

## 報 文

## 固相濃縮吸光光度法の顕微分光法への応用

松岡 史郎<sup>®\*</sup>, 吉村 和久\*, 立田 清朗\*, 進 野 勇\*\*

## Application of solid-phase absorptiometry to microscopic spectroscopy

Shiro MATSUOKA, Kazuhisa YOSHIMURA, Akira TATEDA\* and Isamu SHINNO\*\*

\*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University, 4-2-1, Ropponmatsu, Chuo-ku, Fukuoka 810-8560

\*\*Department of Japanese Society and Culture, Graduate School of Social and Cultural Studies, Kyushu University, 4-2-1, Ropponmatsu, Chuo-ku, Fukuoka 810-8560

(Received 14 January 1998, Accepted 12 February 1998)

The applicability of solid-phase absorptiometry to a minute solid particle has been studied for the sensitive determination of target trace elements present in a small volume of sample solutions. An iron(II)-phenanthroline complex or a Cr(VI)-diphenylcarbazide complex in 1 cm<sup>3</sup> of a sample solution was concentrated in a spherical bead of cation-exchange resin having a particle size of about 0.8 mm. The light attenuation of this particle was measured using a polarizing microscope attached to a photo-detector. The sensitivity of the proposed method was 280-times greater than that of the conventional corresponding solution method, which was considered to agree with the expected value of 300. Although the size of the respective cation-exchange resin particle was not very uniform, a reproducible measurement of the absorbance due to the colored chemical species sorbed could be made. The calibration graph was straight and Beer's law could be also applied, even to a minute spherical bead.

The proposed method is thought to be effective for analyzing trace elements in samples which are hardly obtained in large amounts, such as rain-water samples.

**Keywords :** solid-phase absorptiometry; small volume of sample solution; microscopic spectroscopy; minute solid particle; high sensitivity.

## 1 緒 言

吸光光度法は、その簡便性、コストパフォーマンスの高さから、現在でも水試料中の成分分析に広範に用いられている。しかし、環境試料などに含まれる微量成分が

分析の対象となる場合、 $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$  台のモル吸光係数を持つ有機試薬の開発にもかかわらず、 $\mu\text{g dm}^{-3}$  ~ サブ  $\mu\text{g dm}^{-3}$  レベルの成分分析には感度不足のことが多く、イオン交換や溶媒抽出のような、なんらかの前濃縮法と組み合わせられなければ、これらの成分分析は困難である。

固相濃縮吸光光度法は、試料溶液中に存在する目的成分を通常の溶液法と同様の操作手順により有色化学種とし、これをイオン交換体などの固相に吸着濃縮させ、そ

\* 九州大学理学部: 810-8560 福岡県福岡市中央区六本松 4-2-1

\*\* 九州大学大学院比較社会文化研究科: 810-8560 福岡県福岡市中央区六本松 4-2-1

の固相減光度を直接測定するものである。前述のような前濃縮法と組み合わせられる溶液法と比較して、イオン交換濃縮を用いたときのように一度濃縮した成分の再溶出が必要なく、又溶媒抽出で問題となる試料溶液と抽出溶媒との相互溶解を考慮しなくて良いために、高い濃縮効率を持つ。このような特色から、水試料中の微量成分分析には特に有効であることが報告されてきた<sup>1)2)</sup>。

この固相濃縮吸光光度法において、目的成分の吸着・濃縮による正味の吸光度は、固相と溶液相間の目的成分の分配比が  $10^4$  程度であれば、目的成分の初濃度、モル吸光係数、固相の有効光路長、溶液相と固相との体積比に比例する。よって、高感度化を図るためには光路長を長くすることと、溶液相と固相との体積比を増大させることの2点が有効となる。しかし、粒子相特有の散乱による減光のために、光量確保のためのなんらかの工夫を行わない限り、1ないし2 mm 程度の光路長までが透過光測定の限界である。従って、固相濃縮吸光光度法の高感度化のためには、両相の体積比を大きくすることのほうがより有効である。

これまでの報告では、マイクロセルを用いても、セル内に均一な粒子相を形成するのに 0.1~0.5 g (約 0.2~1.0 cm<sup>3</sup>) もの固相を必要とした。そのため、溶液法の数百倍の感度を得るためには、数百 cm<sup>3</sup> もの試料溶液を用いなければならず<sup>2)</sup>、測定の対象が河川水、海水のように大量に入手可能なものに限られていた。

