

リン酸トリブチル抽出濃縮を利用した $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-カルボキシフェニル)ポルフィリン-金属錯体の高速液体クロマトグラフィー

奥谷忠雄*, 笹倉巳鶴**, 櫻川昭雄®, 高井信治***

(1994年3月18日受理)

高感度発色試薬の一つである $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-カルボキシフェニル)ポルフィン(TCPP)の金属錯体の抽出濃縮法を見だし、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用した水試料中の微量マンガン、コバルト、銅及び亜鉛の分離分析について検討した。金属-TCPP錯体の吸収極大波長は、金属により異なるので、検出部にホトダイオードアレイ検出器を用いて、より確実な同定操作を行った。金属-TCPP錯体は抽出溶媒に極性溶媒であるリン酸トリブチル(TBP)を用いれば、試料溶液のpH調整のみで抽出濃縮が可能であった。移動相として乳酸-アセトニトリル-TBPの混合溶液を用いると12分以内で測定が完了する。銅(II)として14.4 ppb、亜鉛(II)として8.8 ppbを含む水道水を用いて添加回収実験を行ったところ、それぞれのイオンに対する回収率は96~110%であり、又、相対標準偏差は4~7.5% ($n=6$)であった。本法で水試料中に存在するppbレベルの金属イオンが定量できる。

1 緒言

ポルフィリン化合物は、モル吸光係数の大きい金属錯体を生成することから高感度な発色試薬として、これを用いた微量金属イオンの定量法が数多く提案されている^{1)~12)}。又、ポルフィリン化合物の中で特に $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-カルボキシフェニル)ポルフィン(TCPF)は水溶性で取り扱いが容易であることから、これを用いた微量金属イオンの吸光光度法が幾つか報告されている^{13)~17)}。一方、金属-TCPF錯体を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離定量できれば、同時に複数の金属イオンが感度よく分析できる利点があり、既に五十嵐らは良好な分離システムを確立し報告している¹³⁾。一般にHPLCでの同定法は保持時間により推定されているが、反応する金属イオンにより吸収極大波長が異なるような発色試薬を利用する場合、測定時に吸収スペクトルの情報が同時に得られればより確実な同定が

行え、更にそれぞれの吸収極大波長での検量線が求められるので、本研究ではホトダイオードアレイ検出器を用いて三次元クロマトグラムによりデータ解析することを試みた。

TCPFと金属イオンとの錯形成反応は長時間を要するので、反応促進剤¹⁸⁾¹⁹⁾として水銀及びピリジンが用いられているが、著者らは反応中間体を形成し、マンガン、コバルト、亜鉛及び銅との置換反応が水銀-TCPFと同様に速やかに進行するカドミウムをあらかじめTCPFと反応させておいた、カドミウム-TCPF¹⁶⁾を発色試薬として用い、定量操作の簡易化を図った。更に微量の金属イオンの定量を可能にするため、生成した金属錯体の溶媒抽出について検討した結果、リン酸トリブチル(TBP)へ容易に抽出濃縮できることを見いだした。本法により水試料中のppbレベルのマンガン、コバルト、亜鉛及び銅を同時に定量できたので報告する。

2 実験

2.1 試薬及び装置

2.1.1 試薬 TCPF(同仁化学研究所製)は $4 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ になるように $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ の水酸化ナトリウム溶液に溶解し、遮光して保存した。

* 日本大学理工学部工業化学科: 101 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14

** 東亜電波工業(株): 350-13 埼玉県狭山市北入曽 813

*** 東京大学生産技術研究所: 106 東京都港区六本木 7-22-1

又、発色試薬として用いた $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の Cd-TCPP 溶液は、カドミウム(II)と TCPP が 1:1 のモル比になるように混合し、水酸化ナトリウム溶液で pH 9~10 に調整した。この試薬溶液は、アルミニウムはくで被覆した容器に入れて冷暗所に保存すれば、約 1 か月間使用できる。その他の試薬は、すべて市販の特級品をそのまま使用した。水は Milli-QSP Reagent Water System (Millipore 製) により得られた精製水を用いた。

