

報 文

過剰試薬の除去/蛍光分析による 2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン
を用いるアルミニウムの定量渡辺 邦洋^{®*}, 飯束 友恵*, 板垣 昌幸*Fluorometric determination of aluminum using 2,2'-dihydroxyazobenzene
after removal of an excess reagent

Kunihiro WATANABE, Tomoe IIZUKA and Masayuki ITAGAKI*

*Department of pure and applied chemistry, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science,
2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510

(Received 20 March 2002, Accepted 8 May 2002)

The removal method of an excess reagent was applied to the fluorometric determination of aluminum using 2,2'-dihydroxyazobenzene (DHAB). The detection limit of the analyte was affected by the fluorescence intensity of an excess reagent, that is, reagent blank. Therefore, the decrease in the fluorescence intensity of an excess reagent has been required for the development of highly sensitive fluorometry. At first in this study, the removal of DHAB was examined using solvent extraction with a small amount of chloroform. Aluminum reacted with DHAB at pH 8 to form an Al-DHAB complex (ratio of composition, Al to DHAB, 1 : 2). Excess DHAB was removed from the aqueous phase by chloroform-extraction at pH 3 before measuring of the fluorescence on the Al-DHAB complex in the aqueous phase. The ratio of the composition of the Al-DHAB complex varied from 1 : 2 to 1 : 1 by changing the pH in aqueous solution. The fluorescence from the Al-DHAB complex was measured by a flow method at an excitation wavelength of 477 nm, and at an emission wavelength of 603 nm. As a result, aluminum was determined by measuring a 1 : 1 complex of Al-DHAB over a concentration range of from 0.12 to 8 ppb. Moreover, a removal method without extraction solvent was examined by the filtering aqueous phase using a filter phase separator. The DHAB was deposited in the aqueous solution at pH 3 because of the insolubility of the free DHAB. On the other hand, the Al-DHAB complex was stable in the aqueous phase, that is, the filtrate after filtration by the filter phase separator. Excess DHAB was removed at 74% from the aqueous phase. Therefore, the fluorometric intensity of the reagent blank decreased to 1/4. As a result, aluminum was determined over the range from 0.12 to 300 ppb. The present method was applied to the determination of aluminum in a tap-water sample.

Keywords : removal of excess reagent; dihydroxyazobenzene; fluorometry; aluminum, filter phase separator.

1 緒 言

蛍光定量法においてその検出限界に大きな影響を与える因子の一つに、蛍光の空試験値の大きさが挙げられる。そしてその空試験蛍光は、使用された検出試薬の未反応成

分、すなわち過剰試薬によってもたらされることが多い。蛍光法では励起光の強度を大きくすること、又は光電子増倍管の電圧増加でその感度を増幅することが可能となるが、これらの方法は同時に空試験の蛍光も増幅する。したがって空試験値の減少法として試薬と錯体の分離が試みられ、その手段として溶媒抽出法がはん用されてきた。過剰の試薬と生成した錯体を分離する方法としては、溶媒抽出

* 東京理科大学理工学部工業化学科: 278-8510 千葉県野田市山崎 2641

法を用いることが多いが、生成錯体を定量的に有機溶媒中へ抽出するには多くの溶媒が必要になる。例えば 2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン (DHAB) は、 Al^{III} と pH 6.2～6.4 の範囲で 1:1 の錯体を生成し、リン酸トリブチルに抽出されて強い蛍光を発する¹⁾。これは生成した錯体を有機溶媒中に定量的に抽出するのに、試料溶液 50 ml に対し有機溶媒を 10 ml 以上使用する。現在では環境汚染の問題から、有機溶媒の使用をできるだけ避ける方向にある。そこで本研究では、定量的な抽出を行うために大量の抽出溶媒を必要とする錯体抽出法に対し、過剰の試薬を少量の有機溶媒に抽出除去する方法を試みた。更に過剰試薬の分離という観点から、難水溶性試薬の性質と汙紙相分離器を利用した有機溶媒によらない過剰試薬除去法を検討し、DHAB を利用するアルミニウムの定量に適用した。

汙紙相分離器は、有機相と水相の混合物から水相のみを選択的に分離するもので²⁾、擬三相平衡分離法において利用されてきた。これは固液分離においても同様に利用できるものと期待される。そこで検出限界の改善のための有効性について検討し、新規分析法としての条件を明らかにした。

