

ヒドロキシナフトールブルーを用いたフローインジェクション 分析によるカルシウムの定量

内田 和秀[®], 友田 正子, 斎藤 眞一*

(1985年3月27日受理)

発色剤にヒドロキシナフトールブルー (HNB) を用い、フローインジェクション分析 (FIA) を導入した吸光光度法による、マグネシウムのマスキング剤を使用しないカルシウムの迅速、簡便な定量法を開発した。HNB 溶液 ($9.6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$)、水酸化カリウム溶液 (0.6 mol dm^{-3}) はそれぞれポンプで送液され、合流後混合コイル中で混合される。試料 (50 mm^3) はこの混合試薬溶液に注入され、反応コイル中を流れて行く過程で発色反応が進行し、 455 nm の吸光度変化が測定記録される。本法によれば $1.2 \sim 3.9 \text{ mg dm}^{-3}$ の範囲で検量線は直線を示し、試料処理能力は約 40 試料/時間、相対標準偏差は 1.12% ($n=15$) で繰り返し精度は良好であり操作は極めて簡単である。

1 緒 言

血清中、食品中、水道水及び天然水中のカルシウムの定量はいずれの場合も、単位時間当たり多くの試料数を処理しなければならない。日本工業規格 (JIS) に定めるカルシウム定量法¹⁾²⁾は NN 指示薬³⁾⁴⁾を用いる EDTA 滴定法及び原子吸光法である。滴定法は試料処理能力が低く、原子吸光法は燃料ガスの取り扱いが多少めんどうである⁵⁾。高い試料処理能力が必要とされている臨床分析の分野で広く用いられているオートアナライザー (吸光光度法) にも幾つかの問題点が指摘されている⁶⁾。フローインジェクション分析 (FIA) では一般に操作の簡易化、分析の迅速化及び測定者間誤差がないことが特長である。又反応生成物が不安定な反応でも時間というファクターを流量及び流路により制御でき応用可能である⁷⁾。

オートアナライザーで広く使用されている *o*-クレゾールフタレインコンプレキソン (*o*-CPC)^{8)~10)}は、カルシウムに対する優れた発色剤であり、FIA に用いた報告^{11)~13)}もあるがマグネシウムの妨害に対して、8-キノリノールなどのマスキング剤を使用しなければならない。又使用 pH 範囲が比較的狭く、緩衝液の使用が必要であることが指摘されている¹⁴⁾。外に間接定量法において亜鉛-グリコールエーテルジアミンテトラ酢酸を用い

た報告があるが、pH を正確に制御する必要があり、亜鉛の妨害に対しては前処理をしなければならない¹⁵⁾。

本研究では NN よりも優れているとの報告¹⁶⁾があり、又生体試料¹⁷⁾¹⁸⁾、薬剤中¹⁹⁾のカルシウム定量に広く用いられているヒドロキシナフトールブルー (HNB)²⁾²⁰⁾ を発色剤に用いた。HNB は NN と同様にジヒドロキシアゾ色素群に属する指示薬で、高 pH で使用可能であるので、妨害金属のマグネシウムは水酸化マグネシウムを生成し、カルシウム-HNB キレート生成を妨害しない。また *o*-CPC に比較して広い pH 領域で使用することが可能である。更に試料の pH が HNB の使用領域外でも、FIA では試料が試薬によって希釈された状態で反応するので緩衝液を必要としない。HNB を発色剤に用いた FIA システムを導入した吸光光度法によるカルシウムの迅速、簡便な直接定量法を開発したので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

金属標準液：カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、ニッケル、亜鉛、カドミウム、ストロンチウム、バリウム、鉄、マンガン及び銅標準液 (1000 mg dm^{-3}) は和光純薬工業製原子吸光分析用標準液を蒸留水で適当に希釈して用いた。

HNB 溶液 ($2.4 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$)：同仁化学研究所製 HNB 0.745 g を蒸留水に溶解し、全容を蒸留水で 500 cm^3 とした。

