

## 5-Br-PADAP を用いたプレカラム誘導体化逆相 HPLC による Fe(II)と Fe(III)イオンの分離定量

日大生産工(院) ○安田卓也 日大生産工 齊藤和憲  
首都大工(院) 中嶋秀 日大生産工 渋川雅美

### 【緒言】

鉄は地殻中で 6 番目に豊富な元素であり、海洋の生物生産を規定する重要な元素として近年注目されている。鉄を効率的に獲得することは生物にとって重要であり、鉄の存在形態を明らかにする必要性が近年論じられている。本研究は、プレカラム誘導体化法を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による Fe(II)と Fe(III)イオンの分離定量を目的としたものである。プレカラム誘導体化試薬には Fe(II) および Fe(III) と pH 4.5 で安定な錯体を形成する 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP)を用いた。本法の Fe(II)と Fe(III)の同時定量法としての有用性を両イオンの標準混合溶液を用いて検討し、他の共存イオンの影響についても調べた。さらに、水道水試料への適用を試みた。

### 【実験】

鉄イオンの酸化状態は金属に接触することにより変化する可能性があるため、HPLC装置はすべてPEEK 製のものを使用した。カラムは関東化学製Mightysil RP - 18 ( 5  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4.6 mm i.d.)をPEEK製クロマト管に充填したものをを用い、温度は 35  $^{\circ}\text{C}$ とした。検出はUV-VIS 検出器を用い、検出波長をFe(II)錯体は 553 nm, Fe (III) 錯体は 586 nmとした。流量は 0.8 ml/min に設定した。溶離液は、 10 mM Bis-Tris-HClO<sub>4</sub> (pH 4.5) / 0.1 M NaClO<sub>4</sub> / 50 %(w/v)アセトニトリル-水混合溶液となるように調製した。定量を行う際には、これに 5-Br-PADAPを 10  $\mu\text{M}$ となるように添加して調

製した。また、溶離液は窒素ガスを通気して溶存酸素を除去した。

Fe(III), Cu(II), Ni(II)およびCo(II)溶液は、原子吸光用標準溶液(1000 ppm)をpH 2 のHClO<sub>4</sub>で希釈したものを用いた。Fe(II)溶液は鉄標準溶液に塩酸ヒドロキシルアミンを 0.1 Mとなるように添加しpH 2 のHClO<sub>4</sub>で希釈したものを用いた。Fe(II)とFe(III)の混合試料溶液に用いるFe(II)溶液は、モール塩をpH 2 のHClO<sub>4</sub>で溶解したものを使用した。Fe錯体試料はFe溶液と 5-Br-PADAP溶液を混合し、それぞれ濃度が 100 ppb(1.9  $\mu\text{M}$ )と 5  $\mu\text{M}$ となるように調製した。金属混合溶液は全ての金属溶液をそれぞれ 1000 ppb (19  $\mu\text{M}$ )、5-Br-PADAPの濃度が 250  $\mu\text{M}$ となるように調製した。水道水は採水後にHClO<sub>4</sub>を 2 mMとなるように添加し、組成が 10 mM Bis-Tris-HClO<sub>4</sub> (pH 4.5) / 10  $\mu\text{M}$  5-Br-PADAP / 0.1 M NaClO<sub>4</sub> / 50 %(w/v)アセトニトリル-水となるようにそれぞれの溶液を加え、試料溶液とした。

### 【結果および考察】

他金属の共存下での Fe(II)と Fe(III)の影響について検討した。Fig.1 は各種金属混合溶液のクロマトグラムである。Fe(II)と Fe(III)ともに良好なピークとして検出できたが、5-Br-PADAP と Fe(III)は、ほぼ同時に溶出した。Fe(III)の最大吸収波長(586 nm)付近には 5-Br-PADAP の吸収はない(Fig.2)。よって、この検出波長では 5-Br-PADAP は Fe(III)錯体の妨害とならないことがわかった。

---

**Separation and determination of iron(II) and iron(III) by reversed-phase liquid chromatography using precolumn derivatization with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol**  
**Takuya YASUDA, Kazunori SAITOH, Hizuru NAKAJIMA and Masami SHIBUKAWA**

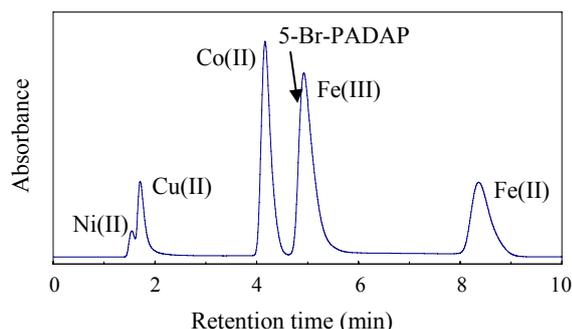


Fig.1 Chromatogram of a mixture of metal-5-Br-PADAP complexes .  
 Sample solution : 250  $\mu$ M 5-Br-PADAP containing 1000 ppb Fe(III), Fe(II), Cu(II), Ni(II) and Co(II)  
 Detection wavelength : 560 nm