2 実験

2.1 試薬

Al^{III} 標準溶液：和光純薬製の原子吸光分析用アルミニウム標準溶液 (1000 ppm) を 0.1 M HNO_3 溶液で適宜希釈して使用した。

DHAB 溶液 (9.6×10^{-4} M)：同仁化学製を特級ジオキサンに溶解して使用した。

四ホウ酸ナトリウム (0.025 M)：和光純薬製 (特級) の四ホウ酸ナトリウム十水和物を再蒸留水で溶解して使用した。

その他の試薬についてはすべて市販の特級試薬、又はそれに準ずるものを使用した。各試薬は必要に応じて再蒸留水で希釈して使用した。

2.2 装置

蛍光強度の測定には、島津製分光蛍光光度計 RF-540 及び同社製高速液体クロマトグラフィー用分光蛍光検出器 RF-10AXL を使用した。RF-10AXL での測定では日本精密科学製ミニケミカルポンプ (SP-D-3202U) を使用し、pH の測定には東亜電波製 HM-20E 型 pH メーターを使用した。汙紙相分離器は既報²⁾で述べたものを使用した。

2.3 基本操作

Al^{III} 試料溶液 40 ml, DHAB (9.6×10^{-4} M ジオキサン溶液) 1 ml, 緩衝溶液 (2.5×10^{-2} M 四ホウ酸ナトリウム) 5 ml を含む溶液を希塩酸で pH 8 に調整し、50 ml 定容と

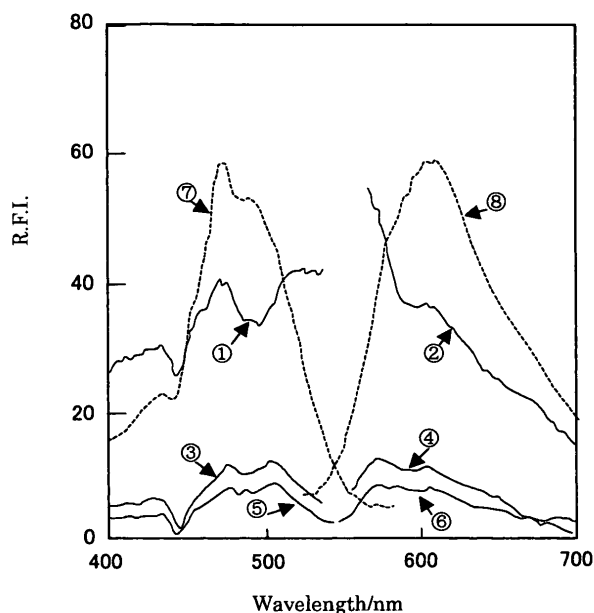


Fig. 1 Fluorescence spectra of Al-DHAB complex and reagent blank

DHAB: 1.9×10^{-5} M; Al: 10 ppb; Reaction pH: 8; Measurement pH: 3; Reaction temperature: 30°C; Reaction time: 10 min; Ex: 477 nm; Em: 603 nm; ①, blank (without removal of reagent, Ex); ②, blank (without removal of reagent, Em); ③, filtrated blank (Ex); ④, filtrated blank (Em); ⑤, extracted blank (Ex); ⑥, extracted blank (Em); ⑦, filtrated complex (Ex); ⑧, filtrated complex (Em)

した後、30°C で 10 分間かくはんする。その後、pH を塩酸で 3 に調整した。

2.3.1 過剰試薬抽出法 上に述べた操作の終了後、試料溶液にクロロホルムを 3 ml 加え、モルテンフラスコ中において回転数 2000 rpm で 1 分間かくはんし、汙紙相分離器を用いて水相のみを分離しながら流量 0.5 ml/min で送液し、励起波長 (Ex) 477 nm, 蛍光波長 (Em) 603 nm で測定した。

2.3.2 過剰試薬汙過除去法 pH を 3 に調整して得られた試料溶液から、汙紙相分離器を使用して流量 0.5 ml/min で送液し、遊離の DHAB を汙過除去しながら汙液の蛍光強度を測定した。