本研究では、測定に供する試料量が 1 cm<sup>3</sup> 程度でも、この両相の体積比を大きく維持したまま目的成分を高感度に検出するために、非常に微小な体積の固相、具体的には球状の固相1粒に目的成分を吸着濃縮した後、これに細い光束を入射し、透過光を高倍率の対物レンズを使用して集光、検出する顕微分光法を用いた新しい分析法の開発を行った。光学、測光系、再現性等に関する基礎的な知見を得るためには、非常に安定度の高い Fe(II)-フェナントロリン錯生成系について、定量性を議論するためには、Cr(VI) に対する高い選択性で知られている Cr(VI)-ジフェニルカルバジド錯生成系について検討を行った。

## 2 実 験

### 2.1 装 置

測光装置は既報に従い、測光用と顕微鏡像観察用の二つの接眼部を持つ通常の偏光顕微鏡と、分光・信号処理系、パソコンで構成されたものを使用した<sup>3)</sup>。その模式図を Fig. 1 に示す。光源からの光はチョッパーを経た後、試料相を透過する。光源からの光は単色光ではない

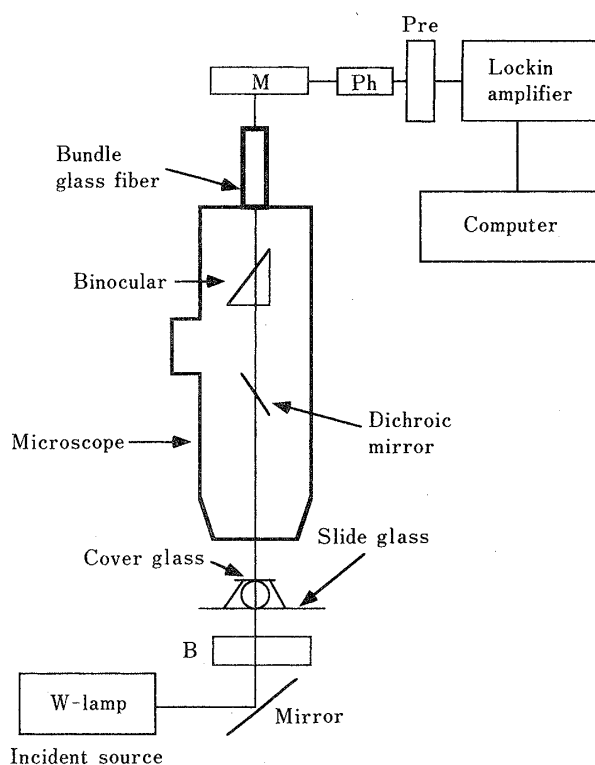


Fig. 1 Apparatus used for the microscopic light measurement of solid phase

M: monochromator; B: chopper; Pre: preamplifier; Ph: photomultiplier

ので、試薬や錯体の分解を考慮して、紫外域を遮断するカットフィルターを試料の直前に挿入した。試料相を透過した光は高倍率 (10~20 倍) の対物レンズによって集光し、測光用接眼部から光ファイバーにより分光系に導入し、分光器を出た光束の強度は光電子増倍管により電流に変換した後、ロックインで増幅し、パソコンで処理した。

### 2.2 試 薬

Fe(II)標準溶液 (0.01 mol dm<sup>-3</sup>): 硫酸鉄(II)アンモニウム六水和物 (キシダ化学) を適量水に溶解し、硫酸を加え酸濃度を 0.1 mol dm<sup>-3</sup> に調整して保存した。

Cr(VI)標準溶液 (1000 mg dm<sup>-3</sup>): 原子吸光分析用標準溶液 (キシダ化学) を用いた。

フェナントロリン溶液 {5 × 10<sup>-2</sup>% (w/v)}: 0.1 g の 1,10-フェナントロリン (キシダ化学, 以下 phen と略す) を 200 cm<sup>3</sup> の温水に溶解し、冷却後使用した。

ジフェニルカルバジド {0.25% (w/v)}: 0.25 g の 1,5-ジフェニルカルバジド (キシダ化学, 以下 DPC と略す) を 100 cm<sup>3</sup> のアセトンに溶解して使用した。

