

9410 界面活性剤ミセルを利用した海水中の微量金属成分の分離濃縮と化学種分析

助成研究者：齊藤 紘一（東北大学 理学部）

共同研究者：寺前 紀夫（東北大学 理学部）

塚原 聡（東北大学 理学部）

勝田 正一（東北大学 理学部）

別所光太郎（東北大学 理学部）

加藤 尚志（東北大学 理学部）

海水や海洋生物中の金属化学種は微量であり、化学構造が酷似したものが共存しており分析に際しては分離、濃縮が不可欠である。本研究においては、分離の媒質に界面活性剤ミセルを用いた新規な微量金属イオンの選択的捕集・濃縮法ならびに海洋藻類クロロフィルの高分解能分離分析法の開発をめざした基礎的実験を行い、有望な見通しを得た。

1. 界面活性剤ミセルを用いた微量金属イオンの捕集・濃縮

界面活性剤水溶液中で疎水性物質は可溶化する。また、非イオン性界面活性剤はシリカゲルに吸着する。本研究では、これら二つの特性を組み合わせ、微量金属イオンを無電荷金属錯体として非イオン性界面活性剤ミセル中に取り込み、これを少量のシリカゲル上に捕集する、新規な分離濃縮法を検討した。1-(2-ピリジルアゾ)-2-ナフトール(Hpan)を溶解した非イオン性界面活性剤 Triton X-100 水溶液 (pH 7) に Zn(II)水溶液を添加し、この溶液を高純度シリカゲル(比表面積 500 m²/g)と25℃で1時間振とうした後、遠心分離した。Znの吸着は迅速で、振とう時間 5分で平衡に達した。シリカゲルにTriton X-100が定量的に吸着する条件下でZnは定量的に捕集され、Zn-pan錯体はシリカゲルに吸着した界面活性剤相への分配により捕捉されていることが分かった。このようなミセルの挙動を利用した新規な金属イオンの捕集法の実用化が期待できる。

2. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) によるクロロフィル分析

海水および海藻中のクロロフィル (Chl) 分析法として吸光法や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)が広く用いられているが、Chl-c₁、-c₂ の分離は極めて困難であり、これまで分別定量は行われていない。本研究ではイオン性界面活性剤 ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)ミセル溶液中での MEKCの適用性を検討した。単純なミセル溶液を用いる普通のMEKC法では、疎水性の高い Chlの溶解性は低く石英キャピラリーに吸着する傾向があり、泳動分離は不可能であったが、Chlの中心金属 Mgに対し相互作用するピリジンを溶液に添加することにより、Chl-a、-b、-c₁、-c₂ およびその脱 Mg形を相互に分離できることを見出した。実用性を実試料(ワカメ)分析で確認できた。

9410 界面活性剤ミセルを利用した海水中の微量金属成分の分離濃縮と化学種分析

助成研究者：斉藤 紘一 (東北大学 理学部)

共同研究者：寺前 紀夫 (東北大学 理学部)

塚原 聡 (東北大学 理学部)

勝田 正一 (東北大学 理学部)

別所光太郎 (東北大学 理学部)

加藤 尚志 (東北大学 理学部)

海水や海洋生物中の金属化学種は微量であり、化学構造が酷似したものが共存しており分析に際しては分離、濃縮が不可欠である。これまで利用されてきた分離や濃縮法の多くの例では、水または有機溶媒が媒質として用いられているが、本研究では、界面活性剤ミセル溶液を分離の媒質に用いて、(1)新規な微量金属イオンの選択的捕集・濃縮法、および(2)海洋藻類クロロフィルの高分解能分離分析法の開発をめざし、実験的な検討を行った。その結果、いずれも実用に発展し得る見通しを得ることができた。

1. 界面活性剤ミセルを用いた微量金属イオンの捕集・濃縮

1.1 研究の背景と目的

ミセルのような分子集合体についての分析化学的関心の多くは、その媒質としての特性に関してである。¹⁾ ミセルは、水溶液中に分散した微小な有機溶媒とみなされ、疎水性の化学種が分配し得る相であるとして取り扱われてきた。金属イオンも、疎水性化学種に誘導することによってミセル擬相に濃縮可能である。²⁾ しかし、溶液中からミセルを分離することは極めて困難な問題であり、ミセルへの物質分配の分離化学的応用は、これまでほとんどクロマトグラフィー^{3,4)}に限られてきた。わずかに、限外ろ過法⁵⁾や曇点以上の温度での凝集を利用した方法⁶⁾など界面活性剤の分離についての報告はみられるが、いずれも複雑で微妙な操作を要するものである。