3 結果及び考察

3.1 Al-DHAB 錯体の蛍光スペクトル

Fig. 1 に水相中における Al-DHAB の励起蛍光スペクトルを示す。水相中での Al-DHAB 錯体の最大励起及び蛍光波長は、それぞれ 477, 603 nm となった。以後の実験では 477 nm で励起し、603 nm の蛍光を測定することにした。なお、ここに示したスペクトルは過剰試薬汙過除去法の適用後のものである。更に、抽出法、汙過法を適用した

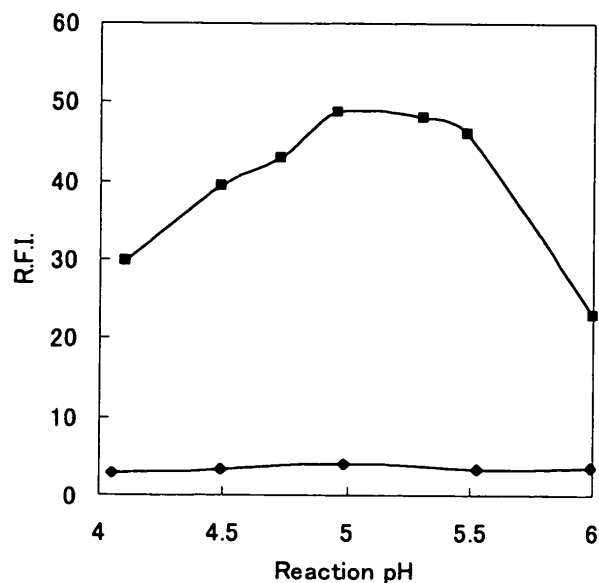


Fig. 2 Effect of reaction pH on R.F.I. (relative fluorescence intensity)

DHAB: 1.9×10^{-5} M; Al: 100 ppb; Reaction: 30°C 10 min; Ex: 477 nm; Em: 603 nm; ■: complex; ◆: blank

空試験スペクトルを示す。これらについては後述する。ところで同じ Al-DHAB 系において、リン酸トリブチルに錯体を抽出したものの励起、蛍光波長は、それぞれ 485, 560 nm であり、リン酸トリブチルで配位水が置換、抽出されることでシフトしたものと考えられる。

3.2 過剰試薬抽出法

3.2.1 反応 pH 錯体生成反応 pH と測定 pH が同じ場合、Al と DHAB の水溶液中の最適反応 pH は 5.0~5.5 である (Fig. 2)。しかし、測定時に pH を低下させる場合、その最適反応 pH 範囲は変化する。Fig. 2 に示すように、反応 pH と測定 pH を同一とした場合、高い pH 領域では蛍光強度は著しく低いものとなっているが、測定時に pH を 3 に変化させることで約 pH 8 でほぼ最大の蛍光強度を示すようになる (Fig. 3)。これは、高 pH 領域では反応時に主として非蛍光性錯体である 1:2 錯体が生成し、その吸収が 1:1 錯体の蛍光と重なることから再吸収が起こり、著しく蛍光強度が減少する。一方、測定 pH を変化させると 1:2 錯体が解離し、1:1 錯体への移行が起こることにより、蛍光強度が増加したと考えられる。Fig. 4 にダイオードアレイを用いた波長、時間、吸光度の三次元スペクトルを示す。金属量を試薬量より多くし、余剰の試薬が出ないようにして測定した。手前の面は 1:2 錯体のピーク波長で切っており、1.8 分で希塩酸を添加し、pH を低下させている。はじめは 1:2 錯体のピークが 498 nm に現れているが、希塩酸を添加することでスペクトル

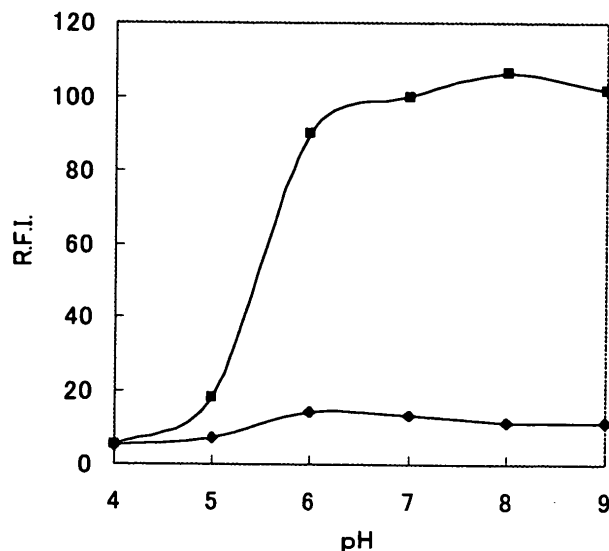


Fig. 3 Effect of reaction pH on R.F.I. measured at pH 3

DHAB: 1.9×10^{-5} M; Al: 10 ppb; Reaction: 30°C 10 min; Measurement pH: 3; Ex: 477 nm; Em: 603 nm; ■: complex; ◆: blank

