

Simultaneous determination of orthophosphate and pyrophosphate based on heteropoly blues by means of absorption spectrophotometry.

Kousaburo OHASHI, Hiroyuki NAKAZAWA, Toshie ENOMOTO and Katumi YAMAMOTO (Department of Chemistry, Faculty of Science, Ibaraki University, 2-1-1, Bunkyo, Mito-shi, Ibaraki)

The formation of heteropoly blue from pyrophosphate and the simultaneous determinations of orthophosphate and pyrophosphate were studied spectrophotometrically. The maximum and constant color development was obtained in the perchloric acid concentration range from 0.36 M to 0.40 M with 1.74×10^{-3} M Mo(V) and 3.84×10^{-3} M Mo(VI) by heating the solution for 30 min at 80 °C. The color development obeyed Beer's law in the pyrophosphate concentration range from 2.00×10^{-6} M to 2.80×10^{-5} M. The molar extinction coefficient at 825 nm was calculated to be $2.82 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The absorption spectrum of heteropoly blue from pyrophosphate was fairly different from that of orthophosphate, so that separatory determination could be achieved. The procedure for the simultaneous determination of orthophosphate and pyrophosphate is as follows: The solution containing

orthophosphate and pyrophosphate was heated with the mixture of 1.74×10^{-3} M Mo(V) and 3.84×10^{-3} M Mo(VI) in 0.40 M HClO_4 at 80 °C for 30 min. The absorbances were measured at 700 nm and 750 nm. Orthophosphate and pyrophosphate were determined using the known molar extinction coefficients of heteropoly blues from orthophosphate and pyrophosphate at 700 nm and 750 nm. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ of $(4.00 \times 10^{-6} \sim 2.40 \times 10^{-5})$ M and PO_4^{3-} of $(4.00 \times 10^{-6} \sim 2.40 \times 10^{-5})$ M could be determined within 6 % relative error. Below 0.36 M HClO_4 the solubility of heteropoly blue from pyrophosphate was very small and heteropoly blue precipitated quantitatively at 0.28 M HClO_4 for standing at 0 °C for 60 min. Based on this phenomenon the method for the determination of orthophosphate in the presence of pyrophosphate is also described.

(Received June 25, 1981)

Keyword phrases

spectrophotometric simultaneous determinations of orthophosphate and pyrophosphate by heteropoly blue formation.

銅(II) の錯滴定における指示薬としての 2-ピリジナルデヒド-2'-ヒドロキシナフチルアミン

飯盛 和代*, 飯盛 喜代春®, 山崎 数恵**

(1981 年 5 月 11 日受理)

2-ピリジナルデヒド-2'-ヒドロキシナフチルアミン (以下 PHN と略記) は銅(II) の吸光光度定量試薬として用いられるが, これが銅(II) の滴定指示薬としても用いられることを検討した. まず, PHN の酸解離定数を求め, $\text{p}K_1$, $\text{p}K_2$ はそれぞれ, 3.75, 8.25 であった. 又, 銅(II) の過剰における PHN 銅錯体の生成定数 $K=5.0 \times 10^9$ が得られた. EDTA により銅(II) をキレート滴定するとき, PHN を指示薬とした場合, 当量点付近の変色は赤とう色から淡青色になった点である. これを光度滴定によって確かめ, 実験値はよく一致した. 又, 既に銅(II) 滴定の指示薬として用いられているピリジルアゾナフトール (PAN と略記), チアゾリルアゾナフトール (以下 TAN と略記), チアゾリルアゾレスルシン (以下 TAR と略記) 試薬と比較し満足な結果が得られた.

1 緒 言

PHN が銅(II) の吸光光度定量試薬として用いられることは既に報告¹⁾した. PHN の含水アルコール溶液は

淡黄色であるが, 銅(II) と反応して赤とう色水溶性の錯体を生成する. この錯体の水溶液に EDTA の水溶液を加えると直ちに脱色し, 淡青色になることから PHN が銅(II) を EDTA で滴定するときの金属指示薬として用いられることに着目し検討を加えた. 当量点における変色を検討するに当たり, PHN の酸解離定数, PHN 銅

