

報 文

2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピル
アミノ)フェノールを用いるキャピラリー電気泳動法による
ニッケル, 鉄塩中の極微量不純物の定量

香川 拓司*, 高柳 俊夫^{®*}, 大島 光子*, 本水 昌二*

Determination of trace metal impurities in nickel and iron salts using
2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropyl-amino)phenol
by capillary zone electrophoresis

Takuji KAGAWA, Toshio TAKAYANAGI, Mitsuko OSHIMA and Shoji MOTOMIZU*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushimanaka, Okayama-shi,
Okayama 700-8530

(Received 2 May 2002, Accepted 30 July 2002)

2-(5-Nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino) phenol (Nitro-PAPS) was used for a quantitative determination of ultratrace-level metal ions in commercially available metal salts by capillary zone electrophoresis. At pH 7, Nitro-PAPS reacts with various metal ions to form chelate compounds having large molar absorptivities. Although chelate formation is useful for the highly sensitive detection of metal ions, the resolution of the metal complexes is poor at pH 7. Cetyltrimethylammonium bromide was added to suppress any electroosmotic flow. The hydration of nitro groups of a chelating agent and chelates was controlled by the addition of urea. Sodium sulfate was also utilized to sharpen the signals of metal chelates by a field-enhanced stacking effect. As a result, the resolution was improved and the determination of 10^{-7} M level metal ions was possible. The proposed method was applied to the analysis of metal impurity at ultratrace levels in commercially available nickel and iron salts.

Keywords : capillary zone electrophoresis; metal ions; 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino)phenol; nickel and iron salt; impurity analysis.

1 緒 言

キャピラリー電気泳動法 (CE) は, 荷電物質の分離のための有用な手法として, 1979 年に Mikkers ら¹⁾により紹介された。更に Jorgenson らは, ガラスキャピラリーを用いるアミノ酸等の分離²⁾を行い, 高性能キャピラリー電気泳動法 (HPCE) として注目されるようになった。

HPCE を用いてシアノ錯体³⁾, 8-キノリノール錯体⁴⁾, 4-(2-ピリジルアゾ)レソルシノール (PAR) 錯体⁵⁾などによる金属イオンの分離が検討されているが, 定量に関しては

あまり着目されていない。これは検出感度が低く, またピーク形状の再現性が悪いなどの点に起因するものと考えられる。後者の欠点は再現性のある試料量注入を行うこと, キャピラリーの温度を一定に保つことにより解決できる。また, 金属イオンの定量を目的とする場合の感度の向上は, 大きなモル吸光係数を有するキレート試薬を利用することにより可能となる。本水らは, 各種キレート試薬を用いる金属イオンの高感度検出法について報告している。例えば, EDTA 及びその類縁体⁶⁾⁷⁾, 2-ニトロソ-1-ナフトール-4-スルホン酸 (ニトロソ-NW 酸)⁸⁾, 2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール (Bromo-PAPS)⁹⁾ 及び 2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-

* 岡山大学理学部化学科: 700-8530 岡山県岡山市津島中 3-1-1

(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール (Nitro-PAPS)¹⁰⁾ 等がある。なかでも Nitro-PAPS を用いた方法¹⁰⁾ では、低い pH 領域 (pH ~ 4) で Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ の 7 種の金属イオンが分離可能であった。しかし、pH が減少するにつれてピーク高さが減少し、低濃度での検出、定量が困難になった。本研究では、Nitro-PAPS を用いる金属イオンの分離と定量について詳細な条件検討を行い、高感度定量のための実用性を吟味した。

2 実験

2.1 試薬

キレート試薬として Nitro-PAPS (同仁化学製特級) を蒸留水に溶解して 10⁻² M 溶液を調製し、希釈して用いた。臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTABr) は東京化成製 (10⁻³ M)、尿素 (6 M)、硫酸ナトリウム (0.1 M) は和光純薬製のものを用い、それぞれ CTABr は 10⁻³ M、尿素は 6 M、硫酸ナトリウムは 0.1 M 溶液を調製し、必要に応じて希釈して用いた。pH 緩衝液として 0.1 M 酢酸と 0.1 M 酢酸ナトリウム、あるいは 0.1 M リン酸二水素カリウムと 0.1 M リン酸水素二ナトリウムの混合溶液を用いた。金属イオン標準溶液 (V^{III}, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺) には、市販特級の金属塩化物を少量の塩酸を含む精製水に溶解して 10⁻³ M 溶液を調製し、必要に応じて希釈して用いた。泳動液には、1.2 × 10⁻⁴ M の Nitro-PAPS と 20 mM の pH 緩衝液を含む溶液を用い、分離改善のための試薬として CTABr, Na₂SO₄, 尿素を用いた。