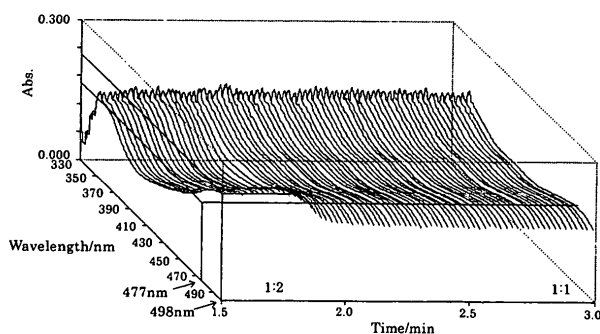


Fig. 4 Effect of pH on three-dimensional spectra of Al-DHAB complex

Al: 800 ppb; DHAB: 1.9×10^{-5} M; Reaction temperature: 30°C; Reaction time: 10 min; Reaction pH: 9 (before addition of diluted HCl); Diluted HCl was added after 1.8 min from start of measurement (pH: 3 as a result)

のピークが 477 nm 付近に移動していることが分かる。Fig. 5 に錯体の紫外可視 (UV-VIS) スペクトルを示したが、その 1:2 及び 1:1 錯体のピーク波長と Fig. 4 の結果は一致している。参考までに Fig. 5 に試薬の吸収スペクトルも同時に示す。試薬の吸収極大波長は pH 3 において 390 nm, pH 8 において 480 nm である。

3.2.2 測定 pH pH 8 で錯体を生成させ、その後 pH を低下させて測定をする場合の測定 pH と蛍光強度の関係を調べた。結果は Fig. 6 のようになった。蛍光強度については pH 3~4 でほぼ最大となったが、pH の調整のしやすさ、そして後述の汜過除去法に適用するにあた

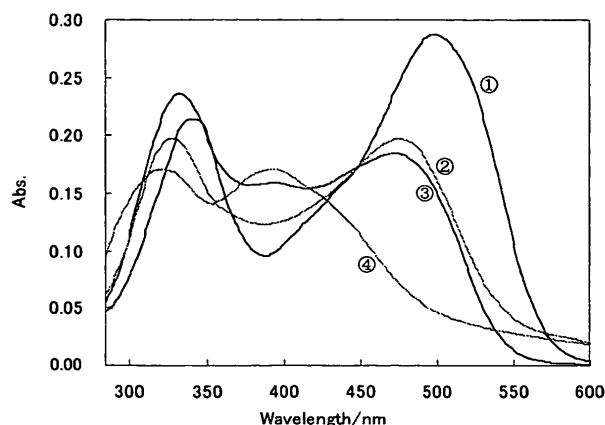


Fig. 5 Absorption spectra of Al-DHAB complexes
DHAB: 1.9×10^{-5} M; Al: 1 ppm; ①, 1 : 2 complex (pH 8); ②, DHAB (pH 8); ③, 1 : 1 complex (pH 3); ④, DHAB (pH 3)

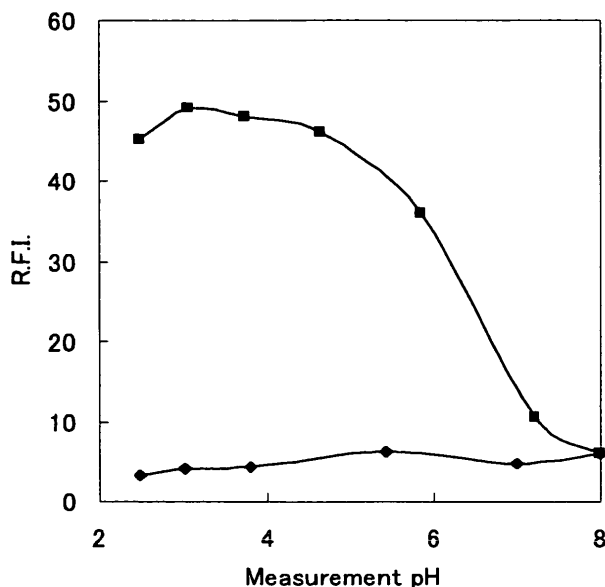


Fig. 6 Effect of measurement pH on fluorescence intensity

Al: 10 ppb; DHAB: 1.9×10^{-5} M; Reaction: 30°C, 10 min, pH 8; Ex: 477 nm; Em: 603 nm; ■: complex; ◆: blank