* 佐賀短期大学: 佐賀県佐賀市神園 3-8-1

** 佐賀大学理工学部: 佐賀県佐賀市本庄町 1

錯体の生成定数を測定した。又、既に銅(II)のEDTAによるキレート滴定の金属指示薬として用いられているPAN²⁾, TAN³⁾, TAR⁴⁾などと比較検討し、満足な結果が得られた。

2 実 験

2.1 試 薬

2.1.1 PHN 既報¹⁾に従って合成し、使用に当たっては 8.1×10^{-5} mol/l アルコール溶液とした。

2.1.2 銅及びその他の金属の標準溶液 銅については純銅の約 0.6 g を精ひょうし、少量の濃硝酸に溶解し、水で 1 l にする。又、他の金属については、それぞれの硝酸塩(特級試薬)を水に溶解し、標準 EDTA 溶液で標定した。溶液の濃度は金属イオンについてすべて 6.25×10^{-2} mol/l に調製した。

2.1.3 緩衝溶液 pH 1~7 までは 0.1 M 酢酸ナトリウムと 1 M 過塩素酸, pH 5~9 までは 0.5 M ホウ砂溶液と 0.1 M 塩酸, pH 10~12 については 0.05 M ホウ砂溶液と 0.1 M 水酸化ナトリウムをそれぞれ混合し調製した。又、滴定時には上記の外に酢酸と酢酸ナトリウムの混合溶液を用いた。

2.2 装 置

吸光度の測定は日立製分光光度計 139 型, pH の測定は日立-堀場製ガラス電極 pH メーター M5 型をそれぞれ使用した。

2.3 定量操作

銅(II)として (0.5~20) mg/20 ml を含む溶液に緩衝溶液 3 ml を加え pH 4~5 とし, PHN 指示薬 (0.5% アルコール溶液とする) (2~4) 滴加えると直ちに赤とう色になる。これを 0.01 M EDTA 標準溶液で滴定する。終点における変色は赤とう色が退色しほとんど無色となり、淡青色になった点で明りょうである。

3 PHN 試薬の酸解離定数の測定

PHN の 8.1×10^{-5} mol/l のアルコール水溶液(アルコールとして 2% 溶液)の pH の変化に伴う吸収曲線を Fig. 1 に示した。

pH 1.20 より酸性側では曲線 A とほとんど同じで溶液の色は無色である。pH がしだいに高くなり、pH 6.88 までは吸収が増加するとともに吸収極大が長波長にずれ、曲線 B に示すようになる。pH がこれより更に高くなると吸収が減少し、pH 9.74 で曲線 C のようになり、これよりアルカリ側では吸収曲線は C と同じようになる。これらのことから、PHN を H_2R^+ で表すならば、PHN はこの溶液の中で pH の変化に伴い式 (1) 及び式 (2) のように解離し、二塩基酸として行動してい

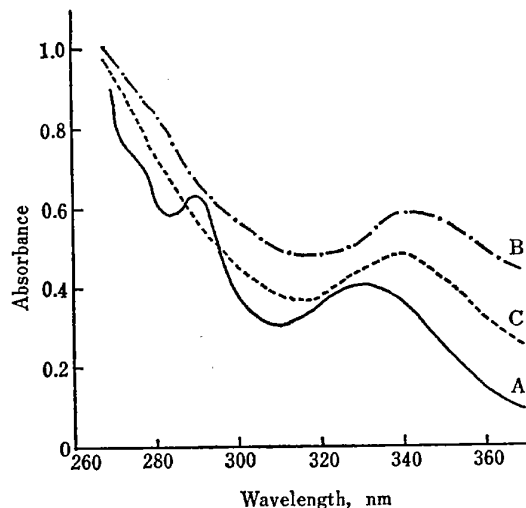
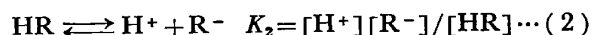
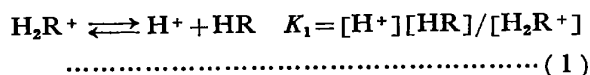


Fig. 1 Absorption spectra of PHN

A: pH 1.20; B: pH 6.88; C: pH 9.74; [PHN]: 8.1×10^{-5} ; Temp.: 25°C; Ionic strength: 0.1; Reference: Reagent blank

