

報 文

吸光検出逆相イオン対高速液体クロマトグラフィーによる 飲料水中の微量アルミニウムの定量

岩野 真希^{1,2}, 平野 愛弓^{1,3}, 西垣 敦子¹, 渋川 雅美^{®1}

Determination of trace amounts of aluminum in drinking water by
reversed-phase ion-pair HPLC with spectrophotometric detection

Maki IWANO^{1,2}, Ayumi HIRANO^{1,3}, Atsuko NISHIGAKI¹ and Masami SHIBUKAWA¹

¹ Department of Applied Molecular Chemistry, College of Industrial Technology, Nihon University, 1-2-1, Izumi-cho, Narashino-shi, Chiba 275-8575

(Received 8 May 2003, Accepted 26 June 2003)

A reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of trace amounts of aluminum was developed using 5-sulfo-8-quinolinol as a pre-column derivatization reagent for spectrophotometric detection. All of the experiments were carried out in a class-100 clean room to avoid the contamination of aluminum from the laboratory environment. The calibration curve of aluminum standard solutions was linear over the range of 0.5~100 ppb with a correlation coefficient of 0.997 and relative standard deviations of 0.49~1.65%. The limit of detection, defined as three-times the standard deviation of the blank signal, was found to be 0.05 ppb. This method was successfully applied to the determination of trace levels of aluminum in several commercial drinking water and tap water samples.

Keywords : aluminum ; HPLC ; 5-sulfo-8-quinolinol ; absorptiometric detection ; drinking water.

1 緒 言

アルミニウムは極微量でも体内に摂取されると神経毒性を示すことが知られている¹⁾²⁾。また、近年アルツハイマー病を発症させる原因としても疑われ、飲料水からのアルミニウムの摂取量とアルツハイマー病の発症頻度の関係について報告されている³⁾。一方、上水道施設においては原水の凝集沈殿処理剤としてポリ塩化アルミニウムが用いられているため、沈殿槽でのアルミニウムイオンの除去が不十分である場合には比較的高濃度（サブ ppm レベル）のアルミニウムが含まれる場合があり、水道水中のアルミニウムのモニタリングは非常に重要である⁴⁾⁵⁾。

微量アルミニウムの分析法として一般に使用されているのは、黒鉛炉原子吸光法や誘導結合プラズマ原子発光法であるが、近年、簡便で高感度な分析法として高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を利用した方法が多数報告されている^{6)~18)}。検出は、錯形成試薬を用いてアルミニウムイオンを錯体に誘導体化した後、HPLCで分離するプレカラム誘導体化法が最も多く用いられている。使用されているキレート試薬は、8-キノリノール^{13)15)~18)}、5-スルホ-8-キノリノール（HQS）⁶⁾⁷⁾¹⁴⁾、ルモガリオン¹¹⁾¹²⁾などのアルミニウムと反応して蛍光を発する錯体を形成するものが多く、これらのキレート試薬を用いた蛍光検出 HPLC によるアルミニウムの検出限界は 0.1 ppb~数十 ppb と報告されている。しかし、アルミニウムの微量分析においては、空気中のちりや、試薬、容器からの汚染のために、ppb ないしそれ以下のレベルでの正確な定量は極めて困難であり¹⁶⁾、高感度な検出器の使用が必ずしも有効ではない。本研究では、よりはん用されている吸光検出器を用いた

¹ 日本大学生産工学部応用分子化学科：275-8575 千葉県習志野市泉町 1-2-1

² 現在所属 株式会社エムシー・ヒューマンリソース：100-6070 東京都千代田区霞が関 3-2-5

³ 現在所属 株式会社朝日ラバー福島工場医薬製品事業部：969-0101 福島県西白河郡泉崎村大字泉崎字坊頭窪 1

HPLCによる飲料水中のアルミニウムの高感度分析法の確立を目的として検討を行った。プレカラム誘導体化試薬としては、Fengらの研究^{19)~21)}によりアルミニウムイオンとの溶液内反応機構が明らかにされている5-スルホ-8-キノリノール (HQS) を用い、逆相イオン対モードでHPLC分離を行った。本研究では、空気中からのアルミニウム汚染を防ぐために、すべての操作をクリーンルーム内で行った。また、試薬、器具に関しても細心の注意を払い、実験室環境からのアルミニウム汚染を最大限に排除した条件下で安定かつ信頼性の高いデータを得ることを目標とした。更に確立した方法を用いて、水道水並びに市販の各種ミネラルウォーター中のアルミニウムの分析を試みた。

