

## 技術報告

## 薄層クロマトグラフスキャナを用いる固体蛍光分析法による尿中ウランの定量

一瀬典夫<sup>®</sup>, 足立恭子<sup>\*</sup>, 山田雅仁, 菱田 明, 本田西男<sup>\*\*</sup>

(1991年5月29日受理)

従来のペレットを用いる固体蛍光光度法に代わるものとして著者らが既に確立した蛍光分析法を応用して、酢酸ウラニルとしてウラン(VI)を静脈注射投与することにより急性じん不全を発症させたウサギの尿ウランの定量法を開発した。ウサギの尿を湿式分解した後、酸化トリオクチルホスフィン-ベンゼン溶液を用いてウランを抽出し、その抽出液の一部を TLC 板上に滴下して、そのスポットをフライングスポットスキャナにより蛍光分析した。本法は、回収率 95.4%、標準偏差率 5.9% でウサギの尿中の微量のウランを定量することができる。又、従来の蛍光光度法と比較して分析操作が簡便なので単位時間当たりより多くの試料を分析することが可能である。

## 1 緒 言

現在、半導体材料及び製造メーカーで行われている<sup>1)</sup>ウランの高感度分析法の一つに固体蛍光光度法がある。この方法はウランを NaF 及び NaKCO<sub>3</sub> で溶融して得られたペレットに紫外線を照射して発生する緑黄色の蛍光を測定する方法であり、ppb レベル以下のウランの定量が可能である<sup>2)</sup>。しかし、この分析法はペレットの作製に複雑な操作と技術が必要であり、試料の均一性が分析精度に著しく影響を与える。

この固体蛍光光度法は、従来、無機試料中のウランが分析対象で尿などの生体試料中のウランに応用された例は見当たらない。そこで著者らは、この従来の固体蛍光光度法を改良して、ウランのスポットをシリカゲル TLC 板上に作製し、これをフライングスポットスキャナにより迅速かつ連続的に定量する新しいスポットスキャナによる蛍光分析法を確立した<sup>3)</sup>。

ウラン投与により急性じん不全が発症することはよく知られているが、その機構については明らかではない。その理由の一つはウランの尿中排せつを的確かつ迅速に測定する方法が見当たらないからである。

そこで、著者らは先に開発した分析法を応用してウランじん不全を発病させたウサギの尿を湿式分解した後、

弱酸性溶液 (pH 3.7~4.0) から酸化トリオクチルホスフィン (TOPO)-ベンゼン溶液を用いてウランを抽出し、その有機相の一部 (0.5~5 mm<sup>3</sup>) をシリカゲル TLC 板上にキャピラリーピペットを用いて滴下してスポットを作製し、フライングスポットスキャナにより蛍光分析する尿ウランの迅速分析法を検討した。この方法は、多数 (約 30) の有機検体中の尿ウランを迅速かつ連続的に定量することが可能であり、生体試料中のウランの新しい分析法として有用である。

## 2 実験方法

## 2.1 装 置

シリカゲル TLC 板上のウランスポットの蛍光測定はキセノンランプ付き島津二波長フライングスポットスキャナ CS-9000 を用いて行った。

2.2 標準ウラン溶液 (10 mg cm<sup>-3</sup>)

八酸化三ウラン (純度 99.9%) 11.804 g を王水 40 cm<sup>3</sup> に加熱溶解して蒸発乾固する。この残留物に濃塩酸を加えて溶解し蒸発乾固する操作を硝酸塩が存在しなくなるまで行った後、残留物を 6 mol dm<sup>-3</sup> の塩酸約 20 cm<sup>3</sup> に溶解し、更に同濃度の塩酸を用いて 1 dm<sup>3</sup> のメスフラスコに定容とする。

## 2.3 分析操作

(a) 試料の湿式分解: ウランじん不全を発病させたウ

\* 浜松医科大学医学部化学教室: 431-31 静岡県浜松市半田町 3600

\*\* 浜松医科大学医学部内科学第一講座: 同上

サギの尿 {U(VI)  $\geq 0.4 \mu\text{g}$ } を正確に  $50 \text{ cm}^3$  のビーカーに採取し、これに濃硝酸及び過塩素酸 (60%) 各  $1 \text{ cm}^3$  を加え、最初時計皿で覆いながら熱板上で加熱する。過塩素酸の白煙が生じなくなるまで加熱した後、放冷してから  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  の塩酸  $2\sim 3 \text{ ml}$  を加えて塩類を加温溶解する。