緩衝溶液 {0.5 mol dm<sup>-3</sup> 2-(*N*-モルフォリノ)エタンスルホン酸溶液, pH 6}: 26.7 g の2-(*N*-モルフォリノ)エタンスルホン酸 (同仁化学, 以下 MES と略す) を 250 cm<sup>3</sup> の 0.5% (v/v) アンモニア水に溶解して使用した。

Chelex 100 キレート樹脂 (Bio-Rad, 20~50 メッシュ), ムロマック 50W-X4 陽イオン交換樹脂 (室町化学, 20~50 メッシュ) をそれぞれ Fe(II)-phen, Cr(VI)-DPC 錯体の吸着に用いた。各イオン交換樹脂は 18~22 メッシュの試験用ふるいを用いて粒度をそろえた。

### 2.3 実験操作

Fe(II)-phen 錯生成系については, Fe(II) イオンとして 10<sup>-8</sup> mol 程度含む溶液に, MES 緩衝溶液 1 cm<sup>3</sup> と phen 溶液を 4 cm<sup>3</sup> を加えて全量を 50 cm<sup>3</sup> とした後, その 1 cm<sup>3</sup> を内容量 5 cm<sup>3</sup> 程度のサンプル瓶に採り, これに粒度をそろえた Bio-Rad Chelex 100 陽イオン交換樹脂 1 粒を加え, 吸着平衡に達するまで 24 時間程度振り混ぜ機を用いて振り混ぜた。粒径は, 取り扱いの簡便さを考えるとあまり小さなものは適さないため, 20 メッシュ (直径約 0.8 mm) 程度とした。

Cr(VI)-DPC 錯生成系については, Cr に関して 10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-9</sup> mol 程度含む溶液に DPC 溶液 0.02 cm<sup>3</sup> と 2.5 mol dm<sup>-3</sup> 硫酸 0.02 cm<sup>3</sup> を加えて全量を 1 cm<sup>3</sup> とした後, Fe(II)-phen の場合と同様, ムロマック 50W-X4 陽イオン交換樹脂 1 粒を加え, 吸着平衡に達するまで振り混ぜた。

これらの樹脂を少量の平衡溶液とともにスライドグラスに採り, 固相表面での光の反射を減らすためにカバーグラスで覆った後, 顕微鏡のメカニカルステージ上に固定して透過光強度を測定した。測光系はシングルビーム方式であるので, 初めに試料成分を含まない対照層の透過光量を独立に波長走査して測定した後, 信号処理系に記憶させた。次に試料層の透過光量を測定しながら, 双方の透過光量の商の対数を計算し, 試料相の吸収スペクトル並びに着色成分の吸着・濃縮による正味の吸光度の増加を観測した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 固相の透過光測定

固相濃縮吸光光度法において, 観測される吸光度値  $A$  は次式のように表すことができる<sup>2)</sup>。

$$A = A_R + A_{RC} + A_{RL} + A_S \quad (1)$$

ここで  $A_R$  は固相の吸収-散乱バックグラウンド,  $A_{RC}$

は固相内の試料成分,  $A_{RL}$  は共存する有機発色試薬,  $A_S$  は共存する平衡溶液によるそれぞれの吸光度を示す。本研究で取り扱った錯生成系並びに実験条件においては, 有色化学種の固相-溶液相間の分配比は, いずれの錯生成系に関しても 10<sup>4</sup> 以上であり, 又発色試薬自身の吸収も可視域においてほとんど観測されなかったため,  $A_S$ ,  $A_{RL}$  は無視することが可能であった。 $A_R$  には固相による吸収や散光 (表面反射や拡散反射) が関与する。試料成分の吸着はパッチ法で行われるが,  $A_{RC}$  を各パッチに関して再現性良く測定するためには, この  $A_R$  の変動が粒子間で大きくならないような測光系の最適化, 並びに吸収バックグラウンドと固相の有効光路長を一定にするための粒度の均一化が肝要となる。