最近、オキシエチレン鎖を有する非イオン性界面活性剤が水溶液中でシリカゲルに吸着され、シリカゲル/水界面にミセル様の分子集合体を形成することが報告された。^{7,8)} この状態での界面活性剤は、ろ過や遠心分離法などを利用してシリカゲルとともに容易に分離し得ると考えられ、ミセル溶液の状態では実現不可能な分離化学的利用が期待される。

本研究の目的は、シリカゲル表面での界面活性剤集合体形成と無電荷金属錯体生成反応とを組み合わせることにより、水中の微量金属イオンの選択的な捕集濃縮に利用し得る新規な分離法が創造できることを基本的に明らかにすることである。

1.3 実験結果と考察

まず、シリカゲルを加えない溶液だけの系において、Zn-pan 錯体の生成を、Triton X-100, Π pan, Zn^{2+} の初濃度を、それぞれ 1×10^{-2} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, イオン強度 0.1 M の条件下で調べた。波長 555 nm (錯体 $Zn(pan)_2$ の吸収極大波長) における溶液の吸光度を測定して $Zn(pan)_2$ の生成を評価した。

溶液中での錯体の生成は迅速であり、溶液に Zn^{2+} を添加すると直ちに溶液の変色が始まった。反応の pH 依存性を pH 5~9 の範囲で調べたところ、図 2 に示すように、pH 6 以上で定量的に反応することがわかった。

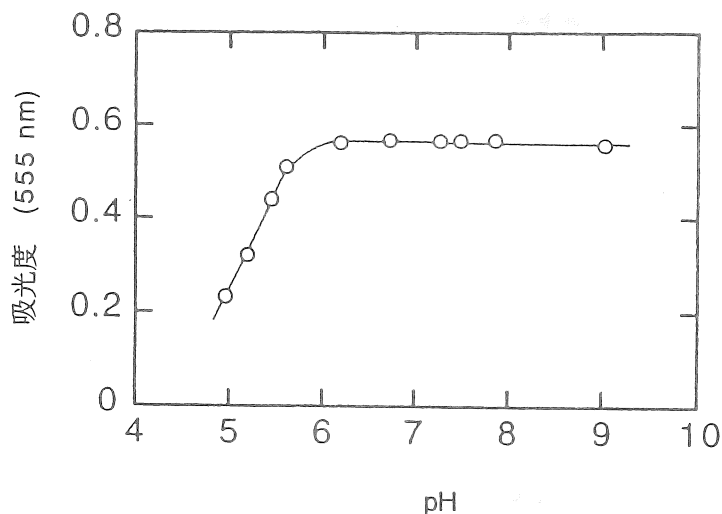
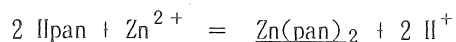


図 2 Zn-pan 錯体生成に及ぼす pH の影響

また、pH 6.8~7.0 において、 Zn^{2+} と Π pan の濃度比を変えて反応を比較した結果から、 Zn^{2+}/Π pan 比 0.5 以下の条件では、次式に示す反応により、無電荷錯体 $Zn(pan)_2$ が生成することが確認された。



ただし、下線は、ミセル中に存在するの化学種であることを示している。

シリカゲルを加えた系での吸着平衡に要する時間を粒径の異なる 2 種のシリカゲルを用いて比較したところ、図 3 に示すように Triton X-100, Π pan, $Zn(pan)_2$ のいずれについても、吸着平衡に要する時間は、シリカゲルの粒度に依存し、粒径 5~40 μ m の場合、振とう時間 5 分以内で平衡に達することがわかった。