り、より多くの試薬析出を促すため測定 pH は 3 と設定した。なお、測定 pH を検討する際に試薬除去を行っているため、測定 pH はそのまま試薬除去 pH である。

3・2・3 低 pH における Al^{III} -DHAB 錯体の安定性 測定 pH の減少を前提として最適反応 pH を設定し、低 pH で蛍光測定する本法では、後述の汙過除去法にとっても低 pH 溶液中での錯体の安定性は重要な問題である。そこで pH の低下による錯体の安定性について検討した。Fig. 7 に示すように、pH の低下が生成した Al^{III} -DHAB 錯体に及ぼす影響はほとんど見られず、少なくとも 60 分間はほ

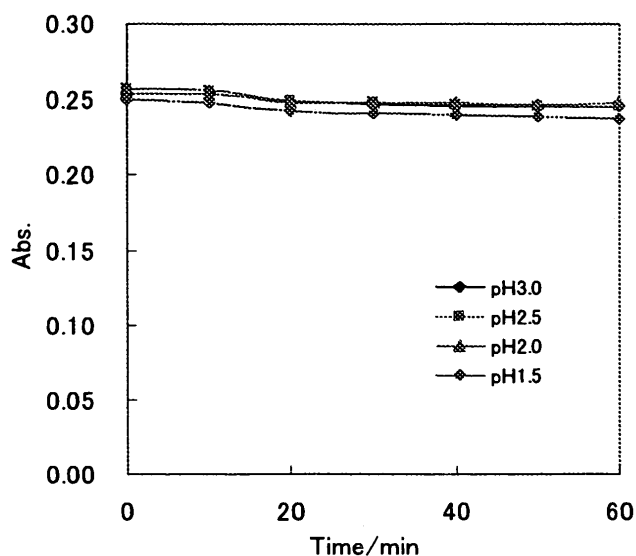


Fig. 7 Stability of Al-DHAB complex at various pH's
Al: 1 ppm; DHAB: 1.9×10^{-5} M; Reaction: 30°C, 20 min, pH 8; Wavelength: 477 nm

ぼ安定であることが分かった。これは測定に利用する Al 錯体 (1 : 1 型錯体) の解離反応の速度が遅く、pH 変化による影響がすぐには現れないことを示している。

3・2・4 pH と反応速度 3・2・1 において pH 8 で最大の蛍光強度が得られることが分かった。ここで幾つかの反応 pH において 30°C で反応させたとき、最大の蛍光強度に達するまでの時間を検討したところ、pH 5 で 300 分以上、pH 6 では 25 分、pH 8 では 10 分となった。反応 pH を高くするに従ってその反応速度が大きくなっていることが分かる。pH 5 で反応を行った場合、最大かつ一定の蛍光強度を得るには 300 分間以上もの反応時間を要し、短時間で最大の強度を得るためには約 50°C もの加熱が必要となる。蛍光強度は温度の影響を受け、高温では著しくその強度が減少するため、測定には冷却操作が必要となる。一方、pH を高く設定して反応を行えば常温でも速やかに反応は進行し、pH を低下させることで高い蛍光強度が得られる。そのため、これ以降の実験では反応 pH は 8、反応温度は 30°C、反応時間は 10 分間とした。

3・2・5 試薬濃度の影響 試薬濃度を検討した結果を Fig. 8 に示す。図より 1.9×10^{-5} M 以上で錯体の蛍光強度は最大かつ一定となった。過剰の試薬は除去法を適用したため、空試験の蛍光強度はほとんど変化せず一定となった。 1.9×10^{-5} M 以下の試薬濃度では、試薬不足により反応が定量的に進行しなかったと考えられる。これより試薬濃度は 1.9×10^{-5} M と設定した。また、モル比法より錯体組成は Al : DHAB = 1 : 2 (Al モル濃度 200 ppb = 7.4×10^{-6} M, 試薬モル濃度 = 点線の交点 = 1.46×10^{-5} M) となった。この結果は 3・2・2 でも示されたように、まず非

