

# 高速液体クロマトグラフィーによるアルミニウム(III)及びクロム(III)クペロン錯体の分離定量

斎藤 勝, 古谷健二, 井上秀成<sup>®</sup>, 白井恒雄\*

(1988年12月17日受理)

溶媒抽出試薬であるクペロン(*N*-ニトロソフェニルヒドロキシルアミンアンモニウム塩)が, 広い pH 領域で多種の重金属イオンと安定な錯体を形成することに着目しアルミニウム(III)及びクロム(III)を HPLC で定量した. 固定相にポリスチレン系疎水性硬質ゲルを充てんしたカラム(内径 6.0 mm×150 mm)を, 溶離液にアセトニトリル-水 (98/2, v/v) を使用することにより, pH 2.5 の反応溶液で調製したアルミニウム(III)及びクロム(III)クペロン錯体が, 迅速かつ簡便な操作で分離定量できた. 検量線は 50~1000 ng cm<sup>-3</sup> の濃度範囲で直線性を示し, アルミニウム(III), クロム(III)の検出限界は 0.27 ng cm<sup>-3</sup>, 0.47 ng cm<sup>-3</sup> で, 濃度 50 ng cm<sup>-3</sup> 付近で求めた相対標準偏差はそれぞれ 5.6%, 2.1% であった. 又, 本法を実試料に応用したところ, 吸光光度法による定量値と一致した結果が得られた.

## 1 緒 言

環境試料中の金属の分析法としては従来より吸光光度法<sup>1)</sup>, AAS<sup>2)</sup>, 発光分析法<sup>3)</sup>などが用いられているが, 近年では, 広く普及している HPLC を用いて重金属を有機金属錯体として分離定量し, 間接的に金属を定量する研究が盛んに行われるようになってきた<sup>4)~8)</sup>. HPLC 法には多成分の同時検出が可能であること, 溶出成分間相互の量的挙動を観測することができること, 前処理時間及び分析時間が比較的短いことなどの利点がある. このような HPLC を利用した研究例は現在までに,  $\beta$ -ジケトン系<sup>9)</sup>, ジチオカルバメート系<sup>10)</sup>などのキレート試薬を用いた重金属の定量例が多く報告されている. そこで, 溶媒抽出試薬であるクペロンが広い pH 領域で 50 種類以上の金属イオンと安定な錯体<sup>11)~14)</sup>を迅速に形成し, そのクペロン金属錯体のモル吸光係数が比較的大きいということに着目して, クペロンをキレート試薬としたアルミニウム(III), クロム(III)の HPLC による同時定量を行った. 更に, 実試料への応用として河川水サンプル中のアルミニウム(III), クロム(III)の定量を行い, 吸光光度法<sup>15)16)</sup>との比較を行った.

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

アルミニウム(III)標準液<sup>17)</sup>( $1 \times 10^{-2}$  M): 無水塩化

アルミニウム(和光純薬工業) 0.15 g を蒸留水に溶解して 50 cm<sup>3</sup> とした.

クロム(III)標準液 ( $1 \times 10^{-2}$  M): 塩化クロム六水和物(和光純薬工業) 0.30 g を蒸留水に溶解して 50 cm<sup>3</sup> とした.

クペロン溶液 ( $8 \times 10^{-2}$  M)<sup>18)</sup>: クペロン(和光純薬工業) 0.52 g を蒸留水に溶解して 50 cm<sup>3</sup> とした.

緩衝液(pH 2.5): 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液-0.1 M 塩酸を用いた.

緩衝液(pH 4.0, 5.0)<sup>18)</sup>: 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液-0.1 M 酢酸を用いた.

緩衝液(pH 7.0): 1/30 M リン酸二水素カリウム溶液-1/30 M リン酸水素二ナトリウム溶液を用いた.

緩衝液(pH 8.5)<sup>18)</sup>: 0.2 M 塩化アンモニウム溶液-0.2 M アンモニア水を用いた.

その他の試薬と溶媒はいずれも市販特級品をそのまま使用した. ただし, HPLC の溶媒は HPLC 級(関東化学)を用いた.

### 2.2 装 置

クロマトグラフ: Yanaco L-4000W ポンプと日本分光製 Model VL-614 インジェクター(ループ容量 100 mm<sup>3</sup>)及び Shodex M-315 紫外吸光光度計を用いて構成した.

