

フラビンモノヌクレオチド及びTween85 ミセル増感化学発光
光を利用する亜硫酸イオンのフローインジェクション分析

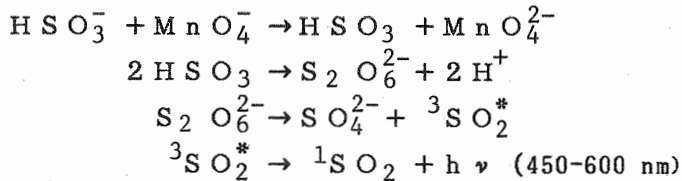
加藤 政 吉, 山 田 正 昭, 鈴 木 繁 喬

東京都立大学工学部工業化学科
〒158 世田谷区深沢2-1-1

亜硫酸イオンは硫酸酸性過マンガン酸カリウムで酸化すると弱い化学発光を生じるが、その強度はフラビンモノヌクレオチド（フルオレッサー）及びTween85（非イオン界面活性剤）ミセルの存在により増加する。この化学発光系を検出手段とする亜硫酸イオンのフローインジェクション分析法を検討した。 $2 \times 10^{-6} \text{ M KMnO}_4$ (pH2.5)、 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ フラビンモノヌクレオチド、 10 g/l Tween85 の条件で定量下限は $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ (200 μl 試料注入)、分析速度は300 検体/h、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の試料を連続10回注入の変動係数は4.8 %であった。

結 言

酸性条件下で、亜硫酸イオンの過マンガン酸イオンによる酸化反応は微弱な化学発光 (CL) を伴って進行することが知られている¹⁻³⁾



このCL反応に基づいて、四塩化水銀酸塩を含む溶液に吸収後酸性にして HSO_3^- を遊離させ、フォトンカウンターの使用により大気中subppbレベルの二酸化イオウの定量が行なわれている。一方、著者らはこの微弱なCLを強めるためにフルオレッサーとしてフラビンモノヌクレオチド (FMN) を用いてCL強度を約330倍

に高め⁴⁾、また界面活性剤ミセルの存在によりCL強度をさらに高め、光子カウンタを使用することなく大気中ppbレベルの二酸化イオウの直接連続測定を可能にした⁵⁾。このように界面活性剤ミセルのような配向性のある分子集合体を含む溶液中でCL反応を行なわせるとCL効率あるいはエネルギー移動効率が向上する場合がある⁶⁾。著者らはすでに1,10-フェナントロリンCLを利用するCu(II)のFIAで、陽イオン界面活性剤のミセル効果によりpgレベル(20 μ l試料)のCu(II)の選択的検出が容易に行なえることを明らかにした⁷⁾。本報では、界面活性剤などを含む溶液をCL反応メディアとして用い、亜硫酸イオウのFIAにおける検出感度の向上を図った。

実 験

装 置

図1及び2にフローシステムとフローセルを示す。反応試薬溶液である硫酸酸性過マンガン酸カリウム溶液($\text{MnO}_4^-/\text{H}^+$)とFMN溶液はペリスタポンプ(ATTO SJ 1220)により同じ流量で送液される。試料の亜硫酸イオウを含む溶液はキャリアー水中に200 μ lバルブ注入器(草野科学、2連3方切換コック)によって注入される。

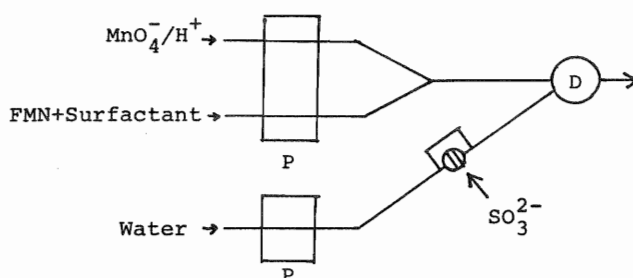


Fig. 1 FI-CL system

フローセルはガムテープ上に内径2mm、外径4mmのPVCチューブ25cmをうず巻状に固定したもので、光電子増倍管(浜松ホトニクス、R268)の冷却器(浜松ホトニクス、C659)の窓に貼り付けてある。キャリアー水はセル付近で内径0.5mm、外径1mmのステンレス鋼管の中を流れ、セルの中央で反応試薬溶液と合流する。