2 実 験

2.1 試 薬

水は、すべてヤマト科学製 AUTOPURE WD500 により精製した超純水を使用した。

HQS (1級、和光純薬製) は、以下の手順で精製したものを使用した。1000 ml のポリプロピレン (PP) 製ビーカーに超純水 700 ml と HQS 1.3421 g を加え、温浴中 (90℃) で溶解させた。ホットプレートであらかじめ温めておいたメンブランフィルターをセットした汙過器でこの溶液を吸引汙過し、汙液を PP 製ビーカーに取った。1日室温で放置し、再結晶させて得られた結晶を上記と同様にして超純水で溶解させ、再び再結晶を行った。収量は 1.2342 g、回収率は 92% であった。

アセトニトリルは、Merck 製の Hypergrade 液体クロマトグラフィー用を使用した。塩化ナトリウムは Merck 製の superpur、塩酸は関東化学製の ultrapur 超高純度試薬を使用した。テトラブチルアンモニウム臭化物 (TBABr) は東京化成製のイオン対クロマトグラフィー用を、またビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン (Bis-Tris) は、同仁化学製を使用した。アルミニウム標準溶液は、関東化学製の原子吸光分析用 (1000 ppm) を使用した。

飲料水試料としては、国内の2地域で採水した水道水と、国内及び海外で製造されたミネラルウォーター4種類を使用した。

2.2 装 置

HPLC 送液ポンプはセンシユー科学製 SSC flow system 3100 を使用した。インジェクターは 20 又は 100 μ l のサンプルループを装着した Rheodyne 製 9725i を用いた。カラムは東京化成製 Kaseisorb LC ODS 2000 (4.6 mm I.D. \times 150 mm) を使用した。カラム温度は 24℃ (クリーンルームの設定温度) とした。検出は Waters 製 2478 Dual λ UV 検出器にて行った。データ処理は島津製 Chromatopac C-

R4A を使用して行った。吸収スペクトルの測定には島津製 UV-2200 分光吸光光度計を用いた。また、溶液の pH 測定は堀場製 pH メーター F-21 を用いて行った。

2.3 操 作

実験は、吸光光度計による吸収スペクトルの測定を除いてすべてクラス 100 のクリーンルーム内で行った。また、ガラス容器からのアルミニウム汚染を防ぐために、溶液調製にはすべて PP 製の容器及び器具を使用した。溶離液には NaCl, TBABr, HQS, Bis-Tris 緩衝液を含むアセトニトリル-水混合溶媒を使用した。溶離液の流量は 1.0 ml/min とした。

アルミニウム標準試料溶液は、以下の手順で調製した。原子吸光分析用アルミニウム標準溶液 (1000 ppm) 12.5 μ l を 25 ml メスフラスコに入れ、溶離液で定容にして 500 ppb 溶液とした。この溶液を 25 μ l から 5.0 ml 取り、それぞれ 25 ml メスフラスコに入れ、溶離液で定容にして 0.5 ppb から 100 ppb の標準溶液とした。飲料水試料はメンブランフィルターで汙過し、100 ml に対し塩酸を 20 μ l 添加して約 pH 3 にした後、12.5 ml を 25 ml メスフラスコに取り、調製後の試料溶液組成が溶離液と等しくなるように調製した溶液で 2 倍希釈した。これらの試料溶液を、ルーピングインジェクターを用いてカラムに注入し、検出波長を 254 nm に設定して HPLC 測定を行った。

3 結果及び考察

3.1 Al-HQS 錯体の保持挙動に及ぼす溶離液組成の影響

本研究では、Fengらの研究により得られた逆相イオン対 HPLC 系を基本にして最適な溶離液を設計した。Fengらは、アルミニウムイオンと HQS のほかにリン酸イオンやフッ化物イオンが溶液中に共存すると、これら陰イオンと HQS との混合配位子錯体を形成し、クロマトグラムに 2 つ以上のピークが現れることを報告した^{19)~21)}。そこで、本研究では配位能をもたない Bis-Tris を緩衝剤として用いることにした。本実験系においてアルミニウムは、陰イオン性の Al-HQS 錯体として存在するため^{19)~21)}、イオン対試薬としては TBA⁺ を使用した。また、溶離液のイオン強度は NaCl により調整した。Fig. 1 は溶離液を対照として Al-HQS 錯体の吸収スペクトルを測定した結果を示したものであるが、253.6 nm に極大吸収があることが分かる。そこで検出波長は 254 nm に設定した。