ると考えられる。



ここで K_1 , K_2 はそれぞれ第 1 及び第 2 の解離定数を表す。Fig. 1 における曲線 A と B 及び曲線 B と C の間にある吸収曲線はそれぞれ H_2R^+ と HR 及び HR と R^- が混合している場合を示す。ある波長におけるこれらの混合溶液の吸光度をそれぞれ A_1 及び A_2 とする。又、曲線 A, B, C はそれぞれ PHN が完全に H_2R^+ , HR , R^- になったときの吸収曲線であり、同一波長におけるこれらの吸光度をそれぞれ A_{H_2R} , A_{HR} , A_R とすると式 (3), 式 (4) が得られる。

$$pH = pK_1 + \log [HR]/[H_2R^+] \\ = pK_1 + \log (A_1 - A_{H_2R}) / (A_{HR} - A_1) \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$pH = pK_2 + \log [R^-]/[HR] \\ = pK_2 + \log (A_2 - A_{HR}) / (A_R - A_2) \quad \dots\dots\dots (4)$$

PHN 溶液を一定量採取し、緩衝溶液を加えて pH を調節し水を加えて一定容積にする。その一部について、340 nm における吸光度を、他の部分については pH をそれぞれ測定し、Fig. 2 に示す直線が得られた。

Fig. 2 から、直線のこう配は 1 であり、この直線と縦軸 0 との交点から求めた pK_1 , pK_2 はそれぞれ 3.75, 8.25 であった。

4 銅(II)と PHN 錯体の生成定数の測定

銅(II)と PHN との混合溶液の pH 1~10 における

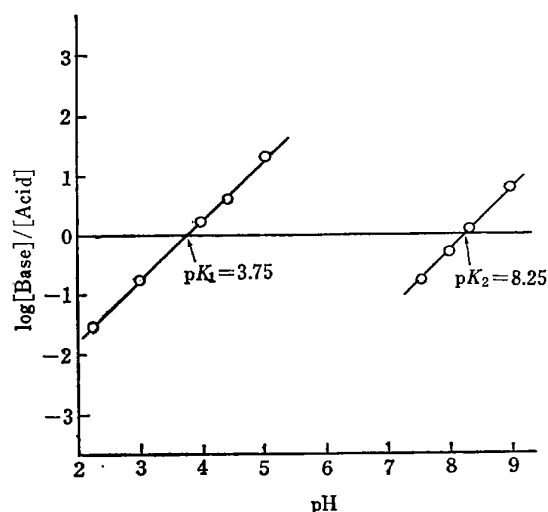
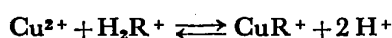


Fig. 2 pH-log[Base]/[Acid] plot for determining acid dissociation constants of PHN

A: pK_1 curve, slope=1.0; B: pK_2 curve, slope=1.0

種々の pH に対する吸収曲線を求め、これより錯体生成の状態を検討した。pH 1.25 以下では 490 nm 付近に吸収の極大がみられず、錯体は生成していないと思われるが、pH 3.60~7.00 の範囲では吸収曲線はほとんど変化しない。490 nm に吸収の極大があり、錯体が生成していると思われる。又、pH 10 では吸収曲線の吸収極大はなくなる。以上のことから、pH 3.60 以下では錯体生成は不完全であり、又、pH 7.00 以上のアルカリ側では銅(II) 水酸化物の沈殿の可能性もあり、PHN の分解も考えられるので錯体が生成しにくいと思われる。PHN に対して銅(II) が過剰に存在するような条件では、生成する錯体はただ 1 種類と考えられる。既報¹⁾ から錯体の組成比は銅(II): PHN=1:1 であることが分かっており、次のような平衡が成立すると思われる。



$$K' = [\text{CuR}^+][\text{H}^+]^2 / [\text{Cu}^{2+}][\text{H}_2\text{R}^+] \quad \dots\dots (5)$$

ここで K' は平衡定数である。ここで式 (5) の対数をとれば

$$pK' = -\log[\text{CuR}^+]/[\text{H}_2\text{R}^+] + 2\text{pH} + \log[\text{Cu}^{2+}] \quad \dots\dots (6)$$

式 (6) が得られる。混合溶液の 490 nm における吸光度を A_s^{490} とし、加えた PHN 試薬が完全に銅(II) と錯体を生成したときの吸光度を A_0^{490} とすると、この波長では銅錯体のみが吸収を持つので式 (7) が得られる。

$$\log[\text{CuR}^+]/[\text{H}_2\text{R}^+] = \log A_s^{490} / (A_0^{490} - A_s^{490}) \quad \dots\dots (7)$$