2.2 装置

CE 装置は Hewlett Packard 製^{3D}CE を用いた。キャピラリーは、内径 50 μm, 外径 375 μm の溶融シリカキャピラリーを用い、有効長 (L_D) 40 cm, 全長 (L_T) 48.5 cm のもの (同社製) を用いた。データ処理は ChemStation (同社製) により行い、ピーク高さ、ピーク面積、電気泳動移動度を求めた。

2.3 操作

測定開始前に加圧法により泳動液を 2 分間流しキャピラリー内に泳動液を満した。その後、試料溶液をキャピラリーに導入した。試料は陽極側から加圧法により 5 秒間 (250 mbar s) 導入し、金属塩中不純物の定量の際には、20 秒間 (1000 mbar s) 導入した。その後、20 又は 25 kV の電圧を印加して電気泳動分離を行い、陰極側にて 570 nm で吸光検出した。測定中、キャピラリーは 35°C に保った。試料溶液は金属イオン標準溶液又は試料溶液に Nitro-PAPS 溶液、pH 緩衝液を添加して反応させた後、孔

径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過したものを用いた。

3 結果及び考察

3.1 測定波長

Nitro-PAPS は多くの遷移金属イオンと安定な錯陰イオンを形成し、そのキレートのほとんどが 520 ~ 600 nm に吸収極大を示す。今回検討した金属イオンは、V^{III}, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ で、試薬のバックグラウンド吸収が小さく、多くのキレートが吸収極大波長を有する 570 nm を検出波長とした。

3.2 泳動液の pH の影響

電気浸透流 (EOF) の速度と金属キレートの電気泳動移動度は、pH 7 以上ではほとんど一定で、pH 7 以下ではどちらも徐々に小さくなる。これはシラノール基の解離の影響と、金属キレートの条件生成定数が大きくなるためである。

Fig. 1 に pH 4.5 (A) と 7.0 (B) におけるエレクトロフェログラムを示す。(A) では、Pb²⁺ 以外の金属イオン濃度は (B) の濃度の 2 倍以上であり、(B) において検出感度が高いことが分かる。二価の金属イオンが二価のキレート陰イオン MR₂²⁻ (M²⁺: 金属イオン, R²⁻: Nitro-PAPS) として存在している pH 領域では、それぞれの電気泳動移動度には違いがほとんどないが、Co 錯体は、ほかの二価の金属イオンの約半分である。これは、錯生成におけるコバルトの酸化状態が + 三価で、キレートが Co^{III}R₂⁻ として存在していることを示している。Fe^{II}, Ni^{II}, Co^{III} のキレートの安定度定数は非常に大きいので、それらの電気泳動移動度は pH の影響をあまり受けない。一方、Cu^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, Pb^{II} の安定度定数はそれほど大きくないので、pH の低下に従って未反応の金属イオンが増加し、見掛け上の電気泳動移動度が減少し、それぞれの金属イオンの電気泳動移動度に違いが生じるため、分離が可能になっている [Fig. 1(A)]。本研究では、高感度検出を目的として、安定な錯体を生成する pH 領域 (pH 7) で、分離性能の向上のためのいろいろな相互作用の活用について検討した。

3.3 いろいろな相互作用による金属キレートの分離効果

界面活性剤¹¹⁾ やイオン会合試薬¹²⁾¹³⁾ 等を泳動液に添加すると、ミセルやイオン会合体とキレートとの相互作用による電気泳動移動度の変化、キャピラリー内壁への吸着による電気浸透流の抑制などの作用が発現し、分離に効果的であることが報告されている。本研究では、EOF 抑制の効果が期待できる臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTABr) と、水和反応の制御が期待できる尿素を添加し、キレート陰イオンの分離効果を検討した。また、Na₂SO₄