カラム: ポリスチレン系疎水性硬質ゲルを充てんした Shodex RSpak DS-613 (内径 6.0 mm×150 mm) を用いた. 流量は 1.4 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> に設定した.

\* 慶応義塾大学理工学部応用化学科: 223 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1

そのほか、pH の測定には東亜電波工業製の IM-20E 型デジタルイオン濃度計を、カラム温度の調節には東京理化学器械製のユニクール UC-65 型恒温槽を、又、吸光度計は日本分光製の UVIDEC-1 を使用した。セルは 1 cm 石英セルを用いた。

### 2・3 試料調製と抽出操作

クペロン金属錯体は、窒素雰囲気下 0.01 M 金属イオン水溶液 10 cm<sup>3</sup> と 0.08 M クペロン水溶液 10 cm<sup>3</sup> を混合し、0.1 M クエン酸ナトリウム溶液-0.1 M 塩酸緩衝液 10 cm<sup>3</sup> で pH 2.5 に調製し、水浴中(室温) 1 時間かき混ぜて得た。これらを分液漏斗に移し、クロロホルム 30 cm<sup>3</sup> を加えて約 30 秒振り混ぜ、両相を分離し、クロロホルム相を取り出した。更に、クロロホルム相中の未反応のクペロンを除去するために、0.1 M アンモニア水-0.1 M 塩化アンモニウム緩衝液 (pH 8.5) 120 cm<sup>3</sup> でクロロホルム相を洗浄した。その後、クロロホルム相を蒸発乾固させることによってクペロン金属錯体を得た。二座配位子のクペロンは、一般に二価の金属には 2 分子、三価の金属には 3 分子配位すること考えられる<sup>18)</sup>。上記に従って環境中に比較的多く存在する 10 種類の金属イオン {Fe(III), Cr(III), Al(III), Ga(III), In(III), Ni(II), Zn(II), Co(II), Cu(II), Mn(II)} のクペロン錯体を調製した。

## 3 結果及び検討

### 3・1 HPLC 最適条件の検討

カラムは、錯体の脂溶性を考慮して化学結合型 ODS カラムを選択した。その結果、アセトニトリル-メタノール-水の 3 成分系の移動相でアルミニウム(III)及びクロム(III)の錯体のピークが良好に分離されたが、鉄(III)、銅(II)、亜鉛(II)、ニッケル(II)、コバルト(II)、マンガン(II)、ガリウム(III)、インジウム(III)の錯体のピークは得られなかった。これは、ODS の脂溶性が大きいためクペロン金属錯体が ODS に分配保持され、強く吸着したことに起因するものと考えられる。そこで、ODS より脂溶性の小さいポリスチレン系疎水性硬質ゲルを充てんした RSpak カラムを用いた。アセトニトリル-メタノール-水系、アセトニトリル-ジクロロメタン-水系など種々の移動相を用いて検討した結果、アセトニトリル 100% を使用した場合、アルミニウム(III)、クロム(III)、鉄(III)、ガリウム(III)のピークが観測され、特に、アルミニウム(III)、クロム(III)はテイリングの少ない良好なピークを示した。しかし、RSpak カラムを使用したときは、アルミニウム

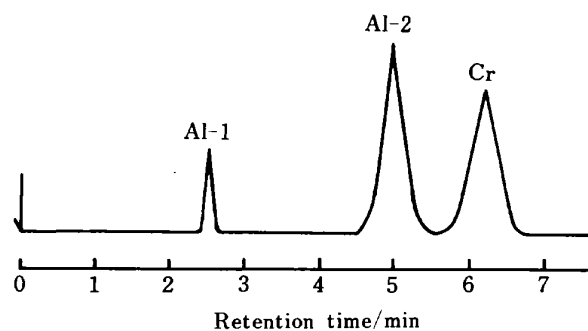


Fig. 1 Chromatogram of metal-Cupferron complexes

Al-1: bis-Cupferron-aluminium(III) complex; Al-2: tris-Cupferron-aluminium(III) complex; Cr: chromium(III)-Cupferron complex; Eluent: acetonitrile (100%, V.); Column: RSpak DS-613