### 3.2 対物レンズの焦点

単一粒子の顕微鏡測定では, 粒度が各パッチごとに厳密には等しくないため, 対物レンズの焦点の位置を各粒子ごとに合わせなければならない。

着色成分が吸着した球状の固相粒子に光源からの光を透過させたとき, 観測される顕微鏡下での観察像を Fig. 2 に模式的に示した。固相自体が球レンズとして働くため, 透過光は固相粒子の上方で焦点を結ぶ。この位置に対物レンズの焦点を合わせると, その観察像には Fig. 2 に示すような色素の吸着により着色した部分と, 影になった黒色の部分の二重円の中に強く光る部分が見られ, 透過光強度も最大となった。対物レンズの焦点を固相上方の焦点から固相中心の方に近づけていくと, 二重円の中の強く光る部分が小さくなっていく。そして, 対物レンズの焦点が固相の表面に合うと, 観察像は着色部分と影の部分の完全な二重円となる。更に焦点を固相の中心の方へ近づけていくと, 着色部分の中から若干色の薄い別の着色部分が広がっていき, 対物レンズの焦点が固相の中心に合うと影の部分がなくなり, 完全に着色部分だけとなった。従って, 対物レンズの焦点を再現性良く合わせることでできる位置として, 透過光の焦点, 固相の表面, 固相の中心の三点を選んで更に検討した。

対物レンズの焦点を透過光の焦点に合わせた場合には, 透過光強度が最高になるためノイズの少ないシグナルが観測できた。しかし固相粒子は, 少量の平衡溶液とともにスライドグラス上に載せられ, その周囲を平衡溶液で満たされた状態でカバーグラスに覆われているが, その位置は固定されていないため, 波長走査中の間にわずかではあるが位置が動くことがあった。対物レンズの焦点を透過光の焦点位置に合わせたときは, この固相粒子の軽微な動きにも透過光強度が敏感に変化した。

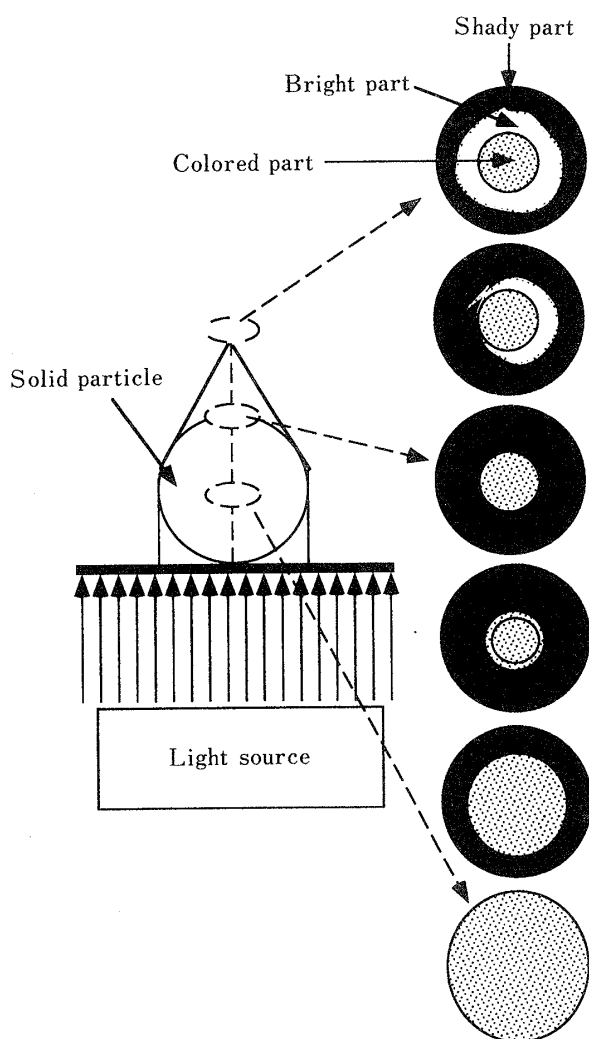


Fig. 2 Schematic images of a solid particle with the position of the focal point of objective lens

対物レンズの焦点を固相の中心に近づけていくにつれて、透過光強度も指数関数的に弱くなったが、その一方で固相粒子の動きや焦点深度のずれが、透過光測定の実現性に与える影響も小さくなった。固相の表面と中心に対物レンズの焦点を合わせた場合の透過光強度の差はあまりなかったため、焦点の位置のずれによる影響のより小さかった固相の中心に対物レンズの焦点を合わせて、以下の測光操作を行った。

### 3.3 粒度の均一性

濃度の異なる Fe(II)-phen 溶液  $1\text{ cm}^3$  に対し、2.2 で示したように、ふるいによって粒度をそろえた Chelex 100 樹脂 1 粒を加えて赤色錯体を十分に吸着させた後、固相の吸収を測定した結果を Table 1 に示した。Chelex 100 は透光性が良好であるため、単純な陽イオ