2・1・2 装置 使用した HPLC システムは、ポンプ: 日本精密科学製 LC-1000F, 検出器: 日立製作所製 L-3000 マルチ測光検出器, 分離カラム: Waters 製 μ -Bondapak C₁₈ (3.9 ϕ ×300 mm) を使用した。検出器は RS232C インターフェースを介してマイクロコンピュータ (日本電気製 NEC PC-9801UV) により制御し、データの解析及びフロッピーディスクへの保存を行った。又、pH の測定には東亜電波工業製 HM-30S を、吸収スペクトルの測定には日本分光製 UVIDEC-660 型を使用した。

2・2 定量操作

1 μg 以下のマンガン(II), コバルト(II), 銅(II) 及び亜鉛(II) を含む試料溶液 5~25 ml を遠心分離用沈殿管に採り、アンモニウム塩緩衝溶液 (pH 9.0) 1 ml と Cd-TCPP 溶液 0.3 ml を加え約 15 分間放置し錯形成させる。次に希塩酸で pH を約 3.5 とした後、塩酸-塩化カリウム緩衝溶液 (pH 3.5) 1 ml, TBP 0.5 ml を加え 5 分間振り混ぜた後、5 分間遠心分離する。分離した TBP 相にアセトニトリルを混合比が 1:1 になるように加え、その 20 μl を HPLC に注入する。移動相には 0.1 mol dm^{-3} 乳酸水溶液を水酸化ナトリウムで pH を 4.15 に調整した溶液とアセトニトリル及び TBP を 70:30:1 に混合したものをを用いた。又、移動相の流量は 1.0 ml/min, 測定波長範囲は 400~480 nm (2.5 nm 間隔) の可視領域であり、カラムは室温で使用した。

3 結果及び考察

3・1 金属-TCPP 錯体の錯形成条件

本法により TCPP と多数の金属イオンとの錯形成反応を試みたが、HPLC に利用できる十分な錯体形成は、五十嵐ら¹³⁾の結果と同様にマンガン, コバルト, 銅及び亜鉛以外には認められなかった。これらの金属イオンは pH 9~10 付近で同時にかつ定量的に錯体を形成させることができるが、この反応には長時間を要する。反応試薬として Cd-TCPP 溶液を用いる方法では室温

で 10 分以内で反応が平衡に達し、水銀及びピリジンを添加する方法¹³⁾と同じように反応時間を短縮できた。水溶液中におけるそれぞれの錯体のモル吸光係数は 10^5 オーダーを示し、吸収極大波長は、マンガン錯体が 469.0, コバルト錯体が 429.0, 銅錯体が 411.7 及び亜鉛錯体が 422.5 nm であったが、HPLC での測定時にはそれぞれ 460, 425, 407.5 及び 420 nm と短波長側にシフトした。これは前者がアンモニウム塩緩衝溶液中での測定であるのに対し、後者は酸性の移動相、すなわち水-アセトニトリル-TBP 系の混合溶媒中での測定であるためと考えられる。従って、クロマトグラムの解析にはこの HPLC での吸収極大波長を利用した。