グリセリン溶液 (50 v/v%)：和光純薬工業製特級グリセリン 500 cm^3 を蒸留水で希釈し、全容を 1000 cm^3 と

* 上智大学理工学部一般科学研究室：102 東京都千代田区紀尾井町 7-1

した後褐色瓶に移し保存した。グリセリンは酸化防止剤として以下の各溶液に添加した。

水酸化カリウム溶液 (0.6 mol dm^{-3}): 和光純薬工業製特級水酸化カリウム 39.6 g を蒸留水に溶解し, $50 \text{ v/v} \%$ グリセリン溶液を 40 cm^3 加え, 全容を蒸留水で 1000 cm^3 とした。

分析に際しては上述の HNB 溶液 40 cm^3 及び $50 \text{ v/v} \%$ グリセリン溶液 40 cm^3 を混合し, 全容を蒸留水で 1000 cm^3 としたものを使用直前に調製して $9.6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ HNB 溶液とした。

2.2 装 置

ポンプ: Gilson 社製 Minipuls-2 型ペリスタ式ポンプを用いた。ポンプチューブは専用の塩化ビニル製のものを使用した。

サンプルインジェクター: 応用分光製六方バルブブルー式インジェクター (容量 50 mm^3) を用いた。

分光光度計: 日本分光製 UVDEC-340 型分光光度計に FIC-361 型フローセル (光路長 10 mm , 容量 20 mm^3) を取り付けて使用した。

記録計: 理研電子製 SP-G12 型記録計を使用した。

2.3 実験方法

種々の検討結果をもとに組み立てた FIA システムのフローダイアグラムを Fig. 1 に示す。ポンプチューブ以外のチューブ及びコネクタはすべてテフロン製のものを用いた。流量は操作ごとにポンプを微調整し, 吸入量を各流路別に測定して正確に決めた。試料はサンプルインジェクター (S) に樹脂製注射筒 10 cm^3 を用い, コンタミネーションを避けるため約 3 cm^3 を注入した (2 cm^3 に試料を減らしてもピーク高さに影響はなかった)。ポンプ (P) により送液された試薬溶液 (B) 及び (R) は混合コイル (M_1) 中で混合され, 注入された試料と反応コイル (M_2) 中で発色反応が進行する。反応生成物は連続的な溶液の流れにより分光光度計のフローセルを通過し, 455 nm における吸光度変化が測定記録

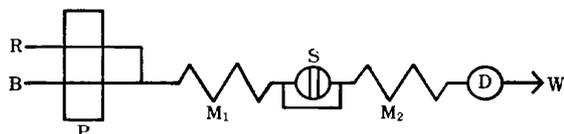


Fig. 1 Flow diagram for the determination of calcium

The optimum conditions were R: HNB ($9.6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$); B: KOH (0.6 mol dm^{-3}); M_1 : mixing coil (1.0 mm i. d. , 8 m long); S: sample injector (sample volume, 50 mm^3); M_2 : reaction coil (1.0 mm i. d. , $1.5 \text{ m long plus } 0.5 \text{ mm i. d.}$, 0.9 m long); D: detector (spectrophotometer, wavelength 455 nm); W: waste; P: pump. Flow rate (R and B): $1.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

される。記録されたピーク高さを吸光度に換算し, あらかじめ求めておいた検量線を用い, カルシウム濃度を決定した。天然水は孔径 $20 \sim 30 \mu\text{m}$ のガラスフィルターにより濾過した後, 水道水は直接蒸留水で 10 倍に希釈し測定試料とした。試料濃度が高く検量線の直線範囲を越える場合は希釈倍率を上げた。

3 結果及び考察

3.1 HNB の酸化分解

本研究を行うに当たり, 単一流路の FIA システムを使用し, あらかじめ調製した HNB-水酸化カリウム混合溶液を流して測定するとベースラインが徐々に吸光度の減少する方向へずれていき, 測定ピークに悪影響を及ぼし, 定量に負の誤差を与えた²¹⁾。これは HNB の酸化による退色と考えられる。一般にアゾ化合物は酸化によりアゾキニ化合物 (黄色) になることが知られている²²⁾。青色を示していた廃液は 1 日たつと黄色になった。