1-100 ppbの範囲で測定したときのピーク面積(mV s)に基づくFe(II)とFe(III)の検量線を作成した。検量線はそれぞれ $y = 1.52x + 1.18$  ,  $y = 1.91x - 2.72$  [ x : Fe濃度(ppb), y : ピーク面積(mV s) ]となった。相関係数は0.9998, 0.9993となり良好な直線が得られた。しかし, Fe(II)溶液を測定すると僅かにFe(III)錯体のピークが見られた。これはFe(II)の検量線を作成する際に使用したFe(II)溶液がFe(III)溶液に還元剤を添加して調製したものであるため, 一部のFe(III)が還元されずに残ったためと考えられる。従ってFe(II)の検量線は, Fe(III)の検量線を用いてFe(II)溶液に含まれるFe(III)濃度を定量して実際に含まれるFe(II)濃度を算出して作成した。Fe(II)とFe(III)の検出限界はそれぞれ0.04 ppb, 0.32 ppbであった。S. Oszwałdowskiらの方法では検出限界はそれぞれ18 ppbであり<sup>1)</sup>, 本法の方が微量のFe(II)とFe(III)の定量が可能であることが示された。これは本法では溶離液に5-Br-PADAPを添加しているためFe-5-Br-PADAP錯体の解離を抑制できたことが原因と考えられる。

Table 1は本法によりFe(II)とFe(III)の混合溶液(全Fe濃度=100 ppb)を定量した結果を示したものである。Fe(II)とFe(III)濃度は調製した濃度と一致し, それぞれ分別定量できることが示された。Fig.3に水道水試料のクロマトグラムを示す。Fe(II)およびFe(III)ともに良好なピ

ークが検出され, それぞれ2.9, 8.5 ppbであることがわかった。原子吸光分析により得られたFeの定量値は13 ppbであり, 本法により得られたFe(II)とFe(III)の合計と一致した。以上の結果はFe(II)とFe(III)の分離定量が可能であることを示している。

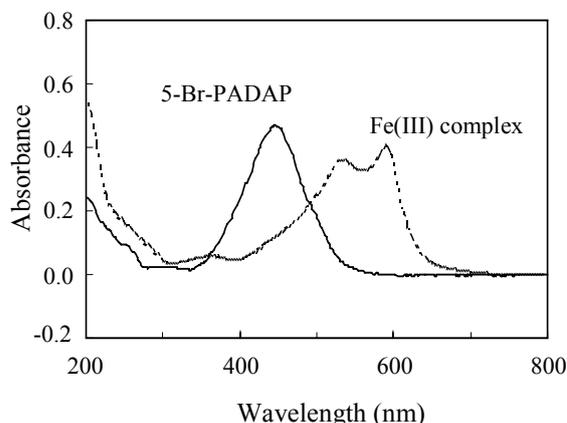


Fig.2 Spectra of 5-Br-PADAP and Fe(III)-5-Br-PADAP complex.  
 Solution : 50%(w/v)acetonitrile-water containing 10 mM Bis-Tris buffer(pH4.5)  
 Sample concentrations : 5-Br-PADAP, 10  $\mu$ M ; Fe(III) complex, 5  $\mu$ M.

Table 1 Determination of Fe(II) and Fe(III) in mix samples by the present method

Calculated(ppb)			Determined(ppb)		
Fe(II)	Fe(III)	Fe(II) + Fe(III)	Fe(II)	Fe(III)	Fe(II) + Fe(III)
100	0	100	104 $\pm$ 0.8	6 $\pm$ 0.1	110 $\pm$ 0.8
75	25	100	77 $\pm$ 1.0	29 $\pm$ 0.4	106 $\pm$ 1.0
50	50	100	51 $\pm$ 0.4	53 $\pm$ 0.3	104 $\pm$ 0.5
25	75	100	25 $\pm$ 0.1	75 $\pm$ 0.4	100 $\pm$ 0.4
0	100	100	2 $\pm$ 0.2	99 $\pm$ 0.8	101 $\pm$ 0.8

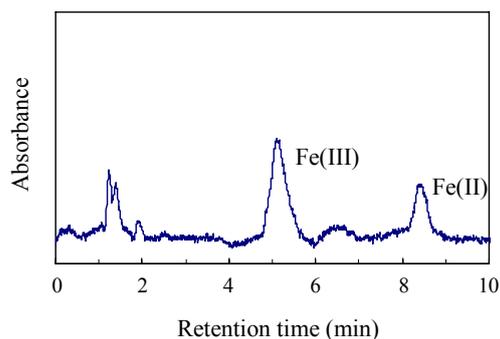


Fig.3 Chromatogram obtained for a tap water sample  
 Sample solution : 10 mM Bis-Tris-HClO<sub>4</sub> / 0.1 M NaClO<sub>4</sub> / 10  $\mu$ M 5-Br-PADAP 50%(w/v)acetonitrile-water solution containing tap water  
 Detection wavelength : Fe(II)=553 nm, Fe(III)=586 nm

#### 【参考文献】

- 1) Oszwałdowski, A. Pikus, *Talanta* **58** (2002) 780.