式 (6)、式 (7) より式 (8) が得られる。

$$pK' = -\log A_s^{490} / (A_0^{490} - A_s^{490}) + 2\text{pH} + \log[\text{Cu}^{2+}] \quad \dots\dots (8)$$

ここにおいて pH と $\log[\text{CuR}^+]/[\text{H}_2\text{R}^+]$ の関係を Fig. 3 に示す。

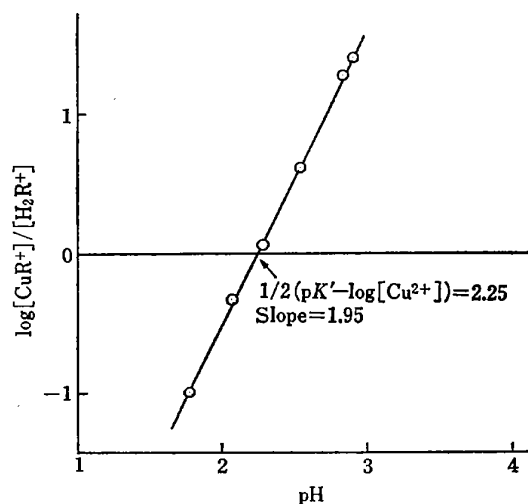


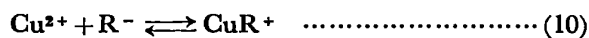
Fig. 3 pH-log[Cu-complex]/[PHN] for determining pK' of copper complex

Ionic strength: 0.1

Fig. 4 の直線のこう配はほぼ 2 であった。このことは式 (5) の平衡が成立していること、錯体の組成比が銅(II): PHN=1:1 であることを示す。この直線と縦軸の 0 を示す直線との交点から

$$1/2(pK' - \log[\text{Cu}^{2+}]) = 2.25 \quad \dots\dots (9)$$

が得られる。式 (10) で示される反応の平衡定数を K とすれば式 (11) が得られる。



$$K = [\text{CuR}^+]/[\text{Cu}^{2+}][\text{R}^-] = K'/K_1K_2 \quad \dots\dots (11)$$

式 (9)、式 (11) より $K = 5.0 \times 10^9$ が算出された。ここで K は銅錯体の生成定数である。

5 PHN を指示薬とする銅(II) の錯滴定法

5.1 原理

pH<1 では銅(II)-EDTA 錯体の見掛けの安定度定数が小さくなり、又、銅(II)-PHN 錯体もほとんど生成されず着色しないし、PHN 自身も分解する可能性もある。従って、銅(II)の EDTA 滴定は銅(II)-PHN 錯体の赤とう色が最も濃い pH 4~5 で行うのが適当である。銅(II)-PHN 錯体及び銅(II)-EDTA 錯体の pH 4 における見掛けの安定度定数⁹⁾ はそれぞれ 1.8×10^5 、

2.3×10^{10} と算出された。これらの値を用いて pH 4 における滴定率 a と PHN の変色率 ϕ との関係を和田ら⁶⁾の方法に従って求め Fig. 4 に示した。

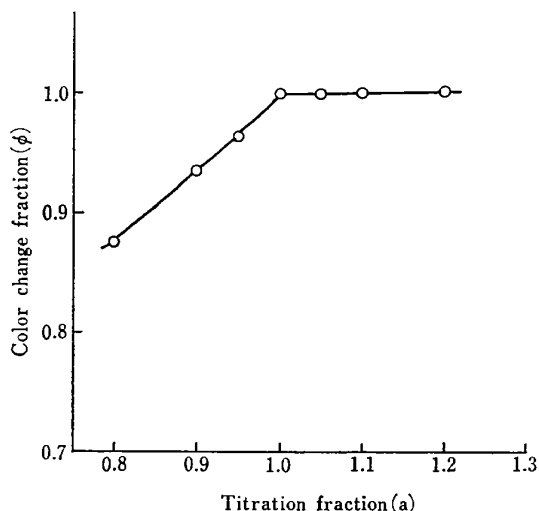


Fig. 4 Color change in titration of copper with EDTA using PHN indicator at pH 4.0