試薬

試薬は市販特級品をそのまま使用した。水はミリポア (Milli-R) 水を蒸留したものを用いた。

過マンガン酸カリウム水溶液：約 $2 \times 10^{-2} \text{M}$ 溶液を調製し、約20分煮沸、2日放置後ろ過し、褐色ビンに保存した。必要に応じてシュウ酸ナトリウムを用いて標定した。

亜硫酸イオン水溶液：脱酸素水に亜硫酸水素ナトリウムを加えて調製し、水酸化ナトリウム ($1.5 \times 10^{-4} \text{M}$) でアルカリ性にした。

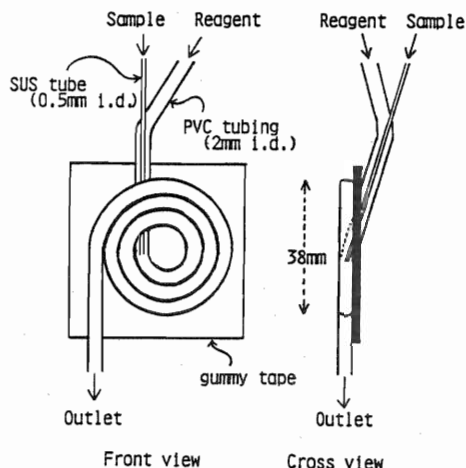


Fig. 2 Flow cell

結果及び考察

操作条件の決定

CL反応に及ぼす溶液流量、反応試薬濃度、pHについて検討した結果、溶液流量として反応試薬溶液については消耗を考慮して $10 \text{ml}/\text{min}$ (それぞれ $5 \text{ml}/\text{min}$)、キャリアー水については $12 \text{ml}/\text{min}$ (ポンプの最大流量) を選んだ。フローセルを流れる溶液の全流量は $22 \text{ml}/\text{min}$ となり、このときの試料のセル内滞留時間は $8 \sim 9 \text{s}$ である。FMN, MnO_4^- 濃度、およびpHとしてはそれぞれ $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 $2 \times 10^{-6} \text{M}$ 、および2.5を選んだ。試薬濃度が高くなるに従い、またpHが低くなるに従いCL強度が小さくなるが、それぞれ試薬溶液の着色、溶液中での試料の溶存状態に帰因するものと考えられる⁵⁾

界面活性剤、有機溶媒の添加

FMN 溶液に界面活性剤あるいは有機溶媒を加え、CL反応に及ぼす影響を調べた(表1)。結果は何も添加しないときの $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 亜硫酸イオンのCL強度を1.0としてその相対値であらわされている。

CL強度の増加は、非イオン界面活性剤のTween 85 (polyoxyethylene(20) sorbitan trioleate) で最も大きく(28倍)、次いでTween 80 (polyoxyethylene(20) sorbitan monooleate) の13倍である。この増感効果の差はTween 20~

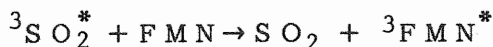
Table 1 Effect of reaction media on CL intensity

Reaction media (CMC) ^{a,b}	Concn. ^b	Relative CL intensity		
		Sulfite concn., M		
		5×10^{-6}	1×10^{-6}	5×10^{-7}
None		1.0	0.05	
CTAB (9×10^{-4})	5×10^{-5}	1.2		
	1×10^{-3}	0.5		
SDS (8×10^{-3})	5×10^{-4}	1.1		
	2×10^{-3}	0.8		
Brij-35 ($6-9 \times 10^{-5}$)	1×10^{-3}	0.7		
	4×10^{-3}	0.7		
Tween 20 (0.060)	1	2.0	ND	
	3	1.9	0.13	
	5	1.3	0.11	
Tween 40 (0.029)	10	1.7	ND	
	20	1.9	0.23	
	25	1.8	0.15	
Tween 60 (0.027)	5	1.1	ND	
	20	1.6	0.13	
	25	1.4	0.16	
Tween 80 (0.013)	0.5	3.5	0.21	
	5	2.0	0.65	
	20	1.8	0.25	
Tween 85 (unknown)	5	6.5	1.2	0.30
	10		1.4	0.43
	15		1.3	0.50
	20		1.2	0.35
CH ₃ OH	10	0.52	ND	
C ₂ H ₅ OH	10	0.35	ND	
CH ₃ COCH ₃	10	2.8	0.16	
	60	8.0	0.48	
CH ₃ CN	10	2.0		
	30	6.3		

