速 報

マイクロ波加熱による 4-(2-ピリジルアゾ) レソルシノールと Cr(III) との錯形成反応の迅速化と プレカラム誘導体化 HPLC による微量 Cr(III) の定量

桑原 秀治¹, 宮内 智昭², 星 野 仁¹, 西岡 正輝³, 高 橋 透^{®4}

1 緒 言

誘導体化試薬を用いて金属イオンを検出が容易な金属錯体に誘導体化し、その計測を行う誘導体化分析法は、今日においても実用的金属イオン定量法として重要な位置を占めており、これまで膨大な数の誘導体化試薬とそれを用いる誘導体化分析法が報告されている¹⁾。ところで、金属イオンの誘導体化分析法が成立するには、誘導体化反応が定量的に進行する、すなわち、試料溶液中に含まれている目的金属イオンの 99.9 % 以上が金属錯体になっている必要がある。錯形成反応速度が極めて小さい置換不活性金属イオン²⁾の誘導体化分析法では、錯形成反応が平衡に到達するまでに長時間を要する、もしくは極端な場合、通常の時間スケールでは錯形成反応が完結しないといった問題が発生する。そのため、置換不活性金属イオンの錯形成反応を化学的に迅速化する方法が考案されてきた。Cr(III) は、そのアコイオンの配位水分子交換反応速度定数も 10^{-6} s^{-1} 程度と極めて小さく、置換不活性金属イオンに分類される³⁾。4-(2-ピリジルアゾ) レソルシノール (PAR) は Cr(III) の有用な誘導体化試薬となりうることが予想されながら、錯形成反応が極めて遅く分析試薬としての使用が難しいと考えられていた⁴⁾⁵⁾。これに対し、Cr(III) と PAR の錯形成反応においてトリエタノールアミン (TEA)⁶⁾ または過酸化水素⁷⁾ を共存させることにより錯形成反応が迅速に進行し、反応条件、反応機構は両者で全く異なるものの、錯形成反応時間をそれぞれ大幅に短縮できることが報告されている。

様々な化学反応プロセスを効率的に促進する手法として

マイクロ波加熱が注目されている⁸⁾⁹⁾。マイクロ波加熱を化学反応に利用すると、ヒーターなどの外部加熱を用いる従来の合成法よりも迅速に反応が進行し、かつ高い収率が得られる事が知られており、置換不活性金属イオンの合成にも利用されている。最近、機能性発光錯体として注目されている Ir(III) や Ru(II) の錯体の合成では、マイクロ波加熱の利用により反応時間を大幅に短縮できることが知られている。例えば、通常の外部加熱による Ir(III)-2-フェニルピリジン錯体の合成では 24 時間以上反応させても 10 % 程度の収率しか得られないが、マイクロ波加熱を導入するとわずか 1 分間の加熱で 75 % の収率が得られることが報告されている¹⁰⁾。

先に述べたように、置換不活性金属イオンの誘導体化分析法では、誘導体化操作に多大な時間を要することが重大な問題となる。本研究では、マイクロ波加熱の新たな分析化学的応用の一つとして、置換不活性金属イオンの誘導体化分析法にマイクロ波加熱を導入することを試みた。分析化学におけるマイクロ波加熱の利用は、金属イオン分析法の試料前処理における湿式分解^{11)~15)}に限られており、置換不活性金属イオンの誘導体化分析法における誘導体化反応の迅速化を目的としてマイクロ波加熱を利用した例はこれまで報告されていない。一方、著者らは微量金属イオンの有用な定量法として、速度論的識別モード高速液体クロマトグラフィー (KD-HPLC) を提案してきた¹⁶⁾¹⁷⁾。KD-HPLC は、あらかじめ金属イオンとその配位子との錯形成反応をオフラインで行い、これを試料として注入する金属イオンのプレカラム誘導体化 HPLC 法の一つである。KD-HPLC では配位子を添加しない溶離液を使用するため、高感度な検出が可能であり、錯体の速度論的特性に基づいた検出選択性が発現する。以下、本稿では、PAR を誘導体化試薬として用いる Cr(III) の誘導体化分析法をモデル反応系として、マイクロ波加熱によるその誘導体化反応の迅速化に加え、さらにその分析化学的応用として、PAR を誘導体化試薬として用いる KD-HPLC のプレカラム誘導体化反応操作にマイクロ波加熱を導入し微量 Cr(III) の選択的