終点における変色は肉眼によっても明りょうに判別できる。赤とう色からほとんど無色になり更に淡青色になったところを終点とする。実際に滴定した結果を Table 1 に示した。

Table 1 から分かるように、銅の量が少ないときは誤差も大きく精度も余りよくないが、EDTA の濃度を 0.001 M にすると滴定が可能になる。銅の量が多くなると良い結果が得られる。全体的にみて正の誤差を与える傾向がみられる。

Table 1 Results of visual titration

EDTA (titrant)		Cu(II)		Error (mg)	Standard deviation
Concentration (M)	Volume (ml)	Taken (mg)	Found (mg)		
0.01	1.18	1.02	1.15	+0.13	0.027
0.01	3.35	2.03	2.13	+0.10	0.012
0.01	4.80	3.05	3.05	0.00	0.027
0.01	8.03	5.09	5.10	+0.01	0.020
0.01	16.06	10.17	10.20	+0.03	0.019
0.01	31.88	20.34	20.25	-0.09	0.038
0.001	1.65	0.102	0.105	+0.003	0.028
0.001	3.30	0.203	0.210	+0.007	0.028
0.001	4.93	0.305	0.313	+0.008	0.030
0.001	7.78	0.508	0.494	-0.014	0.031
0.001	16.15	1.020	1.026	+0.006	0.035
0.001	33.10	2.034	2.103	+0.069	0.039

5.2 肉眼による滴定条件の検討

5.2.1 時間による影響 試薬と銅(II)の反応は極めて速く、既報¹⁾のように銅(II)に試薬を加えると直ちに発色(最大発色時の約 90%)する。従って滴定指示薬としては十分である。これに EDTA を加えると直ちに退色し、終点における変色もみやすい。

5.2.2 温度による影響 既報¹⁾のように発色状態は温度の変化に対しほとんど影響を受けなかった。常温から 80°C で滴定終点における変色に影響はなく、滴定値も一定であった。

5.2.3 PHN の添加量による影響 銅(II)の試料溶液に加える PHN の量は 0.5% アルコール溶液(4~5)滴(PHN の濃度 4×10^{-5} mol/l)でよく、これより少ないときは変色が見にくく、多すぎると PHN の黄色で見にくくなる。

5.3 光度滴定法

銅(II)の一定量を取り、緩衝溶液を加えて pH 4~5 に調節し、PHN を数滴加えて 0.01 M EDTA 標準溶液で滴定する。滴定剤を滴下した後、反応溶液に水を加えて一定量とし、それぞれ 490 nm における吸光度を測定し、Fig. 5 のような滴定曲線が得られた。終点付近ではよく直線となり、2本の直線の交点は当量点と一致した。なお、直線 B は 700 nm における吸光度で、銅-EDTA 錯体を示すもので、EDTA の滴下とともに徐々に増加していることが分かる。

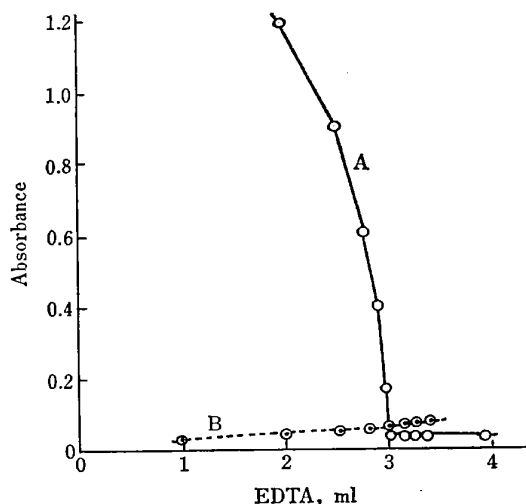


Fig. 5 Photometric titration curve

Copper: 1.91 mg in 25 ml; EDTA: 0.01 M; A: Absorbance at 482 nm; B: Absorbance at 700 nm; Calculated volume: 3.01 ml

Table 2 Comparison of some indicators used in titration of Cu(II) with 0.01 M EDTA