^a Critical micelle concentration for surfactants

^b g/l for Tween surfactants; M for other surfactants;
% for organic solvents

80と85の分子構造に由来するものと考えられる。すなわち、1分子中に3本の疎水基と1本のポリオキシエチレン鎖(20ユニット)を有しているTween 85は、1本の疎水基と3本で20ユニットのポリオキシエチレン鎖を有している Tween20~80より安定で、リジッドな、配向性の強いミセル(二分子膜[†])を形成すると思われる。その結果、エネルギー移動



の効率がより向上し、CL強度が増加するものと考えられる⁵⁾一方、FMNが存在しないと増感効果は観測されず、逆にCL強度は減少した。イオン性界面活性剤の場合、ミセル形成濃度(CMC)以上では反応試薬とミセル界面の電荷の反発のためCL反応が阻害され、CL強度は減少している。非イオン界面活性剤のBrij35(ポリオキシエチレン(23)ドデカノール)及び有機溶媒のアルコールにおいてもCL強度は減少しているが、FMNが存在しないときにはCLは検出されないのも、その原因は SO_2^* の失活あるいは SO_2^* の前駆体である HSO_3 ラジカルとの反応に基づくものと考えられる。一方、アセトン及びアセトニトリルの場合には、 SO_2^* の失活、 HSO_3 ラジカルとの反応はアルコールほどおこらず、むしろFMNへのエネルギー移動に対して有利に働くためCL強度が増加すると考えられる。

FMNの蛍光スペクトルはアセトンあるいはTween 85存在下では変化しないが、イオン性界面活性剤が存在するとその強度は減少するのでこれもCL強度の減少の一因といえよう。

検量線

Tween85が存在するときと存在しないときの検量線を図3に示す。直線領域は狭いが、界面活性剤濃度を減少させたり、 MnO_4^- 濃度を増加させることにより直線領域を亜硫酸イオンの高濃度側に移動させることができる(このとき定量下限も高濃度側に移動する)。定量下限は $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 、分析速度 300検体/h、変動係数($1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $n=10$)は4.8%である。

[†]電子顕微鏡観察の結果、Tween80では像は見られなかったが、Tween85では像が確認された⁸⁾

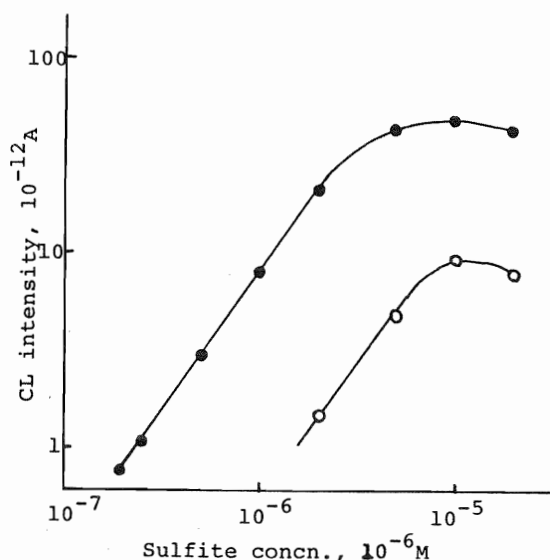


Fig. 3 Calibration graphs
 $2 \times 10^{-6}M$ $KMnO_4$ (pH 2.5), $1 \times 10^{-3}M$ FMN
 ○ : without surfactant
 ● : with 10 g/l Tween 85