3.1.1 Al-HQS 錯体の保持に及ぼす TBABr 濃度の影響

Al-HQS 錯体の保持に及ぼす溶離液中の TBABr 濃度の影響を調べた。Fig. 2 に TBABr 濃度に対する保持時間の依存性を示す。TBABr の濃度が大きくなるに従って Al-HQS 錯体の保持時間は増加した。これは TBABr 濃度が大きいほど ODS カラムへの TBA⁺ の吸着が大きくなるためであ

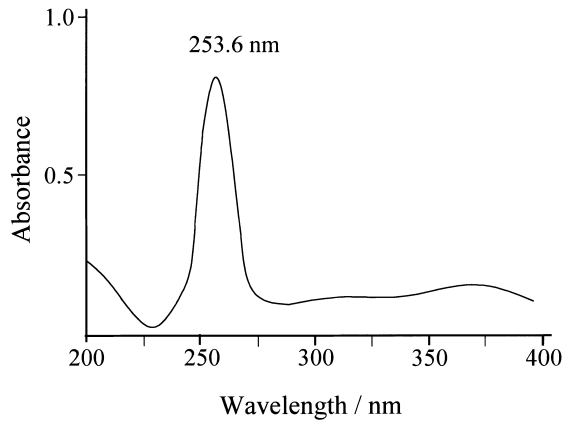


Fig. 1 Absorption spectrum of Al-HQS complex

Reference: 100 mM NaCl, 7 mM TBABr, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 7), 18% (w/v) CH₃CN; Sample: 250 ppb Al standard solution

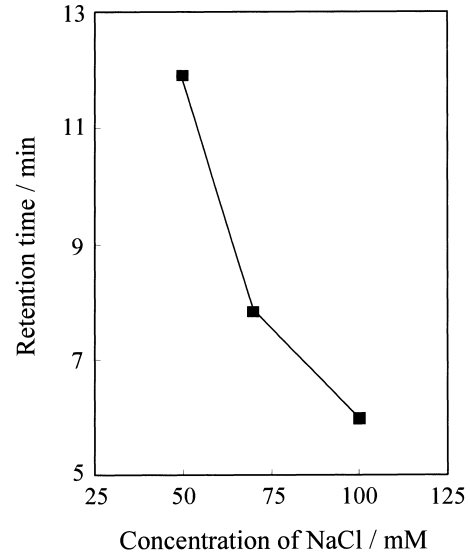


Fig. 3 Effect of concentration of NaCl in the mobile phase on the retention time of Al-HQS complex

Mobile phase: 50 ~ 100 mM NaCl, 7 mM TBABr, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 7), 18% (w/v) CH₃CN; Sample: 10 ppb Al standard solution; Injection volume: 20 μ l

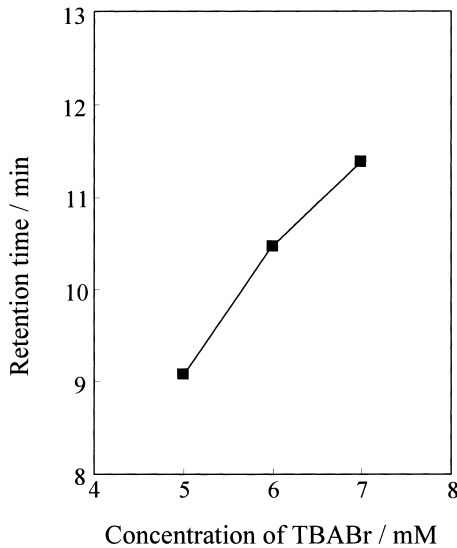


Fig. 2 Effect of concentration of TBABr in the mobile phase on the retention time of Al-HQS complex

Mobile phase: 5 ~ 7 mM TBABr, 100 mM NaCl, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 7), 15% (w/v) CH₃CN; Sample: 10 ppb Al standard solution; Injection volume: 20 μ l