Table 1 Effect of the uniformity of solid particle size on the reproducibility of net absorbance of Fe(II)-phen complex

| Fe(II) concentration/mol dm <sup>-3</sup> | Particle size /mm | Net absorbance |
|-------------------------------------------|-------------------|----------------|
| $0.8 \times 10^{-8}$                      | 0.73              | 0.156          |
|                                           | 0.80              | 0.162          |
|                                           | 0.83              | 0.160          |
|                                           | 0.86              | 0.162          |
|                                           | 0.90              | 0.169          |
| $1.6 \times 10^{-8}$                      | 0.77              | 0.485          |
|                                           | 0.80              | 0.485          |
|                                           | 0.80              | 0.489          |
|                                           | 0.80              | 0.511          |
|                                           | 0.83              | 0.499          |
| $2.4 \times 10^{-8}$                      | 0.72              | 0.694          |
|                                           | 0.75              | 0.721          |
|                                           | 0.77              | 0.691          |
|                                           | 0.77              | 0.711          |
|                                           | 0.80              | 0.756          |

Sample volume:  $1\text{ cm}^3$

ン交換濃縮のために使用した。各濃度における測定は、粒度をそろえたイオン交換樹脂粒から 5 粒を無作為に抽出して、赤色錯体を吸着させた後、その各々に対して行った。対物レンズの焦点を固相の中心に合わせることと、粒度をある程度そろえることで、試料層と対照層の  $A_R$  はほぼ相殺されるため、波長走査により得られた吸収スペクトルの型は、溶液法で得られるものと同じであった。従って通常固相法で行われるように、着色成分の吸収極大波長 (515 nm) と、固相の吸収のない波長 (650 nm) との吸光度差を定量に用いた。Table 1 に示すとおり、2.2 で述べたようなふるいを使用した方法では、粒度がかなり不均一であったが、その不均一さほど  $A_{RC}$  の変動は大きくはなく、その相対標準偏差はいずれの濃度の試料に対しても  $\pm 5\%$  以下であった。粒度は、 $A_{RC}$  と固相の吸収バックグラウンドの双方に直接影響を与えるため、定量性の確立にはできる限りの粒度の均一化が不可欠である。しかし、顕微鏡下で観察しながら厳密に粒度をそろえるような必要はなく、2.2 で述べた程度の方法で定量性は十分確保されることが確認された。

### 3.4 クロムの定量への応用

以上、測光等に関する基礎的な知見が得られたので、これらの結果を踏まえて、本法を、既に詳細に研究されている DPC を発色試薬として用いるクロムの定量法に応用した。酸濃度などの実験条件の詳細は既報<sup>4)</sup>に従っ

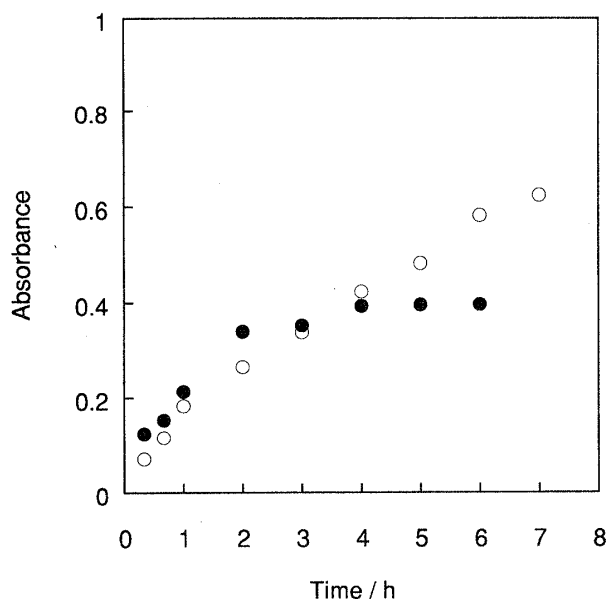


Fig. 3 Effect of shaking time on the adsorption of Cr(VI)-DPC complex on cation-exchange resin

○: at room temperature; ●: at 40°C; Cr(VI) concentration:  $3 \mu\text{g dm}^{-3}$ ; Sample volume:  $1 \text{ cm}^3$ ; Resin: Muromac 50W-X4-H<sup>+</sup>, 1 particle

