.8	33.2	19.5	18.9	33.8
	RSD, %	23.5	15.2	26.3	30.0	19.9	14.7	155.4

III: Substrates were dried at the vertically isolated position from the surface of rotating plate. IV: Substrates were placed on silica-gel layer. V: Substrates were placed on silica-gel layer and tightly fixed at the position in a microwave oven.

Amount of PABA: 200 pmol/spot; Pre-heating time: 3 min; Drying time: 5 min; $n=5$

沢がりん光強度の再現性に関与することが確認できた。

3・2 電子レンジ内の基質の乾燥位置によるりん光強度の変化と乾燥条件の検討

乾燥位置とりん光強度の関係をより明確にするため、回転皿中心から電子レンジ前面ドア方向に向かって、基質1枚を乾燥処理ごとに2 cm ずつ位置を変えてあらかじめ加熱した回転皿上に直接置き、かつ回転皿を静止させて乾燥処理を行ったとき（条件 II とする）の、回転皿中心からの距離とりん光強度との関係を Fig. 1 に示す。基質を置く位置によって、りん光強度に差があり、周辺部ほどりん光強度が弱くなり、かつ中心から2 cm 及び10 cm の位置にピークが存在し、周期性が認められた。

電子レンジ内の回転皿は乾燥処理中に温度が上昇し、基質を直接回転皿上に置くと、熱伝導により基質温度が上昇する。そのため乾燥処理時の回転皿の温度が異なれば、乾燥状態が変わる可能性がある。そこで、回転皿から基質への熱伝導による温度の影響を避ける目的で、基質を直接回転皿上に置かずに、高さ約2 cm のるつぽ上に OHP フィルムシートを置き、その上に基質を載せることにより皿の表面から約2 cm 離し、又なるべく電子レンジ内での位置の影響を避けるために、回転皿を回転させて乾燥処理を行った（条件 III とする）。その結果を Fig. 1 及び Table 2 に示す。この場合も条件 II と同様な周期性が見られたが、りん光強度が約1/10になり、かつ各位置で再現性の乏しい結果が得られた。その原因は、回転皿からの熱が基質に伝わらないため、5分間の乾燥処理では基質の乾燥が不十分になったためであると考えられる。

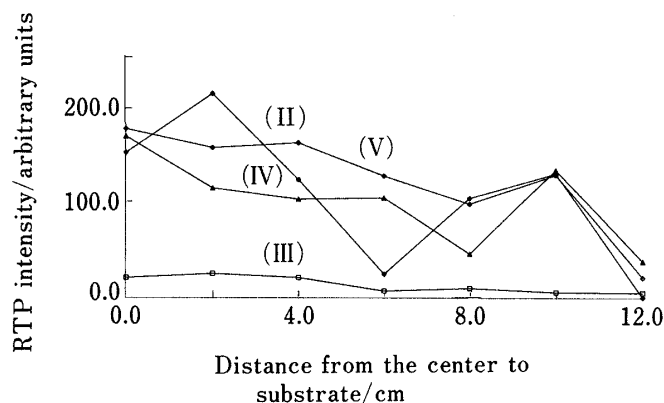


Fig. 1 Dependence of RTP intensity on the position of the substrate in a microwave oven under various drying conditions

(II): Substrates were directly placed on the rotating plate (without rotating); (III): Substrates were dried at the vertically isolated position from the rotating plate surface; (IV): Substrates were placed on silica-gel layer; (V): Substrates were placed on silica-gel layer, and tightly fixed at a position in a microwave oven. Amount of PABA: 200 pmol/spot; Pre-heating time: 3 min; Drying time: 5 min; $n=5$

そこで、回転皿から伝わる熱の影響をなくし、かつ基質の乾燥を促進する目的で、あらかじめ加熱することにより十分に活性化したシリカゲルを上記のるつぽの中に入れ、その上に基質を置いて乾燥処理を行った（条件 IV とする）。その結果を Fig. 1 及び Table 2 に示す。りん光強度は条件 III と比較してかなり増強されており、かつ周期性を示した。又、再現性については、中心位置のみで優れているが、周辺部ほど劣っている傾向があるこ

とが分かった。この原因としては、回転皿周辺部では遠心力が働くため、シリカゲルの入ったるつぽの位置が微妙に移動したことによると考えられる。しかし、条件 III と比較して、りん光強度及び再現性の両方が向上したことから、シリカゲル上での乾燥処理が有効であることが示された。

そこで、電子レンジ内での基質の位置を固定するために、シリカゲルの入ったるつぽを両面テープで回転皿上に固定し、乾燥処理を行った（条件 V とする）。その結果を Fig. 1 及び Table 2 に示す。周辺部ではりん光強度が弱い、中心付近では強いりん光強度が得られ、かつ全般的に再現性も改善されていることが分かった。

これらの実験結果は出力 500 W、回転皿付きの市販の電子レンジ機種について検討を加えたものであるが、市販の電子レンジには、本研究で使用した機種とは異なる出力や機能、形態を有した多様な機種が存在する。より強い出力を備えた機種では本研究結果より短時間で乾燥操作が完了すると考えられ、又異なった機能や形態を有しておれば、それぞれに対応した最適な乾燥位置があると考えられる。いずれにしても、どのような形式の電子レンジでも電磁波の強度分布は存在しており、乾燥対象物が小さな場合はこの電磁波の強度分布の影響を受けるため、それぞれの電子レンジで最適な処理時間や位置等の条件の検討を行う必要があることが分かった。