異なる界面活性剤濃度で、シリカゲルの量を変化させて吸着率を調べた結果を、図 4 に示す。

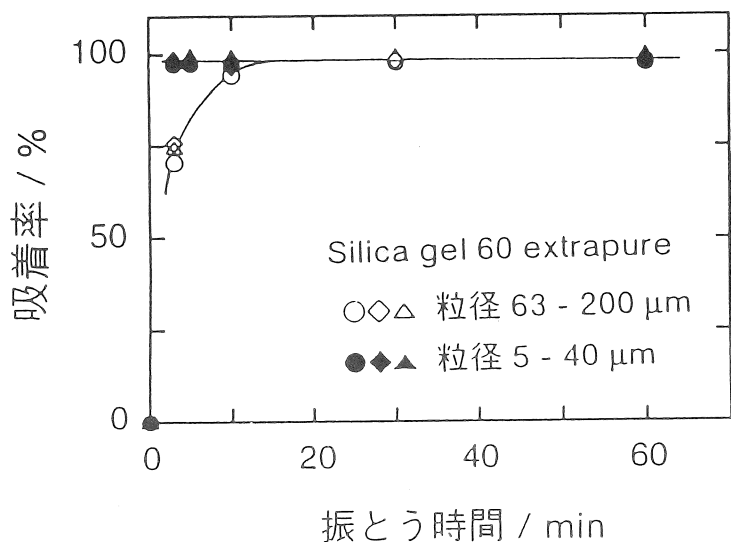


図 3 Triton X-100, Hpan, Zn(pam)₂ の吸着率の振とう時間依存性

○● Triton X-100 ◇◆ Hpan △▲ Zn(pam)₂

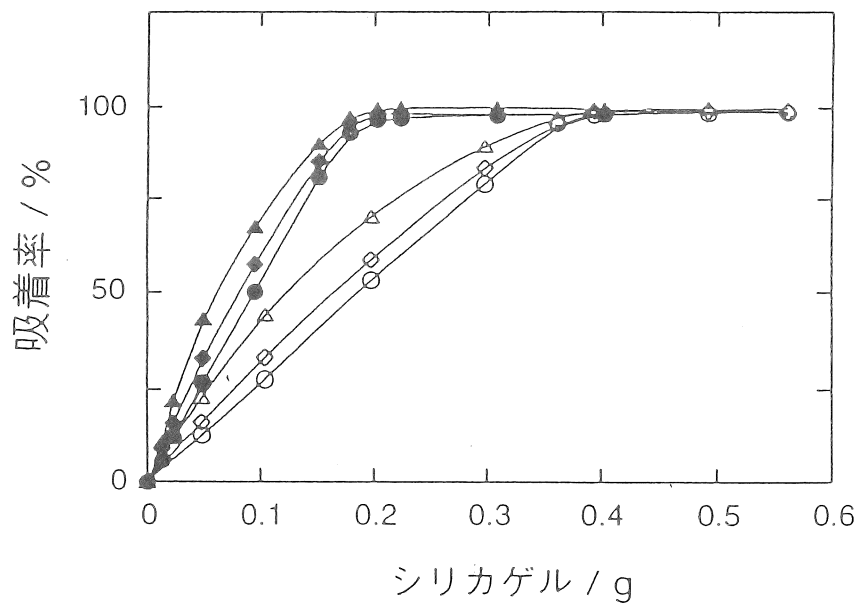


図 4 水溶液 (10 ml) からのシリカゲルへの吸着率とシリカゲル量の関係

水相: Triton X-100, 1×10^{-2} M (○◇△), 2×10^{-2} M (●◆▲); Zn^{2+} , 1×10^{-5} M.

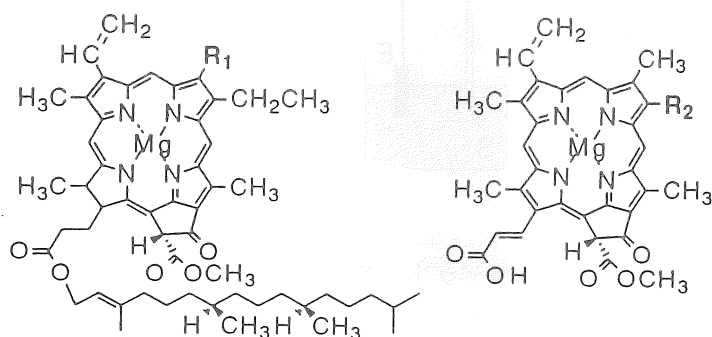
Triton X-100が定量的に吸着する条件では Hpan と $\text{Zn}(\text{pan})_2$ は定量的に捕集され、Triton X-100が吸着容量を超える濃度条件では Hpan と $\text{Zn}(\text{pan})_2$ の捕集は不完全となることが明らかになった。Triton X-100の代わりに陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS)を用いて比較実験を行ったところ、SDSはシリカゲルにほとんど吸着せず、 Hpan と $\text{Zn}(\text{pan})_2$ の捕集も起こらなかった。以上の結果から、 Hpan や $\text{Zn}(\text{pan})_2$ のシリカゲル上への捕集には界面活性剤の定量的な吸着が重要であり、これらの物質はシリカゲルに吸着した界面活性剤相への分配により捕捉されることが明らかとなった。