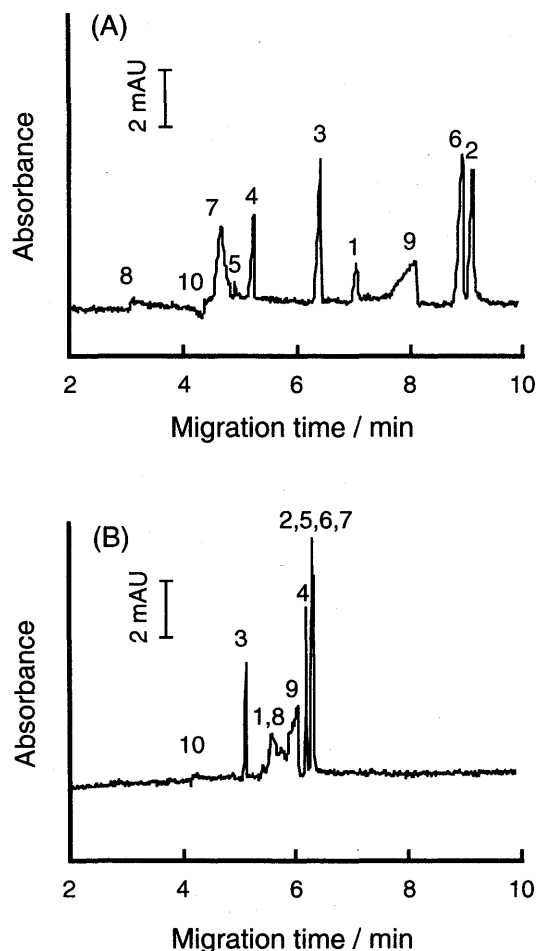


Fig. 1 Electropherograms for 8 metal ions at pH 4.5(A) and 7.0(B)

Migrating solution: (A) 2.4×10^{-2} M acetate buffer (pH 4.5) + 1.2×10^{-4} M Nitro-PAPS; (B) 2.4×10^{-2} M phosphate buffer (pH 7.0) + 2×10^{-4} M Nitro-PAPS. CE conditions: applied voltage, 25 kV; detection wavelength, 570 nm; capillary temperature, 35°C; injection period, 5 s (250 mbar s). Peaks: 1, V^{III} ; 2, Fe^{III} ; 3, Co^{II} ; 4, Cu^{II} ; 5, Zn^{II} ; 6, Ni^{II} ; 7, Pb^{II} ; 8, Cd^{II} ; 9, Nitro-PAPS; 10, EOF. Sample: (A), 1.0×10^{-5} M V^{III} , Fe^{II} , Co^{III} , Cu^{II} , Zn^{II} , Ni^{II} , 5.0×10^{-5} M Pb^{II} , 1.0×10^{-4} M Cd^{II} + 5.0×10^{-4} M Nitro-PAPS + 10^{-5} M acetate buffer (pH 4.5); (B), 5.0×10^{-6} M V^{III} , Fe^{II} , Co^{III} , Cu^{II} , Zn^{II} , Ni^{II} , 5.0×10^{-5} M Pb^{II} , 3.0×10^{-5} M Cd^{II} ; 3.0×10^{-4} M Nitro-PAPS + 10^{-5} M phosphate buffer (pH 7.0)

はスタッキング効果を目的に添加したところ, 分離の向上が確認された。

泳動液として, 1.2×10^{-4} M Nitro-PAPS と 2.0×10^{-2} M リン酸緩衝液 (pH 7) を含む溶液を用いた場合 {Fig. 1 (B)}, Co^{III} , Cu^{II} のみがほかのキレート陰イオンから良好に分離された。ほかの金属イオン (V^{III} , Fe^{II} , Zn^{II} , Ni^{II} , Pb^{II} , Cd^{II}) も Nitro-PAPS とキレートを生成しているが, それらのピークはかなりブロードであるか, ピークが重なるために定量に使用できない。そこで泳動液に CTABr,