® E-mail: toru@u-fukui.ac.jp

¹ 東北大学大学院環境科学研究科環境科学専攻: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-07

² 福井大学工学部生物応用化学科: 910-8507 福井県福井市文京 3-9-1

³ 産業技術総合研究所コンパクト化学プロセス研究センター: 983-8551 宮城県仙台市宮城野区苦竹 4-2-1

⁴ 福井大学大学院工学研究科生物応用化学専攻: 910-8507 福井県福井市文京 3-9-1

Fig. 1 Dependence of the absorbance of the Cr^{3+} -PAR complex on the heat time with a water bath (a), and with microwave heating (b)

$[\text{Cr}(\text{III})] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{PAR}] = 3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{TEA}] = 20 \text{ mM}$ (pH 8.7).

定量法を構築することを試みた。

2 実験

2.1 溶液の調製及び試薬

0.01 M の $\text{Cr}(\text{III})$ 溶液は、関東化学製の硝酸クロムを少量の塩酸及び2回蒸留水に溶解し、pH 2.0 の溶液として調製した。1 mM の PAR 溶液は、Dojin 製 PAR を所定量秤量し、1 M の NaOH 溶液を用いておよそ pH 10 とした微アルカリ性水溶液として調製した。1 M の TEA 溶液は、和光純薬工業製の TEA (99.0 %) を所定量秤量し、6 M の塩酸で pH を 8.7 に調製した。東京化成工業製のテトラブチルアンモニウムブロミド (TBABr) 及び Dojin 製エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は、必要に応じて所定量秤量し、そのまま用いた。実試料として、日本分析化学会頒布の河川水認証標準物質 (JSAC0302-3b) を用いた。

2.2 装置

分光光度計は日立ハイテクノロジーズ製 U-3310 を使用した。HPLC システムは、日本分光製の PU-2080 型ポンプ、UV-2070 型検出器、及び、100 μL のサンプルループを装着した Rheodyne 製六方バルブで構成した。クロマトグラムは、パントス製 U-228 型ペンレコーダーで記録した。分離

カラムとして、関東化学製 Mightysil RP-18GP (カラム長: 150 mm, 内径: 4.4 mm, 粒径: 5 μm) を使用した。溶離液は、0.02 mol kg^{-1} の TBABr, 2 mmol kg^{-1} のモノクロロ酢酸 (最終濃度が上記のようにモノクロロ酢酸緩衝溶液 (pH 2.8) として添加), 及び 0.1 mmol kg^{-1} の EDTA を含む 10 wt% メタノール-25 wt% アセトニトリル-水混合溶液を用いた。マイクロ波加熱には、家庭用 700 W 電子レンジ (山善製 Mwo-1770B-6) を使用した。

2.3 実験操作

所定量の $\text{Cr}(\text{III})$ 溶液, PAR 溶液, 及び TEA 溶液に水を加えて定容 (全量 10 mL) した。実試料 (河川水認証標準物質) の分析では、特に何の前処理も行わず、そのまま実試料溶液を 3 mL 加え、その後の操作は上と同様にした。調製した試料溶液をガラス製スクリー管に移した後、所定時間マイクロ波で加熱し、吸光度測定、及び HPLC 測定を行った。試料溶液のマイクロ波加熱の際は、目視により確認しながら溶液の沸騰を防止した。沸騰する直前にその都度マイクロ波加熱を止め、しばらく放冷した後、マイクロ波加熱を再開した。以下の記述では、マイクロ波加熱における加熱時間は、実際に加熱を行った合計時間とした。