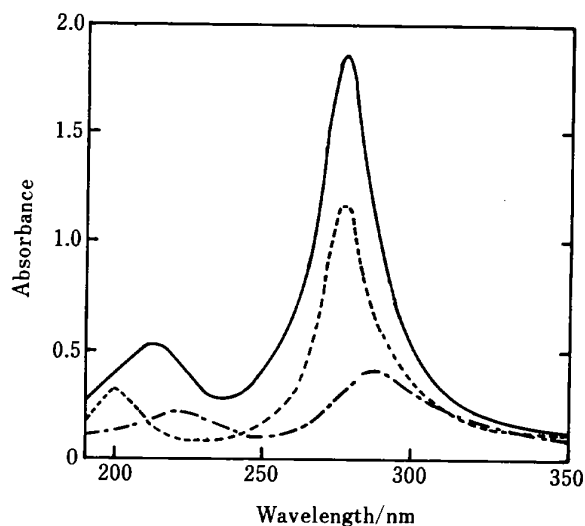


Fig. 2 Absorption spectra of aluminium(III)-Cupferron complexes

Al-1: bis-complex; Al-2: tris-complex; Ligand: Cupferron; ..... Al-1, — Al-2, --- ligand

(III)のピークが 2 本現れ、ODS カラムと異なった挙動を示した。これらのピークはクペロンが 2 分子配位したもの (Al-1) と、3 分子配位したもの (Al-2) のピークであると推測される (3・2 参照)。Fig. 1 には良好なピークを示す Al-1, Al-2 及びクロム(III)の典型的なクロマトグラムを示した。三価の金属で 2 分子配位した錯体はカウンター陰イオンを持っているため、移動相中でカウンター陰イオンが解離し錯体が正電荷を帯びる。そのため、ODS カラムでは 2 分子配位の錯体が残存シラノール基に吸着し、ピークが現れなかったものと考えられる。よって、カラムは RSpak カラムを使用した。

又, 検出波長はアルミニウム(III), クロム(III)錯体の最大吸収波長を測定し 277 nm に設定した (Fig. 2 参照). 更に, カラム温度が室温の場合, ピークがややブロードとなるため, カラム温度を変化させ検討した. その結果, 50°C においてブロードの少ない良好なピークが得られた. 試料の分解及び充てん剤の熱的耐久性を考慮してカラム温度を 50°C とした.

### 3.2 反応時間とアルミニウム(III)錯体の生成割合

調製時の反応溶液の pH 変化に伴いアルミニウム(III)錯体のクロマトグラム上に 2 本 (Al-1, Al-2) のピークが現れた. この 2 本のピークをそれぞれ分取精製し, 電子スペクトル及び元素分析により各成分の同定を行った. Fig. 2 には Al-1 及び Al-2 をアセトニトリルに溶解し, 両物質とも  $5.8 \times 10^{-5}$  M の濃度に調製した溶液の電子スペクトルを示した. Al-1, Al-2 の最大吸収波長の位置はほぼ一致し, 配位子の最大吸収波長の位置とは異なっていた.

又, それぞれのモル吸光係数の比は 2:3 となった. この結果と元素分析の結果 (Al-1: 実験値 C=44.52, H=3.68, N=17.65%, 計算値  $\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2)_2\text{ClCH}_3\text{CN}$ , C=44.52, H=3.47, N=18.54%; Al-2: 実験値 C=49.84, H=4.40, N=19.51%, 計算値  $\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2)_3$ , C=49.32, H=3.45, N=19.17%) より, Al-1 及び Al-2 はそれぞれクペロンが 2 分子配位した二配位錯体と 3 分子配位した三配位錯体であると同定した.

Fig. 3 はクペロン金属錯体の調製において一般に使われている pH 5.5 の反応溶液における反応時間とアルミニウム(III)錯体の生成割合の関係を示す. なお, pH

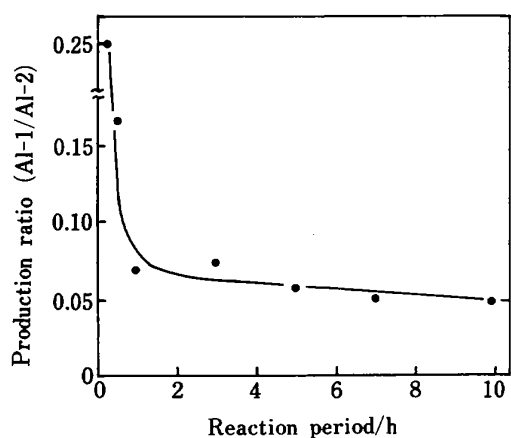


Fig. 3 Dependence of the production ratio of bis-complex (Al-1) to tris-complex (Al-2) on reaction period at pH 5.5 of reaction solution