本研究では HNB の退色による誤差が定量に影響を及ぼさないように, Fig. 1 に示した FIA システムを用いた。水酸化カリウム溶液と HNB 溶液を別々の流路に流し, 合流点から検出器に至る時間を流量で規定することにより, HNB の分解率を一定にすることが可能である。

3.2 HNB 溶液の濃度

HNB 溶液の濃度は直接検量線の直線範囲に影響を及ぼすことが予想される。単一流路の FIA システムにおいて, $2.4 \sim 7.2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ で HNB 溶液の濃度を変化させ直線性を検討した結果, $2.4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ では傾きが低く直線領域も $0.4 \sim 1.2 \text{ mg dm}^{-3}$ と狭かった。 $4.8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ では傾きも増加し, 直線領域は $0.1 \sim 2.6 \text{ mg dm}^{-3}$ と広がった。 $7.2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ では $4.8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ に比較し, わずかに傾きが増し, 直線領域は $0.4 \sim 3.0 \text{ mg dm}^{-3}$ とあまり差はなかった。試薬から試験が高い波長を使用することを考慮し, $4.8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ を最適濃度とした。本研究では水酸化カリウム溶液と HNB 溶液を流路中にて混合するため, HNB 溶液の希釈を考慮し HNB 溶液濃度を $9.6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ とした。

3.3 水酸化カリウム溶液の濃度と測定波長の検討

カルシウムに対するマグネシウムの妨害は, pH の調整と測定波長を変化させることで抑制することが可能である。波長の変化に対する吸光度の変化をカルシウム標準液と, マグネシウム標準液をカルシウム標準液に添加

した試料について測定した結果を Fig. 2 に示す. 450 nm 付近で両試料の曲線は交差した. 水酸化カリウムの濃度を $0.3 \sim 0.7 \text{ mol dm}^{-3}$ の間で変化させた結果, $0.3 \sim 0.6 \text{ mol dm}^{-3}$ では濃度が上がるにつれて交点は徐々に長波長側に移動し, 0.7 mol dm^{-3} では逆に短波長側に移動した. 450 nm において測定したピーク高さは pH が上がるにつれて減少した. 又交点が比較的長波長側にあるほうがピーク高さは高かった. 試薬から試験値は高いもののマグネシウムの妨害が最小となる波長は 455 nm で, 水酸化カリウム溶液の濃度は 0.6 mol dm^{-3} であった. なお, Fig. 2 に示した結果から水酸化マグネシウムの生成は類推しえない.

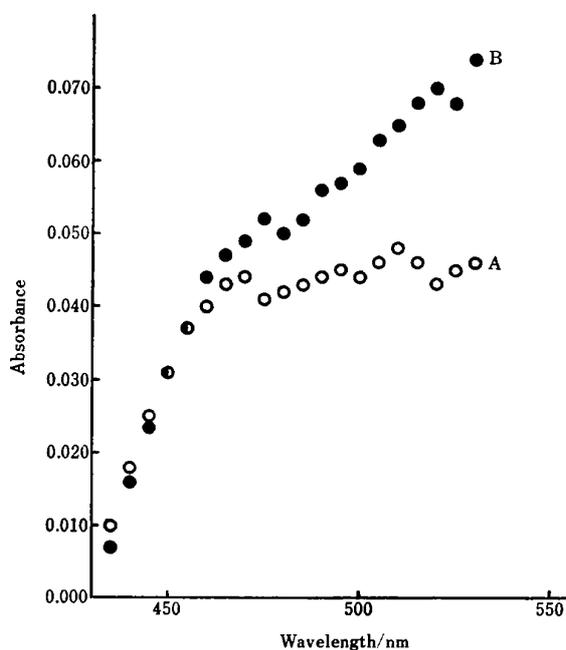


Fig. 2 Absorption spectra

Curve A : calcium standard solution (2 mg dm^{-3});
Curve B : mixture of calcium (2 mg dm^{-3}) and magnesium (2 mg dm^{-3}); Conditions of FIA system—
R : HNB ($9.6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), B : KOH (0.6 mol dm^{-3}), $M_1 : 8 \text{ m}$, $M_2 : 1.9 \text{ m}$, Flow rate : $1.2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, pH 13.4