3 結果と考察

3.1 マイクロ波加熱による錯形成反応時間の検討

Fig. 1 は、湯浴 (a) 及びマイクロ波加熱 (b) により $\text{Cr}(\text{III})$ と PAR を反応させたときの加熱時間に対する吸光度 $[\text{Cr}(\text{III})\text{-PAR}]$ 錯体の極大吸収波長: 535 nm 変化を示す。本稿では、TEA を pH 緩衝成分かつ錯形成反応加速剤として TEA を添加した。湯浴による加熱では 60 分まで吸光度が増加し、その後一定の値になった。それに対して、マイクロ波加熱を行うと、約 2 分で一定の値に到達した。すなわち、従来 60 分程度要していた $\text{Cr}(\text{III})$ の誘導体化反応の時間を、マイクロ波加熱を利用することによりわずか 2 分に短縮できることが分かった。湯浴などの外部加熱は、容器表面を外部から加熱し、熱伝導で内部を加熱する表面加熱であるのに対し、マイクロ波加熱は、マイクロ波が容器を透過し、極性分子に吸収されこれを直接加熱する内部加熱であり、被加熱物質自体が発熱体となることが特徴である。このため、外部加熱と比較して、マイクロ波加熱では極めて高速かつ高効率な加熱が可能となり、これが一般的にマイクロ波加熱による種々の化学反応の迅速化の原因であると言われている。本系でもこのようなマイクロ波加熱による加熱特性が錯形成反応の迅速化の一因になったものであろう。一方、配位水分子の交換速度が遅い金属が置換不活性金属では、配位水分子の除去が錯形成反応の速度に大きく関係していると予想される。TEA を加えることにより、湯浴による加熱を用いた場合でも錯形成反応に要す

Fig. 2 Typical chromatograms obtained by the proposed method

a: Chromatogram of a sample containing 8 kinds of metal ions $\{[M^{n+}] = 5.0 \times 10^{-8} \text{ M}, M^{n+} = \text{Al(III)}, \text{Co(II)}, \text{Cr(III)}, \text{Cu(II)}, \text{Fe(III)}, \text{Ni(II)}, \text{V(V)}, \text{and Zn(II)}\}$; b: chromatogram of a certified reference material of river water sample $\{\text{JSAC 0302-3b}; [\text{PAR}] = 1.6 \times 10^{-4} \text{ M}; [\text{TEA}] = 20 \text{ mM (pH 8.7)}\}$.

る時間を数時間から 30 分程度に短縮できることが知られている⁶⁾、別途、マイクロ波加熱を用いた場合の TEA の添加の有無に対する Cr(III)-PAR 錯体の錯形成反応の迅速化の効果について調べたところ、TEA を添加しない場合と比べて錯形成に時間はかかるものの同様の効果があることが分かった。TEA は Cr(III) のマスキング剤として用いられることから分かるように、Cr(III) と錯形成する。TEA を添加することにより、Cr(III)-TEA 錯体が生成し、さらに、TEA と PAR との配位子交換反応を経て Cr(III)-PAR 錯体が生成する。TEA によって Cr(III)-PAR 錯体の錯形成反応が加速されるのは、TEA と PAR との配位子交換反応が、水分子や水酸化イオンのそれに比べて、速やかに進行するためであると予想されている⁶⁾。したがって、本系でのマイクロ波照射の効果は、先述の加熱効果、つまり、溶媒としてのバルクの水分子の高速、直接加熱に加え、非加熱効果も予想される。マイクロ波は Cr(III) イオンの配位水分子、あるいはこれも極性分子である TEA にも吸収され、何らかの効果によって、これらが Cr(III) イオンから外れやすくなったとも考えることができる。無論、配位子である PAR に及ぼす効果も否定できない。さらに、マイクロ波照射によって反応の頻度因子、活性化エネルギーが変化し、その反応系の反応速度定数が変化するとも言われている^{18)~21)}。以上、本系ではその具体的な効果については予想の域を脱するものではないが、マイクロ波加熱を導入することによって、外部加熱を用いる従来法では長時間要した Cr(III) と PAR との錯形成反応を迅速化できることを見いだした。