シリカゲル上に捕集された Zn-pan 錯体は、ろ過によってシリカゲルとともに水溶液から分離可能であった。また、少量のメタノールによってシリカゲル上から錯体を Triton X-100 とともに完全に溶解・回収することができた。

2. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) によるクロロフィル分析

2.1 研究の背景と目的

クロロフィル (Chl) には、a, b, c_1 , c_2 種とバクテリオクロロフィルなどがあり、また関連化合物として脱マグネシウム形であるフェオフィチン類が知られている。植物の種類により含有 Chlの種類や量が異なることから、Chlの分別定量には多方面から関心が持たれてきた。海水および海藻中のクロロフィル (Chl) の定量には、古くから吸光光度法や蛍光光度法が用いられてきた⁹⁾が、他の色素や構造の類似したChl関連化合物の共存する実際の試料では妨害をさけることが難しい。この問題を解決するため高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が適用されるようになった¹⁰⁾が、Chl- c_1 と- c_2 の分離は HPLCによっても困難であり、分離可能なカラムは極めて限定されている¹¹⁾。そのため、海水および海藻中の Chl類の分別定量を行うには、新規の高分解能分離分析法の導入が不可欠である。



Chl-a ($R_1 = \text{CH}_3$)

Chl-a ($R_1 = \text{CHO}$)

Chl- c_1 ($R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$)

Chl- c_2 ($R_2 = \text{CHCH}_2$)

我々は、界面活性剤ミセルへの疎水性化合物の分配現象と電気泳動とを組合せた最新の分離分析法であるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) に注目し、Ch1分析への応用の可能性について検討してきた。¹²⁾ 本研究では、実試料の Ch1分析への MEKC の適用を想定して、Ch1-c₁、-c₂の分離を含むCh1 類の一斉分析法を確立し、実試料に適用して有効性を明らかにするめざした。

2.2 研究方法

あらかじめホーレンソウまたはワカメから抽出分離した Ch1-a, -b, -c₁, -c₂ の標品を対象に、種々の泳動溶液条件の下でキャピラリー電気泳動移動度を測定し、相互分離可能な条件を求めた。主な実験条件は、特に断らない限り以下のようにした。

MEKC を行うためのキャピラリー電気泳動のシステムを図 5に示すように組立てた。分離用キャピラリーには、内径75 μm、有効長 50 cmの熔融シリカ製を用い、泳動液はドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液であり、CAPS緩衝液により pH 11に調整し、必要なら有機溶媒を添加した。試料溶液は、各クロロフィルのアセトン溶液を泳動液で希釈し、内標準としてSudan IIIを添加して調製した。試料は落差法(サイホン法)により、約 4 nlをキャピラリー内に導入した。印加電圧20 kVで電気泳動を行い、UV-吸収検出器を使用し波長 440 nm でエレクトロフェログラムを記録した。

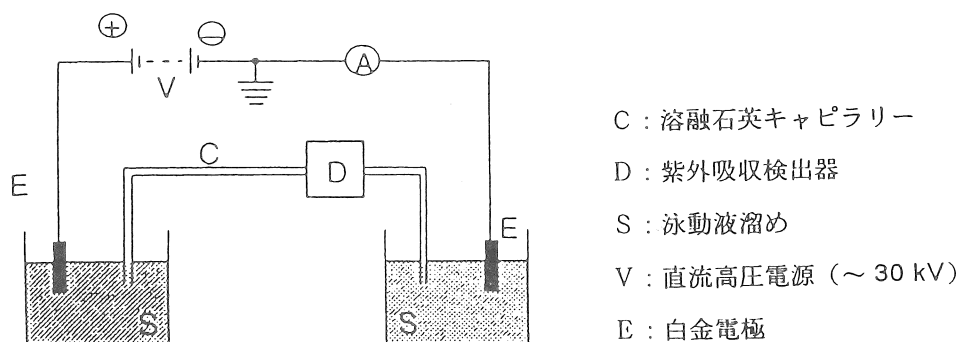


図 5 キャピラリー電気泳動装置の概略

2.3 実験結果と考察

有機溶媒を添加しない SDSミセル溶液を泳動液に用いた系では、Ch1-a, -bとも十分な溶解度が得られなかった。また、Ch1-c₁、Ch1-c₂についてもミセルに完全に分配してし