ると考えられる。

3・1・2 Al-HQS 錯体の保持に及ぼす NaCl 濃度の影響
次に, Al-HQS 錯体の保持に及ぼす溶離液中の NaCl 濃度の影響を調べた。Fig. 3 は NaCl 濃度に対する保持時間の依存性を示したものである。NaCl 濃度の増加に伴って Al-HQS 錯体の保持時間は減少した。これは, TBA⁺が吸着した固定相表面において, 塩化物イオンが陰イオン錯体である Al-HQS 錯体と競争的にイオン交換するためであると考えられる。

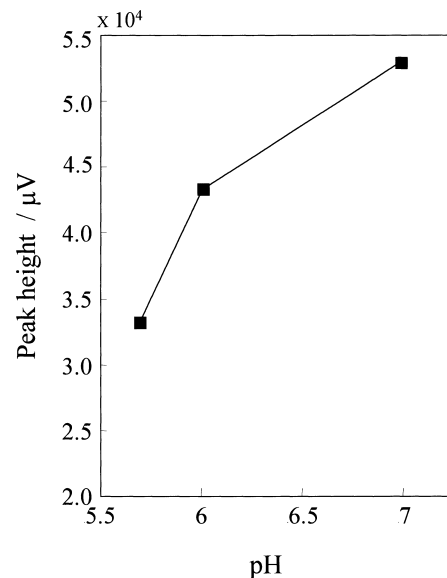


Fig. 4 Effect of pH of the mobile phase on the peak intensity of Al-HQS complex

Mobile phase: 100 mM NaCl, 7 mM TBABr, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 5.7, 6, 7), 15% (w/v) CH₃CN; Sample: 100 ppb Al standard solution; Injection volume: 20 μ l

3・1・3 Al-HQS 錯体のクロマトグラフ挙動に及ぼす溶離液の pH の影響
Al-HQS 錯体のクロマトグラフ挙動に及ぼす pH の影響について検討した。Fig. 4 は Al-HQS 錯体のピーク高さに及ぼす溶離液の pH の影響を示したも

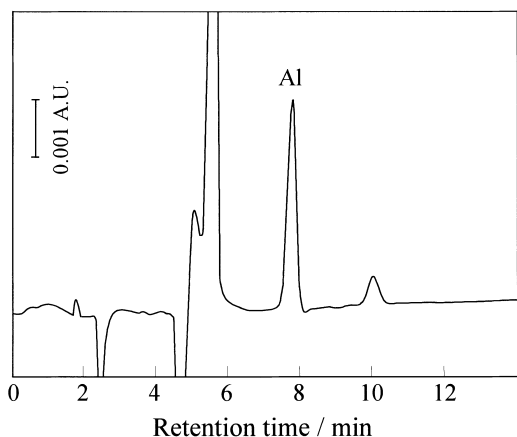


Fig. 5 Chromatogram of Al-HQS complex

Mobile phase: 7 mM TBABr, 70 mM NaCl, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 7), 18% (w/v) CH₃CN; Sample: 10 ppb Al standard solution; Injection volume: 20 μl

のである。試料溶液は溶離液と同一組成の溶液を用いて調製した。Fig. 4から分かるように、pHが低くなるとピーク高さは小さくなっている。保持時間はほとんど変化していないことから、これはpHが低い系ではAl-HQS錯体が不完全であるか、又はカラム内で一部解離するためであると考えられる。そこで、溶離液のpHは7.0とすることにした。

3・1・4 HQS濃度の影響 HQSはそれ自体にUV吸収があるため、UV検出においてはできるだけ溶離液中の濃度を小さくする必要がある。しかし、HQS濃度が小さすぎるとカラム内でAl-HQS錯体が解離してしまう。そこで、アルミニウムの分析に最適な濃度を検討した。溶離液として、0.15～0.3 mM HQSを含む7 mM TBABr, 70 mM NaCl, 10 mM Bis-Tris緩衝溶液 (pH 7.0), 18% (w/v) アセトニトリル-水混合溶媒を使用して実験を行った結果、HQS濃度を0.3 mMより小さくすると錯体のピーク対称性がわるくなり、ピーク面積及び高さに再現性が得られなかった。そこでHQS濃度は0.3 mMに設定することにした。