3・2 溶媒抽出

金属-TCPP 錯体を有機相に抽出濃縮できれば、更に微量の金属イオンの定量が可能になる。しかし、金属-TCPP 錯体は負電荷を持ち、そのままでは有機相に抽出されない。そこでゼフィラミンとイオン対を形成させ、クロロホルム, MIBK 及び TBP などの溶媒への抽出濃縮を試みたところ、TBP への抽出が最も有効であった。しかし、この抽出錯体を HPLC に導入しクロマトグラムの測定しても良好なピークが得られなかった。そこでゼフィラミンを用いずに、すなわちイオン対の形成を利用しない抽出法について検討した結果、金属-TCPP 錯体を生成させた後、水相を酸性にすれば錯体はそのまま TBP に抽出されることが分かった。そのときの pH の影響を Fig. 1 に示した。pH が 7 以下になると急速に抽出率が上昇し、pH 5 以下ではそれぞれの金属イオンに対してほぼ一定の抽出率を示したので、抽出時には塩酸及び塩酸-塩化カリウム緩衝液を用いて pH を 3.5 に調整することにした。TCPP の酸解離定数は $\text{p}K_{\text{a}_{3-6}} = 6.7^{15)}$ であることが報告されており、酸性領域では TCPP 及び金属-TCPP 錯体のカルボキシル基に水素イオンが付加し、TBP に抽出されるものと考えられる。又、金属錯体を酸性溶液中に長時間放置すると錯体の解離によるピークの減少がみられたが、pH を調整してから 30 分以内であればその影響はなく、本法で金属イオンを定量するための操作時間内では、その損失は認められなかった。更に抽出時の濃縮倍率が 80 倍以下であれば、金属イオンの定量に影響しないが、TBP の比重 ($d_4^{25} = 0.9766$) は水のそれに近く、振り混ぜた後の二相への分離に長時間を要するので、遠心分離する必要がある。本操作では試料溶液 25 ml に対して TBP を 0.5 ml 用いて抽出したので、濃縮倍率は 50 倍になる。

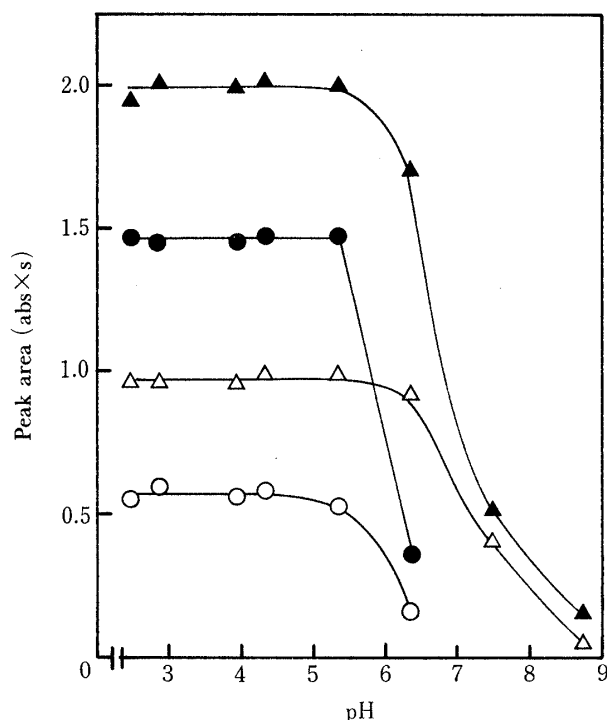


Fig. 1 Effect of pH on the solvent extraction

○: Mn 0.5 μ g; △: Zn 0.2 μ g; ●: Co 0.5 μ g; ▲: Cu 0.5 μ g; Sample volume: 10 ml; Extraction: TBP 0.5 ml

3.3 HPLC の溶離条件

移動相にはアセトニトリル-水系が有効であることが分かったので, その pH を調整する酸として最も適している酸を選択するために酢酸, 乳酸, シュウ酸, クエン酸及び酒石酸の 5 種類のカルボン酸について検討した。しかし, これらの酸で pH を調整し水相中の金属錯体を HPLC に注入した場合, マンガン錯体とコバルト錯体の分離が困難であった。又, 0.1 mol dm⁻³ 乳酸水溶液を水酸化ナトリウムで pH を 4.15 に調整したものとアセトニトリルを 45:55 の割合で混合した移動相では全金属錯体の分離定量が可能であったが, 溶出するのに 30 分を要した。

移動相の乳酸水溶液とアセトニトリルの比率を変えて, 水相系及び抽出系での各金属錯体の保持容量(k')を測定した結果を Fig. 2 に示した。マンガン及び亜鉛錯体は他の金属錯体と異なり TBP に抽出することで k' が大きくなることから, 抽出を行い更に移動相中のアセトニトリルの比率を高くすればマンガン錯体とコバルト錯体との間に大きな分離度を得られ, 溶出時間の短縮が可能となる。一方, マンガン錯体とコバルト錯体には移