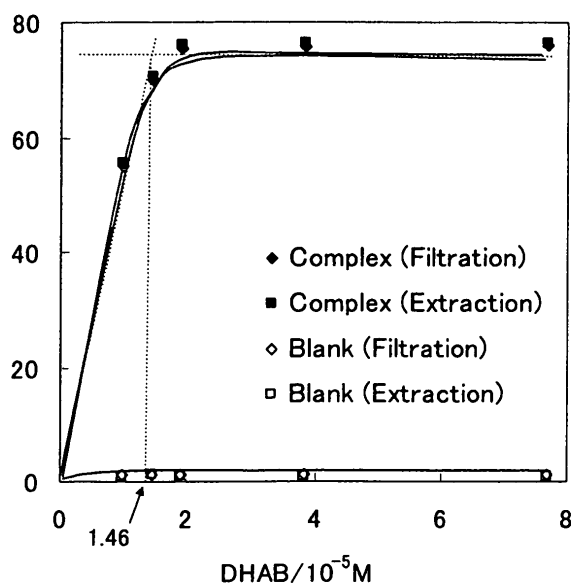


Fig. 8 Effect of reagent concentration on fluorescence intensity

Al: 200 ppb; Reaction: 30°C, 10 min, pH 8; Measurement pH: 3; Extraction time: 1 min; CHCl₃: 3 ml; Ex: 477 nm; Em: 603 nm

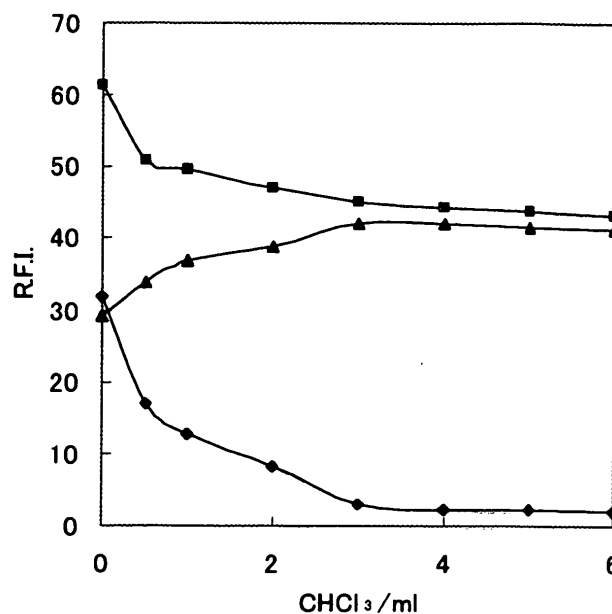


Fig. 9 Effect of volume of extraction solvent(CHCl₃) on R.F.I.

DHAB: 9.6×10^{-4} M; Al: 10 ppb; Reaction: 30°C, 10 min; Reaction pH: 8; Measurement pH: 3; Ex: 477 nm; Em: 603 nm; Stirring time: 1 min; ■: complex; ◆: blank; ▲: net

蛍光性の 1:2 錯体が定量的に生成し、その後 pH の低下により錯体が 1:1 に解離することにより、蛍光を発するようになるとの推定を強く支持している。また、これは Kirby³⁾ らにより水-エタノール系で検討された結果と一致している⁴⁾。

3・2・6 抽出溶媒量の影響 Fig. 9 に抽出溶媒であるクロロホルムの量について検討した結果を示す。試料溶液 50 ml に対し、クロロホルム量 3 ml でネット値は最大を示した。これ以下の量では過剰試薬が十分に除去されていないため、空試験値が高くなっている。3 ml 以上では過剰試薬はほぼ定量的に抽出除去されているため、抽出溶媒量は 3 ml と設定した。既報に述べた¹⁾、生成錯体を抽出する方法では、有機溶媒（リン酸トリブチル）を 10 ml 使用しなければならず、本法ではその使用量を 3 分の 1 以下に減らすことが可能となった。