まい、分離できなかった。これらの問題を解決するため、泳動液への有機溶媒の添加を検討し、4種類の溶媒 [ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトン、ピリジン] をとりあげ、pH 11に調整した SDS水溶液と有機溶媒を体積比で 10:1 ~ 10:8 の範囲で混合して供試したところ、以下の結果を得た。

DMFならびにアセトンでは、SDS溶液に対し10:3 (v/v) 以上の添加によりChl-c₁と-c₂の分離が達成されたが、Chl-a と-b は、混合比10:3 (v/v) 以下の溶液ではピークが現れなかった。混合組成がこれ以上の場合にピークが検出できたがピーク幅は著しく広く、移動時間に再現性はみられなかった。このような挙動は、脱 Mg 形であるフェオフィチン (Phco) では見られないため、Chl の中心金属 (Mg) とキャピラリー内壁との相互作用による吸着に起因するものと考えられた。よりドナー性の大きな溶媒であるDMSOを用いた場合、混合比 10:1 (v/v) 以下の添加でも Chl類 は鋭いピークを与えたが、移動時間は接近しており、Chl-aと-b および Chl-c₁とChl-c₂は分離できなかった。DMSOよりもドナー性が高く Chl の溶解性も大なピリジンを用いた系では、混合比 10:1 (v/v)の添加で良好なピークが得られ、1:2 (v/v) 以上では4種のクロロフィルが相互に分離した。

50 mM SDS, pH 11の水溶液にピリジンを混合した泳動液を用いたとき、各クロロフィルの移動時間は泳動液のピリジンの含有量により、図 6に示すように変化した。電気浸透による移動時間 (t₀)をメタノールをマーカールに用いて測定した結果、t₀値は図中に示すように、ピリジン含有量の増加にともなって増大していることがわかった。これは、ピリジン

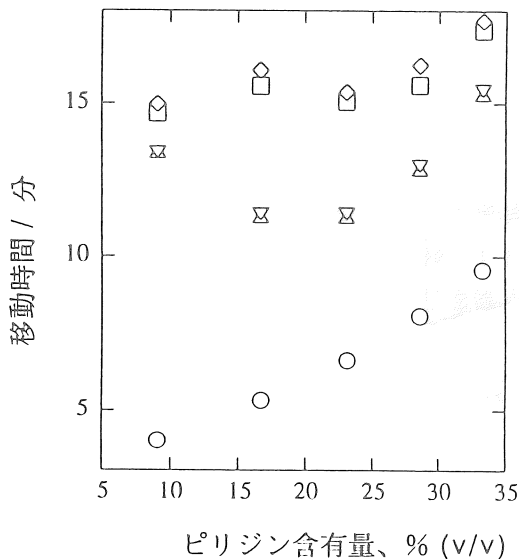


図 6 クロロフィルの移動時間に及ぼす泳動液中ピリジン濃度の影響

◇, Chl-a ; □, Chl-b; △, Chl-c₁; ▽, Chl-c₂; ○, t₀

の添加によって溶液の誘電率が減少し、電気浸透による溶液の移動速度が低下した結果である。ピリジン濃度増加に伴う各クロロフィル類の移動時間の変化が溶液の移動速度の変化に比較して、相対的に小さいという事実は、泳動液中でのクロロフィルのミセルバルク溶液間分配がピリジンの添加で減少することを示すものと解釈される。

泳動液組成を、50 mM SDS (pH 11)-ピリジン (10 : 3, v/v) とし、印加電圧 20 kV, 検出感度を高めるため内径75 μ mのキャピラリーを使用して、4種のクロロフィル標品の混合物について得られたエレクトロフェログラムを図 7に示す。従来、HPLC法ではほとんど不可能であった Chl-c₁, Chl-c₂を含む4種の一斉分離が20分以内で実現されている。