3・2 KD-HPLC による Cr(III) の定量への応用

前述のように、マイクロ波加熱により、Cr(III) と PAR との錯形成反応を迅速化できることを見いだした。そこで、以下、その分析化学的应用として、PAR を誘導体化試薬として用いる Cr(III) のプレカラム誘導体化 HPLC システム⁶⁾の誘導体化操作にマイクロ波加熱の導入を試みた。Fig. 2a に、マイクロ波加熱による誘導体化操作を行った Cr(III) を含む同濃度の 8 種類の金属イオンを添加した試料のクロマトグラムを示す。加えた 8 種類の金属イオンのうち、Cr(III)、Co(II)、Fe(III)、Ni(II) 及び V(V) の錯体種がクロマトグラム上にピークとして現れた。Co(II) は、PAR と 1:2 錯体を形成し、錯形成反応の過程で酸化されて極めて安定な低スピン型の Co(III) 錯体となるが、本稿では便宜上 Co(II) 錯体とする。配位子を添加しない溶離液を用いるプレカラム誘導体化 HPLC 法である KD-HPLC では、比較的解離反応が遅い錯体種だけがクロマトグラム上にピークを与える。本系で検討した 8 種類の金属イオンいずれも PAR と錯形成することが知られている¹⁾。したがって、Al(III)、Cu(II)、及び Zn(II) の錯体種がピークとして現れなかったのはこれらの化学種が HPLC 分離プロセスにおいてカラム中ですべて解離し、検出器に到達しなかったためである⁶⁾。また、Co(II)、Fe(III)、Ni(II) 及び V(V) の錯体種はクロマトグラム上にピークを与えるものの、これらの錯体種のピーク高さが Cr(III) 錯体のそれに比べて小さい、もしくはピーク形状がブロードになっている。溶離液の pH を中性付近に設定すればこれらの錯体種もシャープな形状のピークを与える²²⁾。一方、複数の錯体種がクロマト

Table 1 Influence of the coexistence of metal ions on the determination of Cr(III)

Metal ion	Cr(III) recovery/%
Co(II) ^{a)}	101
Fe(III) ^{a)}	100
Ni(II) ^{a)}	97.5
V(V) ^{b)}	99.7

[Cr(III)] = 1.0×10^{-7} M, a) 5.0×10^{-6} M, b) 2.0×10^{-6} M.

グラム上にピークを与えることはそれぞれの金属イオンの同時定量が可能であることを意味するが、同時に、それぞれの金属イオンの定量を行う際、特に、注目する金属イオンに対して他の金属イオンが過剰に存在するときには、ピークの重なりによって由来する定量妨害を受けることになることを意味している。それゆえ、本系ではCr(III)を選択的に定量するため、溶離液のpHを試料溶液のそれとは異なる2.8に設定した。Cr(III)錯体の解離反応速度定数は、その配位水分子交換反応速度定数から考えて、Co(II)、Fe(III)、Ni(II)、V(V)の錯体種と比較して小さい、つまり、Cr(III)錯体の解離反応がこれらの錯体に比べて遅いことが期待される。そこで、溶離液のpH条件を酸性条件に設定することにより金属錯体のカラム内での解離反応を促進し、Cr(III)錯体以外の錯体種を積極的に壊してこれらの影響を極力排除したうえでCr(III)の定量を行うことを考えた。実際、Fig. 2aのクロマトグラムは、これらの錯体種の分離カラム内での解離反応がCr(III)錯体のそれと比較して速く進行したことを示している。