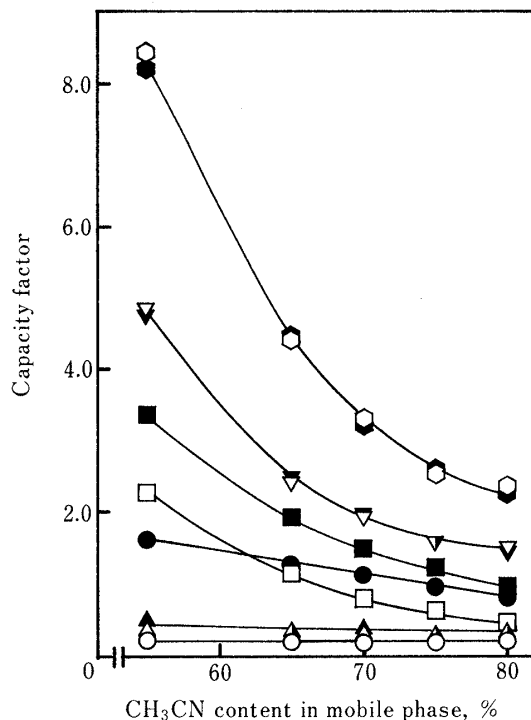


Fig. 2 Effect of acetonitrile content in the mobile phase

○: without extraction, ●: with extraction; ○: Mn; △: Co; □: Zn; ▽: TCPP; ◇: Cu. Metal ion content: without extraction, 1.0 μ g each; with extraction, 0.2 μ g each; Extraction: TBP 1 ml; Mobile phase: pH 4.15 lactic acid-NaOH/CH₃CN

動相への分散性が悪いことなどに起因すると思われるピーク割れが確認されたが, 2.2 に記述したように少量の TBP を移動相に添加し, 更に抽出後の TBP 相をアセトニトリルと混合してから HPLC に注入することで改善された。

水相での金属錯体と TBP 相のそれとでは溶出挙動が変化するので, その原因を明らかにするため両相における金属錯体の吸収スペクトルを測定した。両相間においてそれぞれの金属錯体の吸収スペクトルは一致せず, TBP 相にアセトニトリルを混合比 1:1 で加えたときのマンガン及び亜鉛錯体は TBP 相中の錯体に, 又, そのときのコバルト及び銅錯体は水相中の錯体に類似した吸収極大波長並びに吸収スペクトルを示した。これは TBP に抽出されたそれぞれの錯体のうち, 溶出時間が遅くなったマンガン及び亜鉛錯体は TBP が配位した混合配位子錯体で, 又コバルト及び銅錯体は TBP が配位しない状態で移動相中に存在していると推察される。