以外は 2.3 と同様な条件で操作を行った. 縦軸に示した生成割合は, クロマトグラム上に現れる二配位錯体 (Al-1), 三配位錯体 (Al-2) のピーク面積を求め, Al-1/Al-2 で算出したものである. Fig. 3 より反応時間が長くなるに従って生成割合が減少し, 三配位錯体の生成する割合が増加していることが分かる. そして, 約 1 時間でのその生成割合は再現性のある一定値に達した. 従って, 反応時間は 1 時間とした. 又, 反応温度については, 室温約 50°C 以下では錯体の生成割合はほぼ変化しないということを確認したので, 反応温度は室温とした.

### 3.3 反応溶液の pH とアルミニウム(III)錯体の生成割合

Fig. 4 には, 反応時間 1 時間における反応溶液の pH によるアルミニウム(III)錯体の生成割合の変化を示した.

又, その他の条件は 2.3 と同様な方法で行った. アルミニウム(III)は pH 2~9 の領域でクペロンと錯体を形成することが知られている<sup>13)</sup>. しかし, Fig. 4 より, pH が小さくなるに従って二配位錯体が生成しにくくなり, pH 2.5 では完全に三配位錯体のみ生成することが分かった. この理由として, pH が上昇すると, アルミニウム(III)のカウンター陰イオンとして水酸イオンが配位しやすくなるため, クペロンが 2 分子だけ配位した錯体が生成するものと考えられる.

又, クロム(III)錯体についてもアルミニウム(III)錯

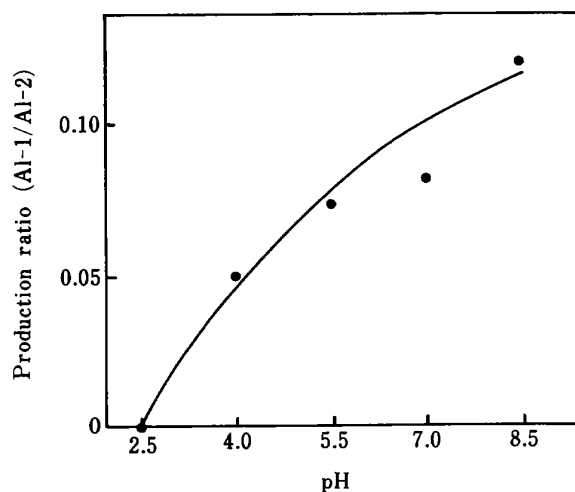


Fig. 4 Plots of the production ratio of Al-1 to Al-2 against the pH of reaction solution for 1 h of reaction period

Cupferron concentration : 0.08 M ; Aluminium(III) concentration : 0.08 M

体と同様に pH 2~9 の領域で錯体が形成された。その結果、クロム(III)錯体は ODS 及び RSpak の両カラムにおいて 1 本のピークのみを与え、たとえクロム(III)の二配位錯体が存在したとしても、アルミニウム(III)の二配位錯体と同様にカウンター陰イオンが移動相中で解離し、残存シラノール基に吸着することが考えられる。従って、ODS カラムにおいても単ピークが観測されたクロム(III)の錯体は三配位錯体であると判断される。

以上の検討より、pH 2.5 の反応溶液でアルミニウム(III)及びクロム(III)クペロン錯体を生成することによって、それぞれの三配位錯体のみを得ることができた。すなわち、反応溶液の pH を 2.5、反応時間を 1 時間、反応温度を室温にしてアルミニウム(III)、クロム(III)クペロン錯体を生成することで、クロマトグラム上にそれぞれ単一のピークを得ることができた。従って、これらの条件を用いて実試料の定量が期待できる。