3・1・5 最適溶離条件の設定 上記の結果に基づいて、分離度、分析時間、ピーク対称性を考慮し、溶離液は7 mM TBABr, 70 mM NaCl, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris緩衝溶液 (pH 7.0)を含む18% (w/v) アセトニトリル-水混合溶媒を用いることとした。この溶離液条件で10 ppbのアルミニウム標準溶液を注入して得られたクロマトグラムをFig. 5に示す。2～6分の間に現れている正又は負の大きなピークはいずれもシステムピークである。これらは、溶離液と試料溶液におけるアセトニトリルやHQSなどの成分濃度がわずかに異なることにより生じるものである。

3・2 検量線の作成

濃度0.5～100 ppbの範囲で8種類のアルミニウム標準溶液を調製し、ピーク高さを用いて検量線を作成した。注入量は100 μlとし、測定は各濃度について3回ずつ行った。この結果、相関係数は0.998、繰り返し測定における相対標準偏差は0.49～1.65%となり、この濃度範囲で良好な直線関係を示すことが分かった。得られた回帰式は以下のとおりである。

$$h = 1456C + 1550.2 \quad (1)$$

ここで、 h はピーク高さ、 C は濃度 (ppb)を示す。式(1)から分かるように、空試験溶液についても1.1 ppbに相当する空試験ピークが現れたが、これはこれまでに報告されている空試験値¹⁶⁾と比較するとかなり低い値である。試料溶液調製からHPLC測定までの実験操作のすべてをクリーンルーム内で行ったことにより、実験室環境からの汚染を最小限に抑制することが可能になったと考えられる。空試験溶液として溶離液と同一組成の溶液を注入して得られたピーク高さの標準偏差 (σ) から検出限界を 3σ 、定量限界を 10σ として算出した結果、それぞれ0.05 ppb及び0.18 ppbと見積もられた。

3・3 飲料水中のアルミニウムの定量

3・3・1 飲料水試料の調製 飲料水試料は、次の2つの方法により調製し、両者を比較した。すなわち、溶離液と同一組成の溶液を飲料水に添加する方法と、溶離液成分を高濃度で含む溶液をあらかじめ調製し、これを試料調製後の溶液濃度が溶離液と等しくなるように飲料水に添加する方法の2つである。ここで、前者の調製法では、試料溶液中のアセトニトリルやHQSなどの試薬の濃度が溶離液中より小さくなることになる。10 ppbアルミニウム標準溶液について測定を行った結果、試料溶液が溶離液濃度と等しくなるように調製すると10 ppbに相当するピークを示すのに対し、前者の方法で調製した試料溶液については16 ppbと見積もられる大きなピークが観測された。そこで溶離液を純水で2倍希釈した溶液を注入してみたところ、アルミニウムの空試験ピークが大きくなることが分かった。この原因については明らかでないが、Al-HQS錯体の溶出位置に現れる空試験ピークはシステムピークであり、試料溶液組成に依存して大きさが変化するためであると推定している。このことから、試料調製の際には調製後の溶液濃度が溶離液濃度と等しくなるようにする必要があることが明らかになった。

3・3・2 定量に及ぼす反応時間の影響 アルミニウムイオンは一般に錯形成反応が遅いことが知られている。そこで、水道水試料について反応時間の影響を調べた。水道

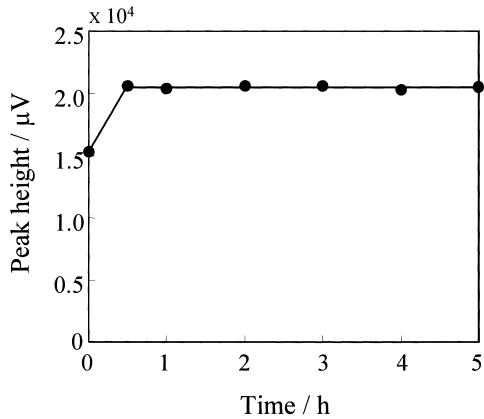


Fig. 6 Time-dependence of Al peak height after the preparation of sample solution