(b) TOPO-ベンゼン抽出: (a)で分解した試料溶液をあらかじめ  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  の水酸化アンモニウム又は塩酸を用いて pH 3.7~4.0 に調節した後、水ですすぎながら  $50 \text{ cm}^3$  の分液漏斗に移し、約  $10 \text{ cm}^3$  の水溶液とする。これに  $4 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  の TOPO-ベンゼン溶液及び  $2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  の安息香酸-ベンゼン溶液各  $1 \text{ cm}^3$  を加えて約 30 分間 (120 回/分) 激しく振り混ぜる。以下文献<sup>3)</sup>の抽出操作に準じて処理する。

(c) TLC 板上へのウランスポットの作製とその蛍光測定: 文献<sup>3)</sup>に準じて操作する。

### 3 実験結果及び考察

TLC 板上に生成した TOPO-ベンゼン抽出液のウランスポットの蛍光励起スペクトル及び蛍光発光スペクトルの極大波長は、それぞれ  $\lambda_{\text{ex}}$ : 245 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 498 nm であった<sup>3)</sup>。

Fig. 1 は、本法により作成したウラン (VI: 0~175 ng) の検量線の一例である。

Fig. 1 の検量線において、TLC 板上に  $5 \text{ mm}^3$  の抽出液を滴下したときのスポットの直径は約 3 mm であつ

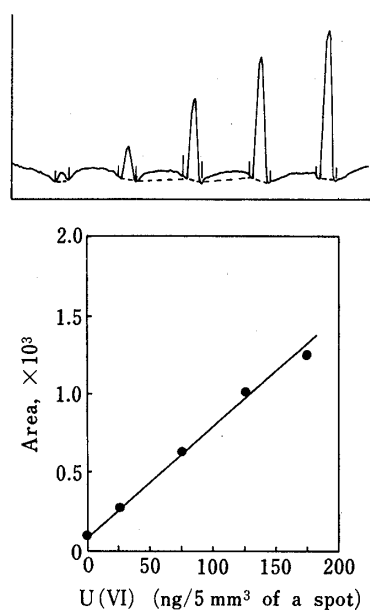


Fig. 1 Chromatograms and calibration curve

た。このスキヤナのスポット測定許容直径が  $\leq 16 \text{ mm}$  であることから、TLC 板上の同一位置に少なくとも  $5 \text{ mm}^3$  の抽出液を 3~5 回重ねて滴下することが可能であるが、この場合はやや定量性に欠ける傾向が認められた。

尿などの生体試料中には、タンパク質を構成するアミノ酸のトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンなどの天然蛍光団が含まれている<sup>5)~7)</sup>。従って、本法では生体試料中のこれら有機天然蛍光団をあらかじめ除去するため、尿試料を硝酸及び過塩素酸を用いて湿式分解することにした<sup>8)</sup>。正常のウサギの尿及び酢酸ウラニルとしてウラン(VI)を静脈注射投与することにより急性じん不全を発症させたウサギの尿試料の数種について酸分解処理した場合としない場合についてそれぞれ本法によりウランを分析した場合、酸処理しない試料は処理したものに比較していずれも高い蛍光強度を示した (Table 1)。この主要原因は、さきの有機天然蛍光団の妨害によるものと考えられる。この実験結果は、ウラン

Table 1 Effect of acid decomposition

Sample	Fluorescence intensity (a.u.)	
	Non-acid decomp.	Acid decomp.
Control	48.8	ND
A	102.7	24.0
B	69.5	25.4
C	67.7	10.0

Sample: rabbit urine

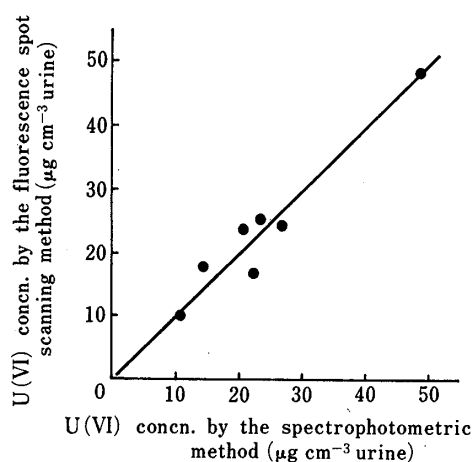


Fig. 2 Comparison of analytical values obtained by the proposed fluorescence spot scanning method and by the spectrophotometric method<sup>4)</sup> in the determination of urinary uranium of rabbit