さらに、実試料への適用性を検討した。試料は岩手県大船渡市末崎浜において採取したワカメ (*Undaria pinnatifida*) とし、クロロフィル類をアセトンにより抽出した。抽出液に内標準物質として Sudan III のアセトン溶液を加えた後、泳動液で希釈してキャピラリー内に導入した。得られたエレクトロフェログラムを図 8に示す。クロロフィル以外にもいくつかのピークが得られた。UVスペクトルから、フコキサンチンと β -カロチンであると推定される。

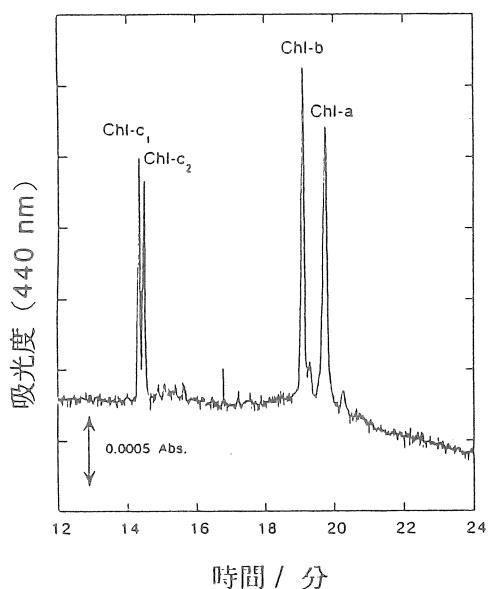


図 7 クロロフィル標品の分離

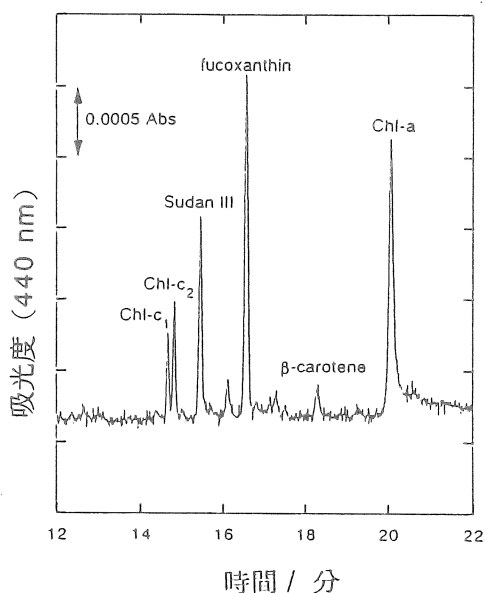


図 8 ワカメのアセトン抽出物の分離

内標準物質にスーダンⅢを用いて内標準法での定量法を検討した。目的物と内標準物質とのピーク面積比及びピーク高比を求めて作成した検量線の直線性は 10^{-6} M \sim 10^{-3} M の範

用で成立し、定量値の再現性は相対標準偏差で1~4%であった。

図8に示したワカメ中のクロロフィルについて、本法（MEKC法）で定量結果を、従来法である吸光光度法とHPLC法での結果と比較して、表1に示す。吸光光度法ではChl-c₁と-c₂は分離できず、HPLCでも分離は不完全である。

表1 ワカメ (*Undaria pinnatifida*) 中のクロロフィルの定量結果

クロロフィル	含有量 (10^{-7} mol/g)		
	MEKC	HPLC ¹²⁾	吸光光度法 ¹³⁾
Chl-a	3.36	3.40	3.86
Chl-c ₁ +c ₂	—	—	0.94
Chl-c ₁	0.15	0.11	—
Chl-c ₂	0.40	0.52	—

3. 今後の課題

本研究では、界面活性剤ミセルを利用した、(1)シリカゲル上への微量金属イオンの捕集・濃縮法、及び(2)クロロフィル類のMEKC分析法、の2点について基礎的検討を行い、今後の金属化学種の分離・定量に有用な知見を得ることができた。今後、海水等の実試料分析に応用するにあたって、以下の点が解決すべき課題となる。

(1)シリカゲル上への微量金属イオンの捕集・濃縮法 について：

基本的に予備濃縮・分離法として分析試料の前処理過程に応用が期待されるものであるから、定量に用いる分析法との整合性について検討することが重要になる。錯形成試薬を選択することにより、海水など高濃度のアルカリ金属イオン共存下で微量金属元素を選択的に捕集・濃縮できるものと期待される。