Sample: Tap water; Injection volume: 100 μl

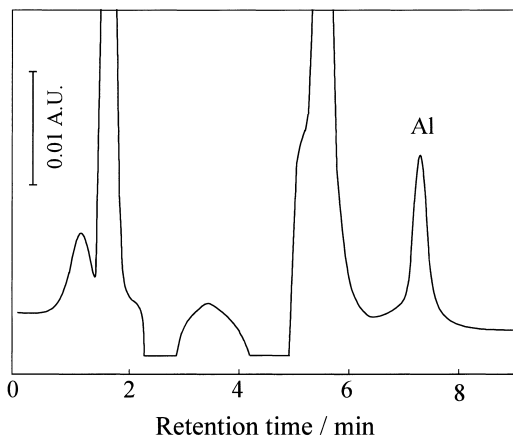


Fig. 7 Chromatogram of a tap water sample

Mobile phase: 7 mM TBABr, 70 mM NaCl, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 7), 18% (w/v) CH_3CN ; Sample: Tap water, sample No.1 shown in Table 1; Injection volume: 100 μl

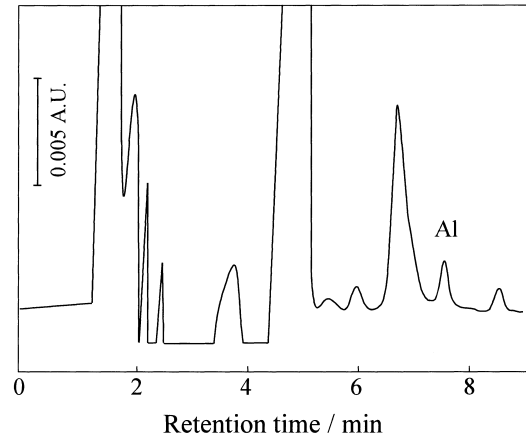


Fig. 8 Chromatogram of a drinking water sample

Mobile phase: 7 mM TBABr, 70 mM NaCl, 0.3 mM HQS, 10 mM Bis-Tris (pH 7), 18% (w/v) CH_3CN ; Sample: Commercial drinking water, sample No.6 shown in Table 1; Injection volume: 100 μl

Table 1 Determination of aluminum in tap and commercial drinking waters

Sample No.	Concentration of Al/ppb	
	Working curve method	Standard addition method
1	19.5	19.7
2	13.2	14.3
3	n.d. ^{a)}	n.d. ^{a)}
4	n.d. ^{a)}	n.d. ^{a)}
5	0.4	0.4
6	0.6	0.6

a) n.d.: not determinable. Samples No.1 and 2 are tap water samples collected into PP bottles in two different cities in Japan. Samples No.3 to 6 are commercial drinking water samples obtained from different companies. Samples No.3 and 4 are made in Japan and are contained in polyethylene terephthalate bottles. Samples No.5 and 6 are made in France and are contained in a glass bottle and an aluminum can, respectively.

水試料溶液を調製し, その直後, 30 分後, 更に 1 時間ごとに 5 時間後まで, 溶液の一部を取って HPLC 分析に供し, ピーク高さの経時変化を調べた. 試料調製後の経過時間と Al-HQS 錯体のピーク高さの関係を Fig. 6 に示す. ピーク高さは, 試料を調製後 30 分以後では一定となっていることが分かる. この結果より, 試料は調製後 30 分以上放置してから測定することとした.

3.3.3 水道水及び市販の飲料水中のアルミニウムの定量 水道水及び市販の飲料水試料について得られたクロマトグラムと定量結果を, それぞれ Fig. 7, 8 及び Table 1 に示す. 絶対検量線法及び標準添加法のいずれによってもよく一致した値が得られた. このことは, はん用の吸光光度検出 HPLC を用いて飲料水中の微量アルミニウムを定量できることを示している.

市販のミネラルウォーター中のアルミニウムの濃度はい

ずれも 1 ppb 以下と低濃度で, 試料 3 と 4 については定量限界以下であった. 試料 5 と 6 は, 同じ商品であるが, 5 はガラス瓶に入ったもの, 6 はアルミ缶に入ったものである. 同じ商品でもガラス瓶よりアルミ缶入りのほうが若干高いアルミニウム含有量を示した. 一方, 水道水中のアルミニウム濃度は約 10 ~ 20 ppb であり, 地域によってアルミニウム含有量にやや違いがあることが明らかになった. 水道水では, 原水の濁りを取り除くために用いられる凝集沈殿剤の残留により, 高いアルミニウム濃度を示したと考えられる.