3・2・7 検量線 0 から 8 ppb の範囲で検量線を作成した。空試験の相対標準偏差 (RSD) は $n = 5$ において 1.4%, 直線の相関係数は 0.999, 検出限界は 0.037 ppb であった。本法は誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) の検出限界 4 ppb⁵⁾ に対し、約 100 分の 1、錯体を抽出する溶媒抽出法の検出限界 0.5 ppb に対し、約 13 分の 1 と良好な結果が得られた。

3・3 過剰試薬汙過除去法

3・3・1 試薬の析出 DHAB は水に対する溶解度が低いために、pH を下げると解離が抑制されることによりそ

の多くが析出してくる。試薬や生成物などの析出などにより、溶液中に遊離物があると一般的には蛍光法でも吸光法でも正確な測定を行うことは難しい。そこで濾紙相分離器を使用することにより、汙過を行いながら測定する方法を採った。このようにして、過剰試薬抽出法では試薬の 95.8% が除去され、汙過除去法では 73.9% が除去されていることが分かった。また、蛍光強度への影響を抽出法と併せて Fig. 1 に示した。蛍光の測定は pH 3 のまま行った。そのため、除去法を使用していないものには遊離の試薬が目視できるほど析出してきており、その光の散乱により、蛍光強度は不安定、かつ大きくなっている。また、破線で Al^{III} 10 ppb での錯体の蛍光強度を示したが（除去法適用済）、その 2 分の 1 以上の空試験蛍光が検出されている。一方、過剰試薬除去法を併用したほうの空試験蛍光は、併用しないほうと比較して非常に低くなっており、除去法の有用性が示唆された。また、抽出による試薬除去率 95.8% を考慮すると、蛍光はそれほど減少していない。これは未反応試薬の蛍光のほかに抽出されずに残った不純物による錯体の蛍光が出ているものと考えられる。不純物としては、緩衝溶液として使用した四ホウ酸ナトリウム中の不純物が考えられ、プラスの妨害を与えるものとしては Mg が考えられる。

3・4・2 検量線 以上のことを踏まえ、0 から 300 ppb の範囲で検量線を作成した。空試験の RSD は $n = 7$

において 1.3%, 直線の相関係数が 0.998 の良好な直線が得られ, 検出限界は 0.04 ppb であった. なお, 定量可能範囲は 0.12 ppb ~ 300 ppb となった.

3・5 蛍光量子収率

標準物質を 1.0×10^{-5} M のキニーネ 0.05 M- H_2SO_4 水溶液 (蛍光量子収率 0.55⁶⁾) とし, これらより水溶液中での Al-DHAB 錯体の蛍光量子収率を求めたところ, 0.014 となった. 水-エタノール系での蛍光量子収率は 0.016 と報告されており⁷⁾, それより低い値となっているが, エタノールなどの溶媒には蛍光強度の増幅効果が知られており, それによる差であると考えられる. 但し, これらの測定は大気中で行われており, 溶存酸素の影響は考慮されていない.

水-エタノール系である場合, 試薬の溶媒への溶解度が高く, 試薬が析出してこないために汜過分離により試薬除去法が適用できない. それ故, 空試験値が高く高感度の分析にはあまり望ましくない.

3・6 妨害除去

本法を環境試料水に適用することを試みた. 水試料に普通に含まれている金属イオンについて影響を調べた. 添加した金属とその濃度を Table 1 に示す. 各々の濃度は河川水標準試料 (JAC 0031) 中に含まれる元素について, その Al に対する割合から算出したものである. 結果はほとんどのイオンがそれぞれの濃度において明らかな妨害は示さなかった. しかし, pH の変化と試薬除去を行わずに測定すると, Mg がその存在量の多さもあり +120% とい

う重大な妨害を示すことが分かった. DHAB は Mg の蛍光定量試薬⁸⁾としての報告があり, pH 10.2 ~ 11.4 の範囲において錯体を形成する (Em : 580 nm). その蛍光が影響を及ぼしていると考えられる. しかし, pH の低下と試薬濃度の減少により Mg-DHAB 錯体はそのほとんどが解離してしまい, 蛍光を発しなくなったと考えられる. この結果から, 本法は水道水や天然水のような希薄な溶液であれば, 前処理やマスキング剤を使用せずに定量できることが分かった.