(2)クロロフィル類のMEKC分析法 について：

分離に関する基本的問題は本研究で解決されている。実試料分析への適用にあたって検討すべき事項は、検出感度の向上である。検出におけるS/Nは、定量下限を支配するから、より高感度な検出法の利用が望ましい。例えば、蛍光検出法は有力な候補と考えられる。クロロフィル分析への応用としては、海水中のプランクトン量や種類の推定、また脱マグネシウム形を定量することによって、プランクトン類の生物活性の評価などを行う上で有用なデータを与えるものと期待される。

4. 文献

- 1 E. Pelizzetti and E. Pramauro, *Anal. Chim. Acta*, **169**, 1 (1985).
- 2 H. Watanabe, *Talanta*, **21**, 295 (1974).
- 3 D. W. Armstrong and F. Nome, *Anal. Chem.*, **53**, 1662 (1981).
- 4 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando, *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- 5 E. Pramauro, A. B. Prevot, E. Prezzetti, R. Marchelli, A. Dossena and A. Biancardi, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 303 (1992).
- 6 H. Watanabe and H. Tanaka, *Talanta*, **25**, 585 (1978).
- 7 M. Lindheimer, E. Keh, S. Zaini and S. Partyka, *J. Colloid Interface SCI.*, **138**, 83 (1990).
- 8 D. C. McDermott, J. R. Lu, E. M. Lee, R. K. Thomas and A. R. Rennie, *Langmuir*, **8**, 1204 (1992).
- 9 R. J. Porra, "Chlorophylls", ed by H. Scheer, CRC Press, Boca Raton, CA (1991), pp.31-53.
- 10 Y. Shioi, "Chlorophylls", ed by H. Scheer, CRC Press, Boca Raton, CA (1991), pp. 59-88.
- 11 K. Saitoh, I. Awaka and N. Suzuki, *J. Chromatogr.*, **653**, 247 (1993).
- 12 K. Saitoh, I. Awaka and N. Suzuki, *J. Chromatogr.A.*, **693**, 186 (1995).
- 13 S. W. Jeffrey and G. F. Humphrey, *BioChem. Physiol. Pflanzen*, **167**, 191 (1975).

Utility of surfactant micelles for preconcentration and chemical speciation of metal-involving microcomponents in salt solution

Koichi Saitoh, Norio Teramae, Satoshi Tsukahara, Kotaro Bessho and Hisashi Kato
Department of Chemistry, Faculty of Science, Tohoku University

Summary

The project was undertaken to develop new approach to selective collection of metal ions and high efficient separation of metal complexes using surfactant micelles as essential media for these analytical procedures. Two model systems were investigated: (1) selective concentration of zinc ion from the solution containing high concentration of sodium ion onto silica gel with nonionic surfactant, (2) high efficient separation of algal chlorophylls by micellar electrokinetic chromatography (MEKC), that is a kind of electrophoresis using anionic surfactant.

Zinc ion at 10^{-5} M level in aqueous solution was extracted as neutral complex with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol in the micelles of nonionic surfactant, Triton X-100, dispersed in the solution. When small amount of silica gel was added to the solution, the micelles were adsorbed on the silica gel, and then zinc was quantitatively concentrated in the molecule assembly of the surfactant on the surface of silica gel. The surfactant and zinc complex were filtered or centrifuged with the silica gel as carrier. The zinc complex could be completely eluted from the silica gel with small amount of methanol.

The separation procedure is expected to be applicable to selective preconcentration and separation of various trace metal ions as well as zinc ion in the sample solution containing high concentration of alkali metal ions.

Chlorophylls, such as chlorophyll-a, -b, -c₁ and -c₂ were so much hydrophobic that MEKC could not be applied with popular pH buffered micellar solution of anionic surfactant, such as sodium dodecyl sulfate (SDS). In this study, the effects of organic additive to the running solution on the migration behavior of the chlorophylls was investigated. It was found that those four species of chlorophylls could be completely resolved in about 15 min when using pyridine as the organic additive to SDS micellar solution at pH 11. The MEKC condition is promising for chlorophyll analysis of marine algae and related samples.