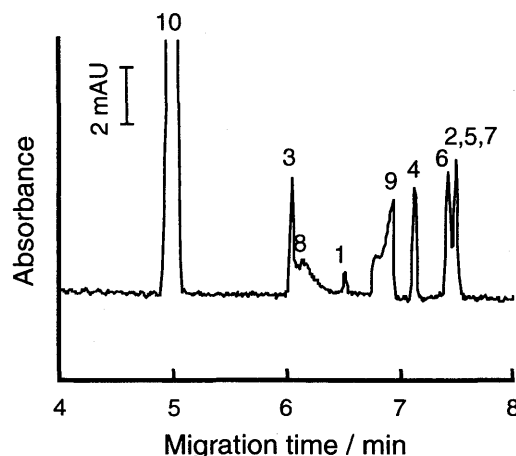


Fig. 2 Electropherogram for 8 metal ions by standard procedure

Sample solution: metal ions + 3.0×10^{-4} M Nitro-PAPS + 10^{-5} M phosphate buffer. Migrating solution: 2.4×10^{-2} M phosphate buffer + 1.2×10^{-4} M Nitro-PAPS + 1.0×10^{-5} M CTABr + 3 M urea + 1.0×10^{-2} M Na_2SO_4 . Other conditions are the same as in Fig. 1 (B).

尿素, Na_2SO_4 を添加すると, Fig. 2 に示すように Ni^{II} , V^{III} のピークも Co^{III} , Cu^{II} と同様に良好に分離でき, Cu^{II} のピークがほかのピークから分離できた。これは CTABr の CTA^+ イオンのキャピラリー内壁への吸着による EOF の抑制, 尿素的添加によるニトロ基周りの水和の抑制, Na_2SO_4 によるスタッキング効果によるピークのシャープ化によるものである。

CTA^+ と尿素的の濃度について検討した (Fig. 3)。泳動液中の CTA^+ は低濃度域では EOF にはあまり変化が見られない。しかし, CTA^+ 濃度が 5.0×10^{-4} M 以上で EOF が反転し, 分離検出が困難になった。また, 濃度 5.0×10^{-6} M 以下では CTA^+ による EOF への影響が小さくなり, 加えていない場合とほとんど変わらない。したがって, 1.0×10^{-5} M を選択した。

尿素は飽和に近い高濃度まで添加することにより水和反応を制御することが知られているので¹⁴⁾, 2.0~4.0 M の範囲で検討した。2.0 M では, あまり効果が見られず, 4.0 M ではベースラインが安定せず分離性能が低下した。よって 3.0 M 尿素を選択した。これにより Cu と Ni の分離が向上した。

Fig. 2 はこれらの最適条件で得られたエレクトロフェログラムである。

3.4 金属塩中の極微量金属不純物の定量

本法で開発した Nitro-PAPS を用いる金属イオンの高感度定量法を, 鉄塩, ニッケル塩中の微量金属不純物の定量に応用した。金属塩はすべて市販特級塩を用いた。3.0 ×

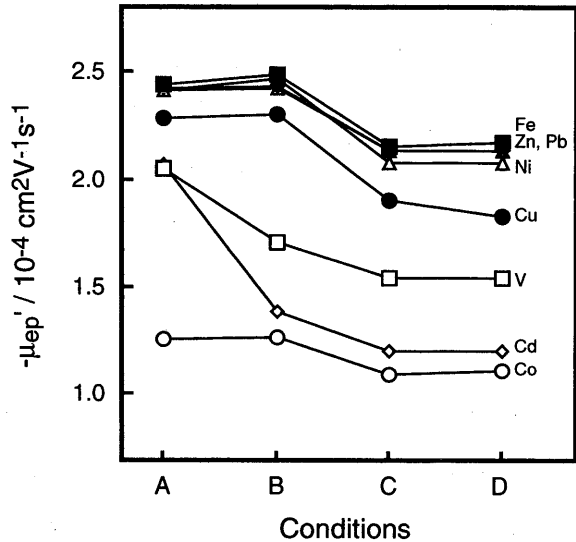


Fig. 3 Changes migrating time with effective reagents
 Sample solution: metal ions + 3.0×10^{-4} M Nitro-PAPS. Migrating solution: (A) no addition, (B) 1.0×10^{-5} M CTABr, (C) 3 M urea, (D) 1.0×10^{-5} M CTAB + 3 M Urea. Other conditions are the same as in Fig. 1 (B).