一方, 発色試薬として用いたカドミウム-TCPP は移

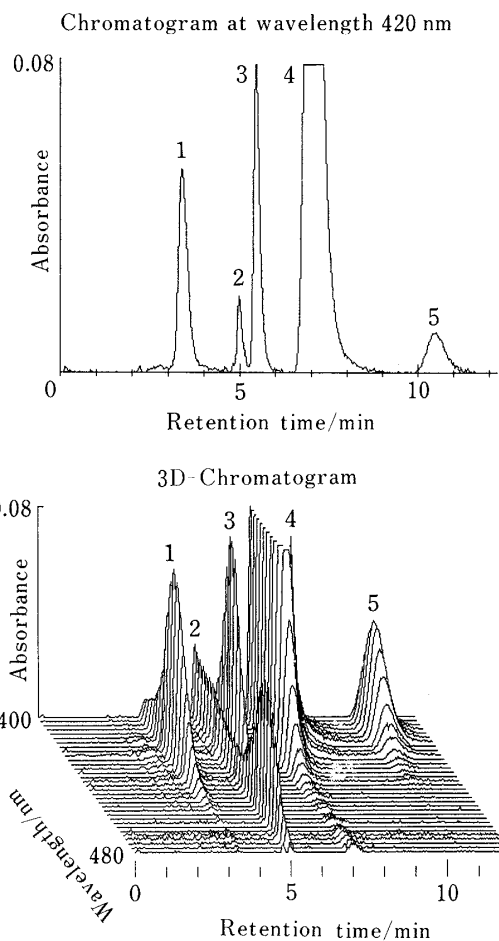


Fig. 3 Typical chromatogram of metal-TCPP complexes

1: Co 0.5 μg ; 2: Mn 0.5 μg ; 3: Zn 0.2 μg ; 4: TCCP; 5: Cu 0.5 μg

動相が酸性であるため、移動中でカドミウムと TCPP に解離しクロマトグラム上に現れないものと考えられる。

定量操作に従って得られた標準クロマトグラムを Fig. 3 に示した。アセトニトリルを 70% 含む移動相により良好な分離度で 12 分以内に全成分を溶出させることができた。本法で用いた HPLC システムは、Fig. 3 に示したような保持時間、吸光度及び波長の三次元的なクロマトグラムを表示するので、溶出される成分の概要を把握することができ、分析法の開発を目的とする場合には非常に有用である。

3・4 検量線

各金属錯体の吸光度を吸収極大波長で測定して得られた検量線は、マンガン、コバルト及び銅は 50 ng/25 ml

Table 1 Analysis of tap water

	Added/ μg	Found/ μg	Contents, ppb	Recovery, %	RSD, %
Mn	0.25	N.D.	10.4	104	7.5
Co	0.25	N.D.	9.6	96	7.1
Cu	0.25	0.36	14.4	104	4.1
Zn	0.10	0.22	8.8	110	6.2

Sample: Shibuya, Tokyo, sampled in February 1993; Sample volume: 25 ml; N.D.: not detected

以上で、亜鉛は 20 ng/25 ml 以上で直線性を示した。検出限界 ($S/N=3$) はマンガン及び銅は 0.6 ppb, コバルトは 0.4 ppb, 亜鉛は 0.16 ppb であった。亜鉛は他の金属イオンに比べて感度が良いが、アンモニウム塩緩衝溶液からの空試験が確認されたので、その検量線は対空試験値とした。

3・5 実試料への適用

TCPP と金属イオンの錯形成反応は選択性が高いため、河川水や湖沼水など一般の水試料中に含まれる濃度範囲内の無機イオンは影響しない。しかし、有機酸イオンなどについては抽出時にともに濃縮されるため、これらが多量に存在する試料には適用が困難である。本法で水道水中の金属イオンを定量した結果を Table 1 に示した。マンガンとコバルトイオンについては検出されなかったが、銅と亜鉛イオンは ppb レベルで存在することが確認できた。又、銅(II)として 14.4 ppb, 亜鉛(II)として 8.8 ppb を含む水道水を用いて行った添加回収実験の精度は相対標準偏差で 4~7.5% ($n=6$) であり、実試料に適用可能な範囲であった。

(1992 年 9 月, 日本分析化学会)
(第 41 年会において一部発表)

文 献

- 1) 四ツ柳隆夫: 化学, **35**, 233 (1980).
- 2) 四ツ柳隆夫, 星野 仁, 五十嵐淑郎: ぶんせき, **1985**, 496.
- 3) 斎藤絃一: 分析化学, **35**, 895 (1986).
- 4) 和田弘子: ぶんせき, **1987**, 686.
- 5) 五十嵐淑郎: ぶんせき, **1989**, 190.
- 6) M. Tabata, K. Oshita, M. Tanaka: *Mikrochim. Acta*, **1985**, 397.
- 7) 伊藤純一, 小俣雅嗣, 岡 宏: 分析化学, **37**, T1 (1988).