量不明な試料を用いて酸処理法を検討したものであるが, 本法及び Arsenazo III 吸光光度法<sup>4)</sup>によるウサギの各種尿試料中のウランの分析値が比較的よい相関を示すことから (Fig. 2), 信頼し得るものであると考える。

Fig. 2 は, ウランじん不全を発症したウサギの尿の各種個体試料を用いて本法及び従来の Arsenazo III による吸光光度法<sup>4)</sup>によりそれぞれウランを分析し, 各試料ごとに分析値をプロットした曲線である。この曲線の傾きは約 1 であり, 相関係数  $r=0.962$  であった。従って, 本法の分析の正確度はかなり信頼できるものと考えられる。

ウランじん不全を発病したウサギの尿試料を用いるウランの添加実験による回収率及び同一試料の繰り返し実験 ( $n=4$ ) による標準偏差率は, それぞれ 95.4% 及び 5.9% であった。検出限界は一つのスポット当たりのウラン(VI) の絶対量として 30 ng である。

以上述べてきた分析法は従来の個体蛍光光度法<sup>2)</sup>及び Arsenazo III による吸光光度法<sup>4)</sup>と比較して分析操作が簡単で, 単位時間当たり多数のスポットが連続測定できるので, 尿などの有機試料ばかりでなく, 無機試料, 例えば, ウラン鉱石, 半導体材料中のナノグラムレベルの

微量のウランの定量に応用できる有用な方法である。

終りに, この実験を行うに当たり御指導を賜りました龍谷大学理工学部池田重良教授並びに島津製作所第二科学計測部副事業部長窪寺俊也氏に深謝致します。

(1989年10月, 第20回中部化学関係学協会支部連合秋季大会にて一部発表)

## 文 献

- 1) 平井昭司: 武蔵工業大学原子力研究所研究所報, 通巻 13 号, p. 71 (1987).
- 2) T. S. Dobrolyubskaya: *Zh. Anal. Khim.*, **26**, 926 (1971).
- 3) N. Ichinose, S. Ikeda, T. Kubodera, K. Adachi, M. Toyama: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **340**, 11 (1991).
- 4) N. Ichinose: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **255**, 109 (1971).
- 5) F. W. J. Teale, G. Weber: *Biochem. J.*, **65**, 476 (1957).
- 6) A. M. Krastulovic, A. M. Powell: *J. Chromatogr.*, **171**, 345 (1979).
- 7) A. L. Barnett, H. Veening: *Clin. Chem.*, **29**, 1436 (1983).
- 8) APHA AWWA WACF: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", p. 466 (1975).

## ☆

**Determination of urinary uranium by solid fluorometry using a flying spot scanner.** Norio ICHINOSE, Kyoko ADACHI\*, Masahito YAMADA, Akira HISHIDA and Nishio HONDA\*\* (\*Department of Chemistry and \*\*First Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-31)

Solid fluorometry using a flying spot scanner is applied to the determination of urinary uranium of a rabbit which developed acute renal failure following intravenous administration of uranium as uranyl acetate. After decomposing a rabbit urinary sample {U(VI) 0.4  $\mu\text{g}$ } using conc.HNO<sub>3</sub> and conc.HClO<sub>4</sub>, 10 ml of the solution containing uranium(VI) adjusted to pH 3.7~4.0 are shaken vigorously for about 30 min with 1 ml of 4 $\times$ 10<sup>-2</sup> mol/l trioctylphosphine oxide-benzene solution and 1 ml of 2 $\times$ 10<sup>-2</sup> mol/l benzoic acid-benzene solution in a 50 ml separatory funnel. A spot (0.5~5  $\mu\text{l}$ ) of the extract is dropped onto a TLC plate (10 $\times$ 10 cm) of Silica Gel-60 previously dried at 110 $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. After drying it at 150 $^{\circ}\text{C}$  for 1 h and cooling, the fluorescence intensity of the spot (6 mm dia) is then measured by a flying spot scanner equipped with a xenon lamp at fluorescence excitation of 245 nm and fluorescence emission of 498 nm (filter type). Using this method, trace amounts of uranium in rabbit urine samples could be determined, with a recovery rate of 95.4% and a standard deviation rate of 5.9%.

(Received May 29, 1991)

## Keyword phrases

fluorometric analysis of uranium; flying spot scanner; urinary uranium; trioctylphosphine oxide-benzene extraction.