### 3.4 検量線の作成

良好な分離が得られたアルミニウム(III)及びクロム(III)の定量を行うために、アルミニウム(III)、クロム(III)が最適に分離される移動相を再び検討した。その結果、保持時間、分離度( $R_s$ )などを考慮すると、水を 2% 添加したアセトニトリル-水(98/2, v/v)( $R_s=1.22$ )が最も適当であった。検量線作成の標準試料には、2.3 の方法で調製したアルミニウム(III)、クロム(III)クペロン錯体を分取精製したものを使用した。横軸に、これらの標準物質質量、縦軸にクロマトグラムより得たピーク面積をプロットすることで検量線を作成した。アルミニウム(III)、クロム(III)とも 50~1000 ng cm<sup>-3</sup> の範囲で原点を通る良好な直線となった。検出限界は、ベースラインノイズ(約±0.5×10<sup>-4</sup> AU)の 2 倍( $S/N=2$ )で求めると、アルミニウム(III)が 0.27 ng cm<sup>-3</sup>、クロム(III)が 0.47 ng cm<sup>-3</sup> であり、フレイム AAS での検出限界の文献値 {アルミニウム(III) 20 ng cm<sup>-3</sup>} クロム(III) 0.3 ng cm<sup>-3</sup><sup>2)</sup> と比較してアルミニウム(III)は高い感度を示すことが確認された。又、濃度 50 ng cm<sup>-3</sup> 付近で求めた相対標準偏差はアルミニウム(III) 5.6%、クロム(III) 2.1% であった。

### 3.5 回収率

原子吸光用のアルミニウム(III)、クロム(III)標準溶液(1000 µg cm<sup>-3</sup>)をそれぞれ 1 cm<sup>3</sup> ずつ正確に取り、それを蒸留水でそれぞれ 100 倍に希釈した。その溶液 1 cm<sup>3</sup> を 0.1 M クエン酸ナトリウム溶液-0.1 M 塩酸緩衝

Table 1 Recovery of aluminium (III)- and chromium (III)-Cupferron complexes

Sample	Calculated/ ng cm <sup>-3</sup>	Found/ ng cm <sup>-3</sup>	Recovery, %
Al (III)	10.0	10.7	107±7.58
Cr (III)	10.0	10.6	106±3.47

Analytical results were an average of  $n=3$ .

Table 2 Analytical results on Al (III) in river water samples by HPLC and spectrophotometry

Sample	Al (III)/µg cm <sup>-3</sup>	
	HPLC	Spec. <sup>†</sup>
A	2.50	2.42
B	2.76	2.50
C	2.47	2.29

† Extraction/spectrophotometric method

液 10 cm<sup>3</sup> で pH を 2.5 に調整し、0.08 M クペロン溶液 5 cm<sup>3</sup> を加えアルミニウム(III)、クロム(III)クペロン錯体を生成させた。更に、これらの錯体を 2.3 と同様の方法により抽出し、その後、移動相溶液 10 cm<sup>3</sup> で希釈し検量線の濃度範囲に調整して HPLC で測定を行い回収率を求めた。その回収率を抽出前の濃度で表し、Table 1 に示した。Table 1 よりアルミニウム(III)及びクロム(III)の回収率はほぼ 100% であった。従って、本法を利用して実試料の定量を試みた。

## 4 実試料への応用

実試料への応用として、河川水サンプルの定量を試みた。河川水サンプルは矢上川(横浜市港北区日吉付近)で採取した。岸から 1~3 m 地点(水深約 2 m)でサンプリングを行い、河川水の水温は 22.5°C、pH 7.3 であった。サンプルは Advantec 製定量濾紙(5C)を用いて吸引濾過し粗大浮遊物を除去した後、0.45 µm メンブランフィルター(Advantec)を用いて濾過した。その後、サンプル 10 cm<sup>3</sup> を正確に採取し、2.3 と同様な操作で錯体を調製、抽出し HPLC 分析を行った。又、比較のために従来法である 8-キノリノール(オキシシ)抽出吸光光度法及びジフェニルカルバジド吸光光度法による定量も併せて行った。オキシシ抽出吸光光度法は pH 5.5 の溶液中でアルミニウム(III)とオキシシを反応させ黄色錯体を得、この錯体を pH 9.0 でクロロホルムに抽出し、波長 390 nm において検出、定量を行うものである。ジフェニルカルバジド吸光光度法はクロム

(III)を酸化して得たクロム(VI)が pH 1.0 の溶液中でジフェニルカルバジドと反応し, 波長 540 nm に吸収を持つ化合物を生成することを利用する. HPLC クロマトグラム上には, 河川水サンプル中の共存物質である有機物質のピークが観測されたが, アルミニウム(III)及びクロム(III)のピークより早く溶出するため, アルミニウム(III)及びクロム(III)のピークに対する妨害, 干渉などの影響は見られなかった. 又, 他の金属イオンによる妨害もなかった. Table 2 に示した値は元の試料水中の濃度であり, Table 1 の回収率を用いて補正も行った. 参考値は同じサンプルを吸光光度法<sup>15)16)</sup>によって定量した結果で, 両者は良い一致を示している. 又, これらの値は河川水中のアルミニウムの一般濃度範囲内<sup>19)</sup>であった. なお, クロム(III)については検出されず, サンプル中のクロム(III)は検出限界以下であったものと考えられる.