他イオン

亜硫酸イオン以外のイオンが与えるCL強度、及び亜硫酸イオンのCL強度に及ぼす他イオンの影響をそれぞれ表2、3に示す。表3の共存イオンによる干渉は、 $1 \times 10^{-6}M$ 亜硫酸イオン溶液をキャリアーとして送液し、そこに他イオンを含む溶液を200 μ l注入することによって調べた。表2より、還元性の硫黄を含むイオンがCL応答を与えることがわかる。また表3より、それ自身CL応答を与えなくても共存すると干渉を示すイオンが存在することがわかる。干渉は亜硫酸イオンあるいは反応試薬との酸化還元反応、消光作用、あるいは重原子効果に基づくものと考えられる。

以上、本研究は大気中の二酸化イオウの直接、連続測定を目的として行なったものであるが、水溶液中の亜硫酸イオンのFIAも可能である。しかしそのためには、感度の点では十分であるものの、共存イオンの影響を低減させる工夫、(例えば水溶液中の亜硫酸イオンを二酸化イオウにし、テフロン膜を透過⁹⁾させてからCL反応を行なわせる)が必要となろう。

Table 2 Selectivity of FMN-sensitized and Tween 85 micelle-enhanced CL of sulfite

Ion	Concn., M	Relative CL intensity
SO_3^{2-}	10^{-6}	100
S^{2-}	10^{-4}	85
	10^{-5}	20
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	10^{-4}	20
	10^{-5}	20
	10^{-6}	ND

10^{-4} M SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- , Cl^- , Br^- , I^- , NO_2^- , NO_3^- , Ag^+ , Pb^{2+} , Fe^{3+} , NH_4^+ gave rise to no emission.

Table 3 Effect of concomitant ion on the CL intensity of sulfite

Concomitant ion	Concn., M	Relative error, %
NO_2^-	10^{-4}	-80
	10^{-5}	-60
	10^{-6}	-15
I^-	10^{-4}	-65
	10^{-5}	-30
	10^{-6}	-15
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	10^{-4}	-65
S^{2-}	10^{-4}	-10
Ag^+	10^{-4}	+10
Pb^{2+}	10^{-4}	+10
Fe^{3+}	10^{-4}	-20

10^{-4} M F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , NH_4^+ did not interfere.

文 献

- 1) J. Stauff, W. Jaeschke: Atmos. Environ., 9, 1038 (1975).
- 2) W. Jaeschke, J. Stauff: Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 82, 1180 (1978).
- 3) F. X. Meixner, W. A. Jaeschke: Int. J. Environ. Anal. Chem., 10, 51 (1981).
- 4) M. Yamada, T. Nakada, S. Suzuki: Anal. Chim. Acta, 147, 401 (1983).
- 5) M. Kato, M. Yamada, S. Suzuki: Anal. Chem., 56, 2529 (1984).
- 6) C. M. Paleos, G. Vassilopoulos, J. Nikokavouras: J. Photochem., 18, 327 (1982)
- 7) M. Yamada, S. Suzuki: Anal. Lett., 17, 251 (1984).
- 8) 未発表
- 9) 長島珍男、鈴木繁喬: 分析化学、32、521 (1983) .

(1984年11月21日 受理)

Flavin Mononucleotide Sensitized and Polyoxyethylene(20)
Sorbitan Trioleate Micelle-Enhanced Chemiluminescence
for Sulfite Determination by Flow Injection Method

Masayoshi Kato, Masaaki Yamada,^{*} and Shigetaka Suzuki

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Technology,
Tokyo Metropolitan University, Setagaya-ku, Tokyo 158

The weak emission arising from the excited sulfur dioxide produced by the oxidation of sulfite by the acidic permanganate solution is sensitized by flavin mononucleotide; the sensitized emission is further enhanced by means of Tween 85 (polyoxyethylene(20) sorbitan trioleate) surfactant micelles. This chemiluminescence system is used to determine sulfite by flow injection method. Under conditions

of 2×10^{-6} M KMnO_4 (pH 2.5), 1×10^{-3} M flavin mononucleotide containing 10 g/l Tween 85 surfactant, and flow rates of each reagent (5 ml/min) and carrier stream (12 ml/min), the lower limit of determination is 2×10^{-7} M (200- μ l sample injection), the sampling rate is 300/h, and the relative standard deviation is 4.8 % for 1×10^{-6} M sulfite (n=10).