- 8) 石井 一, 佐藤勝彦, 高 英昌: 分析化学, **29**, 276 (1980).
- 9) 五十嵐淑郎, 佐伯知司, 四ツ柳隆夫: 分析化学, **32**, 39 (1983).
- 10) 五十嵐淑郎, 中野 充, 四ツ柳隆夫: 分析化学, **32**, 67 (1983).
- 11) 五十嵐淑郎, 橋本孝司, 松本好広, 四ツ柳隆夫: 分析化学, **32**, 591 (1983).
- 12) X.-J. Xu, H.-S. Zhang, C.-Y. Zhang, J.-K. Cheng: *Anal. Chem.*, **63**, 2529 (1991).
- 13) 五十嵐淑郎, 小原 昭, 足立弘明, 四ツ柳隆夫: 分析化学, **35**, 829 (1986).
- 14) 石井 一, 高 英昌, 奥田善昭: 日化, **1978**, 686.
- 15) 高 英昌, 川村和史, 石井 一: 日化, **1979**, 591.
- 16) H. Ishii, H. Koh, K. Satoh: *Anal. Chim. Acta*, **136**, 347 (1982).
- 17) T. Saito, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Anal. Sci.*, **7**, 495 (1991).
- 18) 石井 一, 高 英昌, 佐藤勝彦: 日化, **1980**, 1919.
- 19) 田端正明: *Dojin News*, No. 45 (1988).



High-performance liquid chromatography of metal $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-carboxyphenyl)porphine complexes following preconcentration by solvent extraction with tributyl phosphate. Tadao OKUTANI*, Mitsuru SASAKURA**, Akio SAKURAGAWA*, and Nobuharu TAKAI*** (*Industrial Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, 1-8-14, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101; **Toa Electronics Ltd., 813, Kita-Iriso, Sayama-shi, Saitama 350-13; ***Institute of Industrial Science, University of Tokyo, 7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo 106)

High-performance liquid chromatography for trace amounts of manganese(II), cobalt(II), copper(II) and zinc(II) in water samples utilizing organic solvent extraction of metal- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-carboxyphenyl)porphine(TCPP) complexes was studied. The metal-TCPP complexes were resolved and detected by reverse phase HPLC with a photometric detector. The absorption spectra of these complexes differed with the kind of metal ion combined with TCPP. A photo-diode array detector was therefore useful for accurate spectroscopic identification of the complexes. One milliliter of a buffer solution(ammonium-ammonium chloride, pH: 9.0) and 0.3 ml of a Cd-TCPP solution were added to 5~25 ml of a sample solution containing less than 1 μg of manganese(II), cobalt(II), copper(II) and zinc(II), respectively, to form the metal-TCPP complexes. The pH of the solution was adjusted to 3.5 with dilute hydrochloric acid and a buffer solution(hydrochloric acid-potassium chloride, pH: 3.5), and then 0.5 ml of tributyl phosphate (TBP) was added to the solution. The metal-TCPP complexes were extracted into the TBP phase. After 5 min centrifugation the TBP phase was mixed with acetonitrile in the ratio of 1 : 1, and a 20 μl portion of the solution was injected into the reverse phase HPLC system. The composition of the mobile phase was as follows: 70 (0.1 mol dm^{-3} lactic acid): 30(acetonitrile): 1(TBP). The absorbances were measured over the range of 400 to 480 nm. The flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min. All components (TCPP and metal-TCPP complexes) injected were eluted within 12 min. Organic solvent extraction into TBP was given a high concentration factor (50 times). The detection limits ($S/N=3$) of manganese(II), cobalt(II), copper(II) and zinc(II) were 0.6, 0.4, 0.6 and 0.16 ppb, respectively. The relative standard deviation of six measurements for the determination of those metal ions in tap water containing 14.4 ppb copper(II) and 8.8 ppb zinc(II) was 4~7.5%.

(Received March 18, 1994)

Keyword phrases

manganese, cobalt; copper; zinc; $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis(4-carboxyphenyl)porphine; reverse phase HPLC; solvent extraction; tributyl phosphate.