以上のように, 本法は環境化学などの分野における微量金属分析に有効な手段であると考えられる.

#### 文 献

- 1 D. Manrong, Z. Jinzku: *Huaxue Tongbao*, **2**, 22 (1988); {Chem. Abstr., **108**, 192485e (1988)}.
- 2 P. Burba, P. G. Willmer: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **329**, 539 (1987).
- 3 M. R. P. Garcia, M. E. D. Garcia, A. S. Medel: *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, 699 (1987).
- 4 W. Jerome, O'Laughlin: *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 127 (1984).
- 5 M. Kobayashi, K. Saitoh, N. Suzuki: *Chromatographia*, **20**, 72 (1985).
- 6 A. M. Bond, Y. Nagaosa: *Anal. Chem. Acta*, **178**, 197 (1985).
- 7 M. Biswanath, R. D. Sumant: *Analyst* (London), **111**, 809 (1986).
- 8 B. J. Mueller, R. J. Lovett: *Anal. Chem.*, **59**, 1405 (1987).
- 9 R. C. Gurira, P. W. Carr: *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 461 (1982).
- 10 A. M. Bond, G. G. Wallace: *Anal. Chem.*, **54**, 1706 (1982).
- 11 O. Baudisch, V. L. King: *J. Ind. Eng. Chem.*, **3**, 629 (1911).
- 12 W. L. Chang: *Chem. Anal.* (Warsaw), **50**, 126 (1961).

- 13 A. T. Pilipenko, A. V. Shpak: *Ukr. Khim. Zh.*, **41**, 78 (1975).
- 14 上野景平: ぶんせき, **1983**, 241.
- 15 橋谷 博, 山本克己: 日化, **80**, 727 (1959).
- 16 T. L. Allen: *Anal. Chem.*, **30**, 447 (1958).
- 17 石橋雅美, 水渡英二, 関戸栄一: 日化, **77**, 1836 (1956).
- 18 佐々木与志実: 分析化学, **22**, 1324 (1973).
- 19 W. H. Durham, J. Haffty: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **27**, 1 (1963).

☆

**Separation and determination of aluminium(III)- and chromium(III)-Cupferron complexes by HPLC.**  
Masaru SAITOH, Kenji FURUYA, Hidenari INOUE and Tsuneo SHIRAI (Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University, 3-14-1, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223)

A simple and rapid method was established for the separation and determination of aluminium(III) and chromium(III) complexes of Cupferron (*N*-nitrosophenylhydroxylamine ammonium salt). The aluminium(III) and chromium(III) complexes were precipitated at pH 2.5 from the reaction mixture of each metal ion and Cupferron solution. Chromatographic separation could be achieved by a polystyrene column (6.0 mm i.d. × 150 mm length) with acetonitrile-water (98/2, v/v) as eluent. The calibration curves for the aluminium(III) and chromium(III) complexes were linear in the concentration range of 50~1000 ng cm<sup>-3</sup>. The detection limit for aluminium(III) and chromium(III) was 0.27 ng cm<sup>-3</sup> and 0.47 ng cm<sup>-3</sup> with a relative standard deviation of 5.6% and 2.1% at a concentration level of 50 ng cm<sup>-3</sup>, respectively. The recovery of aluminium(III) and chromium(III) was 107% and 106%, respectively. By this method, aluminium(III) and chromium(III) in river water samples could be determined without any pretreatment processes and the analytical results almost agreed with those of the conventional spectrophotometric method. Thus the HPLC method proposed here can be applied to the analysis of environmental samples.

(Received December 17, 1988)

#### Keyword phrases

HPLC; metal-Cupferron complexes; separation and determination of aluminium(III) and chromium(III); river water samples.