Cr(III)濃度が $1 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7}$ Mの範囲で本法の検量線を作成し、式(1)を得た。

$$\text{Abs} = 1.55 \times 10^{-4} + 8.08 \times 10^3 C_{\text{Cr}} \quad (1)$$

但し、Abs、及び C_{Cr} は、それぞれ吸光度換算したピーク高さ、及び試料溶液中のCr(III)濃度を表す。式(1)を用いて、ブランクシグナルの標準偏差の3倍から得た本法の検出限界は7.7 nMであった。既報の検出限界は10 nMであり、本法とはほぼ同等であった。Cr(III)濃度を検出限界に近い 1×10^{-8} Mにしたときの繰り返し測定($n = 5$)におけるピーク高さの相対標準偏差は5.1 %であった。

本法によるCr(III)の定量では、クロマトグラム上にピークを与えるCo(II)、Fe(III)、Ni(II)及びV(V)の錯体種による妨害が予想される。Table 1にCr(III) (1.0×10^{-8} M)に対し、それぞれ20～50倍量のCo(II)、Fe(III)、Ni(II)及びV(V)を添加したときのCr(III)の回収率を示す。Cr(III)の回収率は97.5～101 %であり、設定条件下では本法はこれら共存金属イオンの影響を受けずにCr(III)を定量できることが分かった。

本法を実試料〔日本分析化学会頒布の河川水認証標準物質(JSAC0302-3b)〕中のCr(III)の定量に適用した。Fig. 2bは、本法によって得られた河川水認証標準物質のクロマトグラムである。Cr(III)錯体以外に唯一Fe錯体のピークが見られたが、その他河川水試料中の共存金属イオンの錯体種は明瞭なピークとして現れなかった。Feを含む共存金属イオンの錯体種のピークとCr(III)錯体のピークとの重なりは一切無かった。本法によって得られた河川水標準試料中のCr(III)濃度は 189 ± 1 nM ($n = 4$)であり、認証値(192 ± 4 nM)と良好に一致した。以上、本法はマスキング等の前処理なしに河川水標準試料中のCr(III)の定量が可能であった。また、従来法に較べて、本法ではプレカラム誘導体化反応に要する時間を大幅に短縮することに成功した。

4 結 言

本稿では、マイクロ波加熱の新たな分析化学的応用の一つとして、置換不活性金属イオンの誘導体化分析法にマイクロ波加熱を導入することを試み、そのモデル反応系としてCr(III)とPARとの錯形成反応の迅速化を試みた。従来法に較べ、錯形成反応に要する時間を大幅に短縮できることを見いだすと共に、これをPARを誘導体化試薬として用いるKD-HPLC系に適用し、迅速、かつ、高感度なCr(III)の定量法を確立した。ここではCr(III)-PAR錯体系をモデル反応系としたが、当然のことながら、マイクロ波加熱はCr(III)以外の置換不活性金属イオンの誘導体化分析法、あるいは、その配位子構造ゆえ錯形成反応が遅いことが問題とされてきたポルフィリンを誘導体化試薬として用いる分析法¹⁾への利用も有用であろう。さらに、加熱効果に限ればマイクロ波加熱は極めて広範な化学反応への応用が有用であり、実験条件に留意すれば安価な家庭用電子レンジの利用が可能である。したがって、今後、マイクロ波加熱が分析化学における一般的なテクニックとして広く普及することが期待される。

文 献

- 1) K. Ueno, T. Imamura, K. L. Cheng: "Hand Book of Organic Analytical Reagents", CRC Press, (1992).
- 2) F. バソロ, R. C. ジョンソン, 山田祥一郎訳: "配位化学", 第2版, 6章 (1987), (化学同人).
- 3) F. A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann: "Advanced Inorganic Chemistry, 6th ed.", p. 59 (1999), (John Wiley and Sons, Inc.).
- 4) A. Tataev, R. R. Abdulaev: Zh. Anal. Khim., **25**, 930 (1970).
- 5) T. Yotsuyanagi, Y. Takeda, R. Yamashita, K. Aomura: Anal. Chim. Acta, **67**, 297 (1973).
- 6) H. Hitoshi, T. Yotsuyanagi: Anal. Chem., **57**, 625 (1985).
- 7) 山本勝巳, 高野裕一, 分析化学 (Bunseki Kagaku),