本研究の遂行に当たり, カラムを提供していただいた東京化成工業(株)に謝意を表します.

(2002年3月, 日本化学会第
81春季年会において一部発表)

文 献

- 1) T. P. Flaten, A. C. Alfrey, J. D. Birchall, J. Savory, R. A. Yokel: *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 527 (1996).
- 2) World Health Organization. Environmental Health Criteria 194. Aluminium. Geneva: WHO (1997).
- 3) T. P. Flaten: *Brain Research Bulletin*, **55**, 187 (2001).
- 4) 山垣浩司, 吉井道直, 近藤峰貴, 坂井 裕: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 75 (1997).
- 5) 四ツ柳隆夫, 星野 仁, 金子恵美子: セラミックス, **25**, 689 (1990).
- 6) P. Jones, L. Ebdon, T. Williams: *Analyst*, **113**, 641 (1988).
- 7) J. G. Alonso, A. L. Garcia, A. Sanzmedel, E. B. Gonzalez: *Anal. Chim. Acta*, **225**, 339 (1989).
- 8) 斎藤 勝, 古谷健二, 井上秀成, 白井恒雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 331 (1989).
- 9) E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, N. Gunji, M. Sato, T. Kikuta, M. Yuasa: *Anal. Chem.*, **63**, 2219 (1991).
- 10) 井上和枝, 善木道雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 805 (1993).
- 11) S. H. Sutheimer, S. E. Cabaniss: *Anal. Chem.*, **67**, 2342 (1995).
- 12) C. Y. Zhou, J. Wu, H. Chi, M. K. Wong, L. L. Koh, Y. C. Wee: *Talanta*, **42**, 415 (1995).
- 13) M. Sato, H. Yoshimura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1996**, 203.
- 14) M. D. Prat, R. Compano, M. Granados, E. Miralles: *J. Chromatogr. A*, **746**, 239 (1996).
- 15) M. Sato, H. Yoshimura, T. Shimmura, H. Obi, S. Hatakeyama, E. Kaneko, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi: *J. Chromatogr. A*, **789**, 361 (1997).
- 16) 佐藤 誠, 松田 淳, 村山晴喜, 辛 龍雲, 金子恵美子, 四ツ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 429 (2000).
- 17) T. Takeuchi, S. Inoue, M. Yamamoto, M. Tsuji, T. Miwa: *J. Chromatogr. A*, **910**, 373 (2001).
- 18) 佐藤 誠, 橋本寛喜, 石川智幸, 松田 淳, 芳村一, 橋本晶夫, 四ツ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 507 (2002).
- 19) Y. Q. Feng, M. Shibukawa, K. Oguma: *Chromatographia*, **41**, 532 (1995).
- 20) Y. Q. Feng, M. Shibukawa, K. Oguma: *J. Chromatogr. Sci.*, **34**, 425 (1996).
- 21) Y. Q. Feng, M. Shibukawa, K. Oguma: *Anal. Sci.*, **13**, 217 (1997).

要 旨

本研究では, 飲料水中に含まれる微量アルミニウムの分離定量法の開発を目的として, 5-スルホ-8キノリノール (HQS) を錯形成試薬として用いた逆相イオン対 HPLC について諸条件の検討を行った。Al-HQS 錯体の保持に及ぼす溶離液組成の影響を調べた結果に基づいて, 分離度, 分析時間, ピーク対称性から溶離液組成を決定した。溶離液には Al-HQS 錯体の分解を抑制するために HQS を 0.3 mM 添加した。検出波長 254 nm, 試料注入量 100 μ l における Al-HQS 錯体の検量線は, 0.5 ppb から 100 ppb の範囲で良好な直線関係を示し, 検出限界は 0.05 ppb であった。操作をすべてクラス 100 のクリーンルームで行ったことで実験室環境からのアルミニウム汚染を最大限に排除し, 非常に高精度なアルミニウムの定量が可能となった。また, 水道水及び市販のミネラルウォーター中のアルミニウムの定量を行ったところ, 絶対検量線法及び標準添加法いずれによってもほぼ一致した値が得られ, 本法を用いることにより飲料水中のアルミニウムの定量が可能であることが明らかになった。