10^{-4} M の金属塩溶液に 9.0×10^{-4} M Nitro-PAPS を添加したものを試料溶液として用いた。また、感度向上のため注入時間を 20 秒とし、注入量を増やした。

まず、鉄塩の分析として $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を試料として分析を行ったところ、Fig. 4 に示すように、金属不純物としてコバルトと銅を検出した。それぞれのピークは、コバルトと銅の標準液を添加してそのピーク高さが高くなることから同定を行い、また、電気泳動移動度からもコバルトと銅のピークであることを確認した。その結果、 $\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ には銅が 0.019% と比較的多量に含まれているが、コバルトは検出されなかった。次に、ニッケル塩の分析では $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ と $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を試料として分析を行った (Fig. 5)。その結果、ニッケル塩では不純物としてコバルトと銅を検出した。硫酸塩と比較して、塩化物塩中に銅が多く含まれていた。

ピーク高さより求めた鉄塩とニッケル塩中の金属不純物の定量結果を Table 1 に示す。括弧内の数値は定量値から計算したコバルトと銅の含有量 (%) を示す。

4 結 語

CE 法による Nitro-PAPS を用いた金属イオンの同時定量について、分離性能、検出感度の改善を図った。泳動液に pH 7 のリン酸緩衝液を用い、安定な金属錯体が生成する条件下で CATBr, 尿素, Na_2SO_4 を添加することにより、金属キレート検出感度を落とさずに、各種キレートの分離性能を向上させた。本法により 10^{-7} M レベルの Fe^{II} , Co^{II} ,

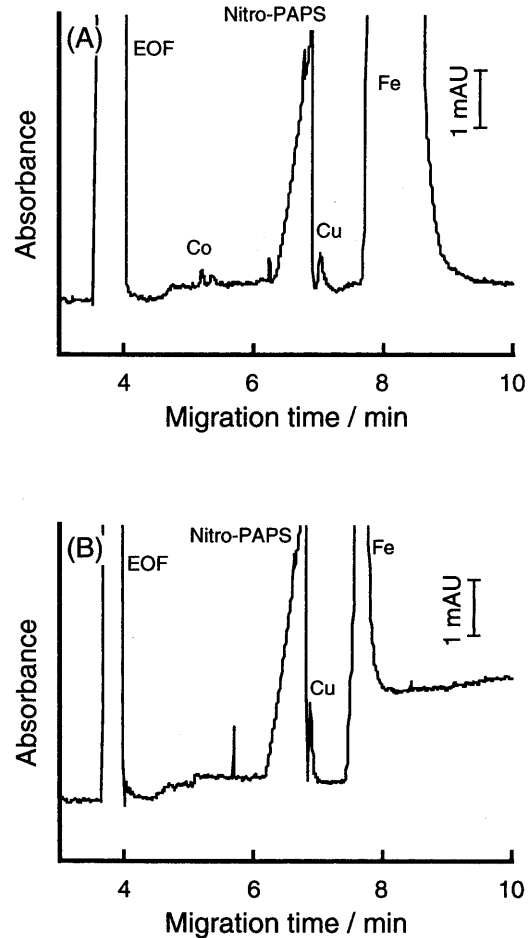


Fig. 4 Electropherograms for analysis of iron salts
 Sample solution: 3.0×10^{-4} M iron salt ((A), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (B), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) + 9.0×10^{-4} M Nitro-PAPS + 10^{-5} M phosphate buffer. Migrating solution: 1.0×10^{-2} M phosphate buffer (pH 7.0) + 1.2×10^{-4} M Nitro-PAPS + 1.0×10^{-5} M CTABr + 3 M urea + 1.0×10^{-2} M Na_2SO_4 . CE conditions: applied voltage, 20 kV; detection wavelength, 570 nm; capillary temperature, 35°C ; injection time, 20 s

Ni^{II} , Cu^{II} の分離定量が可能となった。本法を市販特級金属塩中の極微量金属不純物の定量に適用し、ppm レベルの金属不純物が定量できた。

文 献

- 1) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen: *J. Chromatogr.*, **169**, 11 (1979).
- 2) J. Jorgenson, K. D. Lukacs: *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- 3) M. Aguilar, X. Huang, R. N. Zare: *J. Chromatogr.*, **480**, 427 (1989).
- 4) D. F. Swaile, M. J. Sepaniak: *Anal. Chem.*, **63**, 179 (1991).
- 5) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1993**, 701.
- 6) S. Motomizu, M. Oshima, S. Matsuda, Y. Obata, H. Tanaka: *Anal. Sci.*, **8**, 619 (1992).