Cu(II) taken (mg)	Indicator							
	PHN		PAN		TAN		TAR	
	Cu(II) found (mg)	Standard deviation	Cu(II) found (mg)	Standard deviation	Cu(II) found (mg)	Standard deviation	Cu(II) found (mg)	Standard deviation
1.02	1.08	0.021	1.01	0.015	1.02	0.013	1.02	0.016
2.04	2.10	0.017	2.09	0.018	2.05	0.016	2.03	0.010
3.06	3.09	0.014	3.20	0.023	3.05	0.011	3.05	0.007
5.10	5.14	0.018	5.14	0.042	5.10	0.013	5.09	0.014
10.2	10.3	0.021	10.2	0.028	10.2	0.014	10.2	0.010
20.4	20.4	0.032	20.7	0.031	20.4	0.024	20.4	0.030

6 従来の指示薬との比較

EDTA による銅(II) のキレート滴定において, 従来から用いられている PAN, TAN, TAR と PHN の各指示薬を用いてそれぞれ銅(II) を滴定し, Table 2 の結果が得られた.

Table 2 から分かるように, 4 種類の指示薬ともにほとんど同じような値が得られ, PHN も銅(II) の滴定指示薬として十分利用できることが分かった. 全体として PHN を用いた場合はやや TAN, TAR と比べて正の誤差を与える傾向があり, TAN や TAR と比べて色調の変化は大きくないが, 終点は明りょうで容易に判定できる.

7 共存イオンの影響

PHN と反応して発色する ニッケル, コバルト, 鉄(III) などの各イオンは銅の吸光光度定量において銅の量の (2~3) 倍共存していても妨害しないことを報告¹⁾した. しかし, PHN を銅の指示薬として用いる場合, これらイオンが銅の滴定に及ぼす影響について検討し, その結果は Table 3 に示すようになった.

Table 3 から分かるように, 正の誤差を与えるのは共存イオンが一部 EDTA を消費するためと思われる, これ

らイオンの妨害は大きい, 終点の変色は銅(II) のみの場合と同じである. 鉄(III) の影響が最も大きく, 銅の約 1/50 (モル比) 以上共存すれば妨害する. 比較的影響が少ないのはコバルト, ニッケルである. 現在銅のキレート滴定指示薬として用いられている MX, PAN も本指示薬 PHN と同じように上記イオンの妨害は大きい. Table 3 に示した値から, 上記イオンが多量共存する場合はあらかじめ除去するか, マスキングする必要がある.

(1977 年 10 月, 日本分析化学)
(会第 26 年会において講演)

文 献

- 1) 飯盛和代, 飯盛喜代春, 森 幸子: 分化, **24**, 414 (1975).
- 2) K. L. Cheng: *Anal. Chem.*, **30**, 243 (1958).
- 3) 金庭延慶: 金沢大学薬学部年報, **9**, 27 (1959).
和田弘子, 中川元吉: 分化, **14**, 28 (1965).
- 4) 中川元吉, 和田弘子: 日化, **85**, 202 (1964).
和田弘子, 中川元吉: 分化, **14**, 28 (1965).
- 5) 和田弘子, 中川元吉: 日化, **85**, 549 (1964).
- 6) G. Schwarzenbach: "*Die Komplextometrische Titration*", (1956); 吉野論吉, 藤本昌利, 水町邦彦, 佐藤 弦訳: "コンプレクソン滴定", p. 8 (1958), (共立出版).

☆

2-Pyridinealdehyde-2'-hydroxynaphthylamine as an indicator in complexometric titration of copper(II). Kazuyo ISAGAI*, Kiyoharu ISAGAI and Kazue YAMASAKI** (*Saga Junior College, 1-8-3, Kamizono, Saga-shi, Saga; **Faculty of Science and Engineering, Saga University, 1, Honjo-machi, Saga-shi, Saga)

2-Pyridinealdehyde-2'-hydroxynaphthylamine(PHN) which is hardly soluble in water but soluble in alcohol has been used for the spectrophotometric determination of copper(II). Since PHN forms water soluble, red-dish-orange complex with copper(II) and the color of this copper complex diminishes by addition of EDTA solution, use of PHN as an indicator for the titration of copper(II) with EDTA solution is proposed. At first, the acid dissociation constants of PHN were determined at 25 °C, $\mu=0.1$, and pK_1 and pK_2 were