た。測光に関する上記の最適条件下で透過光測定を行ったところ、Fe(II)-phen 錯生成系と同様に、得られた吸収スペクトルは溶液中のものと同一であったので、錯体の吸収極大波長の 550 nm と樹脂による吸収のない 650 nm の吸光度差を定量に用いた。

**3・4・1 Cr(VI)-DPC 錯体のイオン交換樹脂粒への吸着時間** 試料溶液中の Cr(VI)-DPC 錯体が 1 粒の固相粒子に吸着される際の吸着平衡時間について検討を行った (Fig. 3)。固相と溶液相の体積比が数千倍以上と非常に大きいこと、固相が単一の粒子であり、より微小の粒子を同体積だけ加えるよりも固相の表面積が小さいことなどの理由により、吸着平衡に達するまで常温では 7 時間以上必要であった。しかし試料溶液の温度を 40°C まで上げると 2 時間でほぼ吸着平衡に達したが、平衡時の吸光度値が常温の場合の 60% ほどに低下した。これは錯体の分解のためと考えられたが、いったん固相に吸着した錯体は、顕微鏡下で 2 時間以上放置してもその吸光度に変化は見られなかった。固相と溶液相の分離、測定は短時間で終わるので、実際の分析では目的成分の完全吸着は必要とせず、適当に一定時間後かくはんを打ち切ることで、分析時間の短縮を図ることも可能であった。なおかくはん子を用いたかくはんでは、樹脂粒がしばしば破碎されることがあるので、吸着平衡

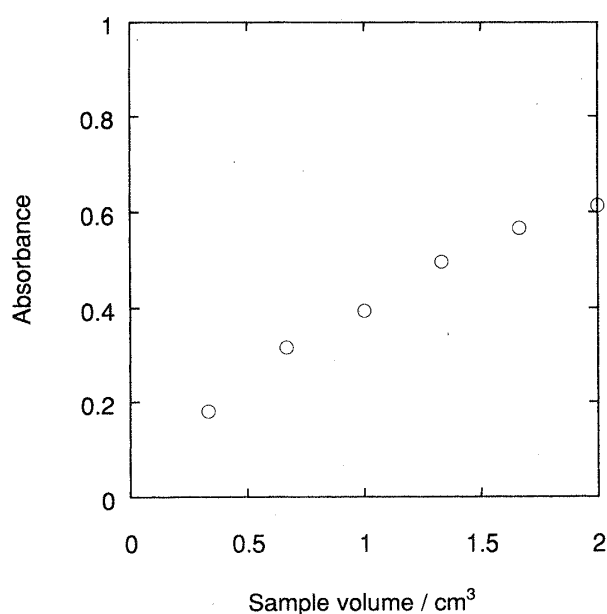


Fig. 4 Effect of sample volume on the net absorbance of Cr(VI)-DPC complex

Cr(VI) concentration:  $2 \mu\text{g dm}^{-3}$

には振り混ぜ機を用いた。

**3・4・2 試料溶液体積** 本法には固相への濃縮過程が含まれているため、目的成分の検出感度は、固相の体積と試料溶液体積との比とともに増加する。Cr(VI)-DPC 錯生成系のように陽イオン交換樹脂相に対して非常に大きな分配比 ( $10^4$  以上) を持つ系では、1 粒のイオン交換樹脂粒に対して、試料溶液体積を  $2 \text{ cm}^3$  程度まで (両相の体積比にして約 7500 倍まで) 増加させても検出感度は増加した (Fig. 4)。試料体積を濃度によって変化させることで、広いダイナミックレンジでの測定が可能であった。

**3・4・3 検量線** 濃度の種々異なる試料溶液  $1 \text{ cm}^3$  を用いた際に観測される二波長における吸光度差 ( $\Delta A$ ) を濃度 ( $C$ ) に対してプロットしたところ、7 時間かくはんした後得られた検量線は、 $0 \sim 10 \mu\text{g dm}^{-3}$  の範囲で、

$$\Delta A = 0.199C + 0.045 \quad (2)$$

となり、その相関係数も 0.998 と良好であった。又、種々の濃度の Cr(III) を含む溶液に対して、 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  となるように硫酸セリウム(IV)を添加し、加熱して Cr(VI) まで酸化した後冷却、その後六価の場合と同様の操作により吸光度測定を行った。その結果、