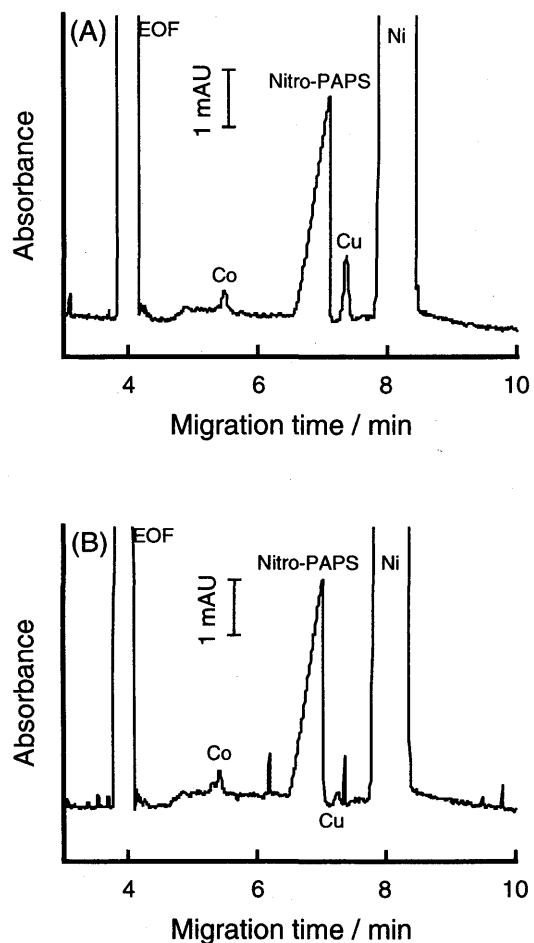


Fig. 5 Electropherograms for analysis of nickel salt
 Sample solution: 3.0×10^{-4} M nickel salt (A), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; (B), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) + 9.0×10^{-4} M Nitro-PAPS + 10^{-5} M phosphate buffer (pH 7.0). Migrating solution and other conditions are the same as in Fig. 4.

Table 1 Determination of metal impurities in analytical reagent-grade metal salts^{a)}

Salt	Cobalt/ 10^{-7} M (content, %)	Copper/ 10^{-7} M (content, %)
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4.02 (0.033)	2.98 (0.027)
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.40 (0.024)	1.09 (0.0089)
$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.16 (0.014)	1.93 (0.0093)
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	— ^{b)}	3.70 (0.028)

a) Conditions are the same as in Fig. 5; b) Not detected.

- 7) 本水昌二, 森本浩司, 桑原正良, 小畑義光, 泉国辰: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 873 (1993).
- 8) 本水昌二, 桑原正良, 大島光子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 621 (1994).
- 9) S. Motomizu, M. Oshima, M. Kuwabara, Y. Obata: *Analyst*, **119**, 1787 (1993).
- 10) S. Motomizu, N. Mori, M. Kuwabara, M. Oshima: *Anal. Sci.*, **10**, 101 (1994).
- 11) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando: *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- 12) N. Iki, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr.*, **652**, 539 (1993).
- 13) T. Takayanagi, E. Wada, S. Motomizu: *Analyst*, **122**, 57 (1997).
- 14) S. Honda, T. Ueno, K. Kakehi: *J. Chromatogr.*, **608**, 289 (1992).

要 旨

市販金属塩中の極微量金属不純物の定量法として, 2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール (Nitro-PAPS) とのキレート体を分離, 検出するキャピラリー電気泳動法について検討した. 各種金属イオンと定量的に反応する pH 7 の条件では, 高感度検出が可能であるが, 多くの金属錯体の分離は十分でない. そこで, 電気浸透流やキレートの電気泳動移動度を変化させる効果のある第四級アンモニウム塩等の添加を検討し, 種々な相互作用試薬を用いて分離の改善を図った. その結果, 臭化セチルトリメチルアンモニウムの添加で電気浸透流が抑制され, 硫酸ナトリウムの添加によるスタッキング効果の活用によりシグナルが鋭敏化され, 尿素の添加でニトロ基周りの水和を抑制したところ, 金属キレートの分離性能が向上した. 本法により 10^{-7} M レベルの Fe, Co, Ni, Cu の分離定量が可能になり, 市販特級金属塩中の極微量金属の分析に適用したところ, ppm ($=10^{-6}$ g/g) レベルの金属不純物を定量することができた.