Table 3 Effect of diverse ions

Ion	Added diverse ions		Cu		Error (mg)
	Taken (mg)	[Ion]/[Cu] molar ratio	Taken (mg)	Found (mg)	
Fe(III)	0.10	0.023	5.10	5.12	+0.02
Fe(III)	0.20	0.045	5.10	5.60	+0.50
Ni(II)	0.09	0.064	5.10	5.11	+0.01
Ni(II)	0.18	0.13	5.10	5.35	+0.25
Co(II)	0.38	0.08	5.10	5.08	-0.02
Co(II)	0.76	0.16	5.10	5.40	+0.30
Cd(II)	0.31	0.035	5.10	5.12	+0.02
Cd(II)	0.62	0.070	5.10	5.32	+0.22
Zn(II)	0.10	0.020	5.10	5.11	+0.01
Zn(II)	0.20	0.040	5.10	5.30	+0.20

obtained to be 3.75 and 8.25, respectively. Also the formation constant of the copper complex was estimated as 5.0×10^9 . Therefore, PHN can be used as an indicator in the pH range 3.5~4.5. The color at the end point in titration turns from reddish-orange to light blue and the equivalence point was indicated sharply. PHN may be used as an indicator like as the familiar reagents such as 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN), 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol (TAN) and 4-(2-thiazolylazo)-resorcinol (TAR). The conditional formation constants of copper PHN complex and copper EDTA complex at pH 4 were evaluated as 1.8×10^8 and 2.3×10^{10} , respectively. Using these values, the relationship between the ratio of metal titrated and the change

in color was obtained. The result shows that color change is visually sharp at the end point when 2 to 4 drops of 0.5 % PHN solution in alcohol are added to the sample solution. The order of interference by diverse ions is iron > zinc > cadmium > nickel > cobalt.

(Received May 11, 1981)

Keyword phrases

indicator as complexometric titration of copper(II); dissociation constant of 2-pyridinealdehyde-2'-hydroxynaphthylamine; formation constant of 2-pyridinealdehyde-2'-hydroxynaphthylamine copper complex.

Jendrassik-Cleghorn 法による患者血清中の ビリルビン濃度測定の基礎的検討

真 鍋 幸 男*

(1981 年 7 月 1 日受理)

従来の血清ビリルビンの分画定量法で不明な点は、(1) 総ビリルビンとして反応させたときの、抱合型ビリルビンに対する促進剤の効果、(2) 抱合型ビリルビンとして反応させたときの、遊離型ビリルビンへの影響、(3) 抱合型、遊離型両者のアゾ色素の濃度と吸光度の関係などであった。

今回、自製の抱合型ビリルビンと市販の遊離型ビリルビンを用いて検討した結果、これらの不明な点が解明され Jendrassik-Cleghorn 法を一部改めて使用することにより、精度よく測定することができるようになった。

1 緒 言

外観は同じような黄だんの患者でも、例えば閉そく性の場合にはグルクロン酸抱合型の、溶血性の場合には遊離型のビリルビン濃度が血中で増加するので、臨床化学検査では血清中のビリルビンは、遊離型と抱合型に分けて定量されている。定量にはビリルビンに芳香族ジアゾニウム塩をカップリングさせる比色法が広く用いられており、遊離型ビリルビンは疎水性のために、いわゆる促進剤を加えないと反応を起こさないが、抱合型ビリルビンは水溶性で促進剤の有無にかかわらず反応するので、促進剤を加えて総ビリルビンを、加えないで抱合型ビリルビンを定量して、その差を遊離型ビリルビンとしている。

しかし、遊離型ビリルビンは純品が市販されているのに対して、抱合型ビリルビンはその精製が困難なために現在入手できない。従って現状では抱合型については、その標準液がないままに測定が行われており、その濃度は遊離型ビリルビンの標準液の濃度と吸光度の関係をそのまま準用している。著者はこの現状について再検討したいと考えて、まずブタ胆のう胆じゅうを原料として、平均純度 90 % で遊離型を含まないビリルビンジグルクロニドを精製した¹⁾。

今回はこの精製したビリルビンジグルクロニドと市販の遊離型ビリルビンを用いて、日常の臨床化学検査法として広く用いられている定量法の一つである Jendrassik-Cleghorn 法²⁾を用いて検討し、その操作法を改良して正確な定量法を開発することができたので報告する。

* 東京通信病院第二臨床検査科：東京都千代田区富士見 2-14-23