3・3 PABA の検量線

条件 V で回転皿の中心に基質を置いた場合が、りん光強度及び再現性共に優れていたため、この条件に設定して PABA の検量線を作成した。その結果、検量線の直線域は 0.2 から 1200 pmol/spot の間であり、又相関係数はデータ数 40 で 0.999、切片は 1.60 でほぼ原点を通ることが確認できた。

3・4 基質組成及び形状がりん光強度及びその再現性に及ぼす影響

本法では PVA : CLL=95 : 5 の混合物を基質素材として使用しているが、CLL の添加の目的は基質のもらさや試料液の浸透性を改善するためである。しかし、その反面 CLL の混合は基質透明性の低下を招き、その結果、りん光強度やその再現性に影響を及ぼすことは既に報告した¹⁵⁾。そこで、りん光強度、再現性共に優れていた条件 V でも、既報と同様の結果が得られるか検討を行った。その結果を Table 1 に示す。PVA 100% の基質は、PVA : CLL=95 : 5 と比較すると、りん光強度

Table 3 Effect of treating the substrate surface on the intensity and reproducibility of the RTP signal of PABA

	RTP intensity		
	Mean	SD	RSD/%
Without treatment	188.7	34.6	18.3
Covered with quartz plate	196.6	39.6	20.1
Grooved with cross stripes	183.2	17.7	9.7

Substrates were dried at the center of the microwave oven under the condition V. *N*=10

及び再現性が共に更に改善されており、同様に PVA 100% の基質がりん光強度や再現性の面では優れていることが示された。

一方、基質に試料溶液を滴下した際に、滴下した溶液のすべてが直ちに基質内部に浸透するのではなく、一部分は基質表面に残存している。この状態で電子レンジにより乾燥処理を行うと、乾燥後基質表面中央部に凸状の変形を生じる。このような基質表面の非平滑性は、りん光強度を低下させるとともに、個々の基質の変形状態が異なり、再現性を低下させる要因になっていると考えられる。そこで、乾燥処理後基質が加熱により柔軟性を保持している間に、石英板で押さえることにより基質表面を強制的に平滑にした場合、及び基質成型時に格子状の溝を持ったプラスチック板と共に打錠することにより、その表面に 1.3 mm 間隔で 0.8 mm の幅を持つ格子状の溝を付け、生じた小さな規則正しい凹凸により乾燥時に生じる大きな凸状の変形を防ぐようにした場合の、りん光強度とその再現性の比較を行った。その結果を Table 3 に示す。表面を石英板で平滑にした場合は、りん光強度がやや高いが再現性は改善されなかった。一方、基質表面に溝を付けた基質の乾燥後の表面は、通常の基質の表面と比較して極めて平滑であり、りん光強度に変化はなかったが再現性はかなり向上した。

以上、電子レンジを用いて基質の乾燥を行う際に、シリカゲル上に基質を置き、かつ乾燥位置をレンジ内の中心部分に固定し、又表面に小さな格子状の溝を付けた基質を用いることにより、りん光強度の相対標準偏差値を 9.7% まで向上させることができ、乾燥不活性ガスを用いることなく室温りん光が安定して観測できる、本基質の実用性を更に高めることができた。

文 献

- 1) M. Roth: *J. Chromatogr.*, **30**, 276 (1967).
- 2) E. M. Schulman, C. Walling: *J. Phys. Chem.*, **77**, 902 (1973).
- 3) R. A. Paynter, R. S. Wellons, J. D. Winefordner: *Anal. Chem.*, **46**, 736 (1974).
- 4) J. Bello, R. J. Hurtubise: *Anal. Lett.*, **19**, 775 (1986).
- 5) Y. M. Liu, R. Pereiro-Garcia, M. J. Valencia-Gonzalez, M. E. Diaz-Garcia, A. Sanz-Medel: *Anal. Chem.*, **66**, 836 (1994).
- 6) S. M. C. Gioia, A. D. Campiglia: *Anal. Chim. Acta*, **287**, 89 (1994).
- 7) R. Q. Aucelio, A. D. Campiglia: *Microchim. Acta*, **117**, 75 (1994).
- 8) J. de Ribamar, F. Junior, A. D. Campiglia: *Talanta*, **42**, 1505 (1995).
- 9) J. J. Santana Rodriguez, J. Hernandez Garcia, Z. Sosa Ferrera, A. J. Bermejo Martin Lazaro: *Anal. Lett.*, **28**, 2413 (1995).
- 10) H. Xie, C. Dong, W. Jim, Y. Wei, C. Liu, S. Zhang, B. Zhou: *Anal. Chim. Acta*, **319**, 239 (1996).
- 11) A. J. Tong, Y. G. Wu, L. D. Li: *Anal. Chim. Acta*, **322**, 91 (1996).
- 12) R. T. Parker, R. S. Freedlander, E. M. Schulman, R. B. Dunlap: *Anal. Chem.*, **51**, 1921 (1979).
- 13) E. M. Schulman: *J. Chem. Educ.*, **53**, 522 (1976).
- 14) A. D. Campiglia, C. G. de Lima: *Anal. Chem.*, **59**, 2822 (1987).
- 15) T. Kitade, K. Kitamura, J. Hayakawa, E. Nakamoto, N. Kishimoto: *Anal. Chem.*, **67**, 3806 (1995).
- 16) T. Kitade, K. Kitamura, N. Kishimoto: *Anal. Sci.*, **12**, 439 (1996).