- 27, 460 (1978).
- 8) 和田雄二, 竹内和彦 監修: “マイクロ波の化学プロセスへの応用”, (2001), (シーエムシー出版).
 - 9) S. Caddick: *Tetrahedron*, **51**, 10403 (1995).
 - 10) H. Konno, Y. Sasaki: *Chem. Lett.*, **32**, 252 (2003).
 - 11) 野網靖雄, 小笠原弘: *ぶんせき (Bunseki)*, 373 (2005).
 - 12) 原賀智子, 石森健一郎, 加藤健一, 亀尾 裕, 高橋 邦明: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **60**, 87 (2011).
 - 13) 山崎 慎: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **49**, 217 (2000).
 - 14) 玉田知子: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **53**, 435 (2004).
 - 15) 赤塚邦彦, 星 座: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **43**, 61 (1994).
 - 16) 星野 仁: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **51**, 597 (2003).
 - 17) 高橋 透, 竹原由佳, 星野 仁: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **56**, 159 (2007).
 - 18) P. Lidstrom, J. Tierney, B. Watthey, J. Westman: *Tetrahedron*, **57**, 9225 (2001).
 - 19) F. Langa, P. der la Cruz, A. de la Hoz, A. Diaz-Ortiz, E. Diez-Barra: *Contemp. Org. Synth.*, **4**, 373 (1997).
 - 20) J. G. Binner, N. A. Hassine, T. E. Cross: *J. Materr. Sci.*, **30**, 5389 (1995).
 - 21) J. Berlan, P. Giboreau, S. Lefeuvre, C. Marchand: *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2363 (1991).
 - 22) T. Takahashi, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi: *Anal. Sci.*, **22**, 1585 (2006).

Acceleration of Complexation of Cr(III)-4-(2-pyridylazo)resorcinolato Complex by Microwave Heating and Its Application to Derivatization Reaction in Pre-column Derivatization-HPLC Determination of Trace Cr(III)

Hideharu KUWABARA¹, Tomoaki MIYAUCHI², Hitoshi HOSHINO¹,
Masateru NISHIOKA³ and Toru TAKAHASHI^{®4}

[®] E-mail: toru@u-fukui.ac.jp

¹ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, 6-6-07, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579

² Faculty of Engineering, University of Fukui, 3-9-1, Bunkyo, Fukui-shi, Fukui 910-8507

³ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Research Center for Compact Chemical Process, 4-2-1, Nigatake, Miyagino-ku, Sendai-shi, Miyagi 983-8551

⁴ Graduate School of Engineering, University of Fukui, 3-9-1, Bunkyo, Fukui-shi, Fukui 910-8507

(Received May 13, 2013; Accepted June 4, 2013)

The acceleration of a complexation of Cr(III)-4-(2-pyridylazo)resorcinolato (PAR) complex with microwave heating was achieved. Though it required more than 100 min for completing the complexation reaction of Cr(III) with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol by heating with a hot-water bath, the reaction was completed within 2 min by microwave heating with a household microwave oven. The successful application of the acceleration of the complexation reaction by microwave heating to the derivatization of the determination method for trace Cr(III) by a pre-column derivatized ion-pair reversed-phase partition high-performance liquid chromatography was also accomplished. A detection limit as low as 7.7 nM was achieved, and a successful application of the proposed method to the determination of Cr(III) in the certified reference material of a river-water sample, JSAC 0302-3b, was also performed.

Keywords: microwave heating; acceleration; complexation reaction; Cr(III); 4-(2-pyridylazo)resorcinol; pre-column derivatization HPLC.