$$\Delta A = 0.200C + 0.095 \quad (3)$$

で示される相関係数 0.996 の直線が得られ、Cr(III) に対しても十分定量性があることが確認された。

**3・4・4 溶液法との感度の比較** 通常の溶液法（光路長 1 cm）と感度を比較するために、双方の方法に関して同じ吸光度値を与えるような目的成分の濃度比を既報に従って計算した<sup>5)</sup>。直径 0.8 mm の固相粒子（固相光路長 0.8 mm）を 1 cm<sup>3</sup> の試料溶液に加えたとき、試料溶液中の着色成分がすべて固相に濃縮されたと仮定して計算される値は約 300 であり、溶液法に比べて 300 倍程度高感度であることが予測された。実測値から得られた値は 280 であり、良い一致が見られた。

**3・4・5 分析精度・検出限界** 分析精度の検討はクロム(VI) の 2 μg dm<sup>-3</sup> 溶液を用いて行った。この溶液の 5 回の繰り返し測定の結果得られた相対標準偏差は ± 3.1% であった。同様に 5 回の空試験測定を行い、その変動幅の 2 倍の吸光度値を示すクロム濃度を検出限界としたところ 0.2 μg dm<sup>-3</sup> であった。今回、実試料への応用こそ行っていないが、過去に DPC を用いているような試料中に存在する Cr が定量されており<sup>6)</sup>、又固相分光法においても天然水中の微量 Cr の定量例<sup>4)7)</sup>が報告されていることから、本法を実試料の定量に応用することは十分可能であると考えられる。

本研究は、スペクトルの帰属等の定性的なデータ収集

を主目的とする顕微分光の技術を、微量分析の分野に適用することに特徴がある。本研究により、わずか 1 粒の固相粒子に対してもベールの法則が成立することが確認された。分析精度こそ通常の溶液法には及ばなかったが、溶液法で直接測ることのできない濃度レベルでの値としては、さして悪い値ではないと思われる。又、本法は、高い分配比と吸光係数を有する錯生成系に対しては、1 cm<sup>3</sup> のサンプル量で 1 μg dm<sup>-3</sup> 以下の検出限界が容易に達成可能であるから、定量に使用できる量に制限のある雨水などの環境試料や、生体試料中の微量成分の定量等への応用が期待される。又、既に報告されている固相分光法による定量法についても、新たなはん用性を与えると考えられる。

なお本研究は文部省科学研究費補助金（08740579）の助成を受けた。記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi: *Talanta*, **23**, 449 (1976).
- 2) K. Yoshimura, H. Waki: *Talanta*, **32**, 345 (1985).
- 3) 進野 勇: 鉱物学雑誌, **22**, 21 (1993).
- 4) K. Yoshimura, S. Ohashi: *Talanta*, **25**, 103 (1978).
- 5) 吉村和久, 脇 博彦, 大橋 茂: 化学の領域, **31**, 67 (1977).
- 6) H. Onishi: "Photometric Determination of Traces of Metals", Part IIA, p. 412 (1986), (A Wiley-Interscience Pub., New York).
- 7) K. Yoshimura: *Analyst* (London), **113**, 471 (1987).

## 要 旨

試料溶液中の微量着色成分をイオン交換体等の固相に吸着濃縮させ、その固相減光度を直接測定する固相濃縮吸光度法では、溶液相と固相との体積比を大きくすることが高感度化には特に有効である。この両相の体積比を大きく維持したまま、なおかつ測定に供する試料量を少なくするために、試料溶液中のイオン性着色成分を吸着濃縮させた直径約 0.8 mm のイオン交換樹脂粒 1 粒に、細い光束を入射し、透過光を高倍率の対物レンズを使用して集光、検出する顕微分光法を用いた新しい分析法の開発を行った。Fe(II)-フェナントロリン錯生成系、Cr(VI)-ジフェニルカルバジド錯生成系に適用した結果、1 粒の樹脂粒に対してもベール則が成立することが確認された。又、対物レンズの焦点を樹脂粒の中心に合わせることで再現性も向上した。1 cm<sup>3</sup> 程度の試料溶液を用いても濃縮効率は数百倍であり、サブ μg dm<sup>-3</sup> レベルの微量成分の定量が精度良く可能であった。