3・7 水試料への適用

今までの結果を踏まえて, 日本分析化学会から発行されている河川水標準物質 JAC 0031 (無添加) と JAC 0032 (添加) の Al の定量を行ったところ, それぞれ $n=5$ において保証値 13.5 ± 0.7 ppb, 61 ± 2 ppb に対し 12.6 ± 0.3 ppb, 63 ± 0.5 ppb の Al を検出した. 保証値からはわずかに外れてしまったが有機溶媒も前処理も必要としない, 簡便かつ安価な分析法として非常に有用であると思われる.

また, 各地域水道水に本法を適用した結果を Table 2 に示す. Table から分かるように結果は ICP-AES とほぼ一致した. わずかに差異が見られたものもあるが, 前処理を行わないことを考慮すると比較的良好な結果であると言える. 大きな差が現れた No.3 のサンプルには 300 ppb もの鉄が含まれており, この妨害が現れたものと考えられる. なお, 多量の鉄が含まれる場合は還元剤を添加することにより, それらの影響を減少させることができる. 本法の場合も還元剤の添加によってその影響を減少させることができた.

文 献

- 1) 渡辺邦洋, 吉沢英幸, 川垣恭三: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **30**, 640 (1981).
- 2) 渡辺邦洋, 寺田雄一, 板垣昌幸: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 645 (1997).
- 3) K. R. Kirby, R. M. Milburn, J. H. Saylor: *Anal. Chim. Acta*, **26**, 458 (1962).
- 4) J. H. Saylor, J. W. Ledbetter: *Anal. Chim. Acta*, **32**, 398 (1965).
- 5) 原口紘彦, 久保田正明, 森田昌敏, 宮崎 章, 不破敬一郎, 古田直紀: “ICP 発光分析法”, 日本分析化学会編, 機器分析実技シリーズ, p. 241 (1988), (共立出版).
- 6) 無機応用比色分析編集委員会編: “無機 応用比色分

Table 1 Effect of foreign ions

Al added	Foreign ion	Concentration, ppm	Al found, ppb
100 ppb	Ca^{2+}	100	99.8
	Na^+	20	100.1
	K^+	2	100.0
	Cu^{2+}	0.010	97.6
	Zn^{2+}	0.005	98.1
	As^{3+}	0.002	100
	Cr^{3+}	0.001	100
10 ppb	Fe^{3+}	0.005	9.80
	Mn^{2+}	0.002	9.99
	Mg^{2+}	1	10.2

Table 2 Determination of Al in tap water

Sample No.	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Present method, ppb	11.6 ± 0.2	49.1 ± 0.1	20.3 ± 0.4	10.7 ± 0.4	6.0 ± 0.2
ICP-AES, ppb	10.0 ± 0.3	48.9 ± 0.9	24.2 ± 0.5	11.1 ± 0.3	5.3 ± 0.2

$n=4$, Sampling area: No.1, Tokyo (Setagaya); No.2, Kanagawa (Kawasaki); No.3, Ibaraki (Tone); No.4, Saitama (Hatogaya); No.5, Chiba (Noda)

- 析 6", p. 76 (1973), (共立出版).
- 7) 重松恒信, 西川泰治: "最近の分析化学", 26, p. 44 (1975), (化学同人).
- 8) H. Diehl, R. Olsen, G. I. Spielholtz, R. Jensen: *Anal. Chem.*, 35, 1144 (1963).

要 旨

蛍光定量法においてその検出限界に大きな影響を及ぼす空試験蛍光を, 過剰試薬の除去によって低減させ, 検出限界を向上させる方法について検討した. 蛍光試薬として 2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン (DHAB) を使用し, アルミニウムの定量を試みた. 過剰の反応試薬は 3 ml の溶媒により 95.8% 除去が可能であった. これは錯体を抽出する方法の約 3 分の 1 の有機溶媒の使用量である. これによる空試験蛍光減少の結果, 検出限界は 0.03 ppb となった. また, 試薬の水への難溶性を利用し, pH 8 で錯体生成後, pH を 3 にさせることにより析出した DHAB を濾紙相分離器により除去した. これは有機溶媒を全く使用しないにもかかわらず 73.9% の試薬除去が可能であり, その検出限界は 0.04 ppb となった. 本法を水道水試料に適用したところ特別な前処理をしないにもかかわらず, ICP-AES の結果と良い一致を示した.