3.4 フローシステムの検討

混合コイルの長さは HNB の高 pH 領域における酸化による退色を考慮すると短いほど良いが, HNB 溶液と水酸化カリウム溶液の均一混合を行うにはある程度の長さが必要となる. 不均一な混合はベースラインのドリフトを誘発し, 定量限界及び繰り返し精度に悪影響を及ぼす. 上記の理由により混合コイルの長さを 1 m ずつ延長していき, 安定なベースラインが得られた 8 m を用いた.

反応コイルの長さや流量は FIA における最重要因子であり, 注入する試料の分散に影響する. 流量を一定として反応コイルの長さを変化させ, 曲線の傾きと直線性を検討した結果を Fig. 3 に示す. 反応コイルの長さが増すにつれて傾きは小さくなり, 逆に直線範囲は長くなった. この傾向は流量を $1.0 \sim 2.2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ の間で変化させても変わらなかった. しかし傾きと直線範囲から導かれるカルシウムの定量範囲と, より良いピーク形状を示す条件は反応コイルの長さ 2.4 m であった. 又流量を増加させると傾きも増大し, $1.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ で最大となり以後減少した. これは分散で起こる試料の希釈による吸光度の減少と, 同じく分散で起こる試料と発色液の混合による吸光度の増加という二律背反性をもつことを意味する.

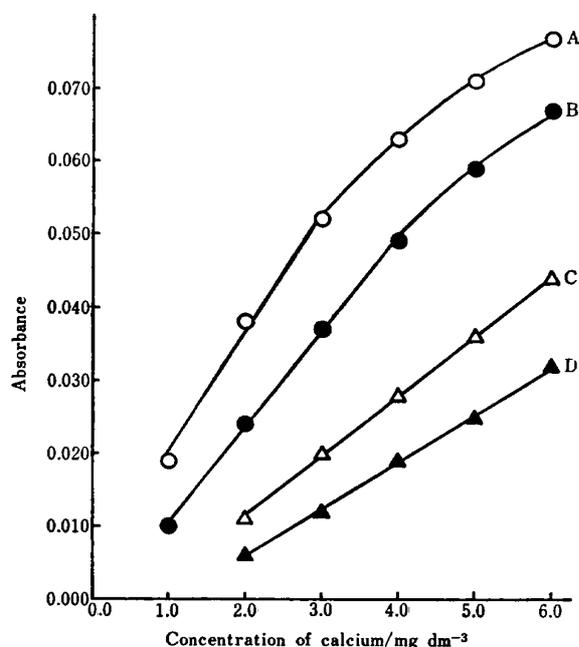


Fig. 3 Influence of the reaction coil length

A : 1.9 m, B : 2.4 m, C : 2.9 m, D : 3.9 m; Flow rate (both R and B) : $1.4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

3.5 妨害金属の検討

マスキング剤未使用での各金属の妨害を調べるために, 各金属の濃度に対する吸光度を測定した結果を Fig. 4 に示す. 各金属標準液試料にカルシウム 3 mg dm^{-3} を添加し, 各金属の濃度系列を調製した. 鉄, マグネシウム, ストロンチウムはわずかに正の妨害を示すが, カルシウムと同濃度である 3 mg dm^{-3} 程度では誤差は定量限界以下で問題はないと思われる. アルミニウム, 亜鉛, バリウムは 6 mg dm^{-3} まで全く妨害を示さなかった. ニッケル及び銅は試薬自体が緑色と青色を有

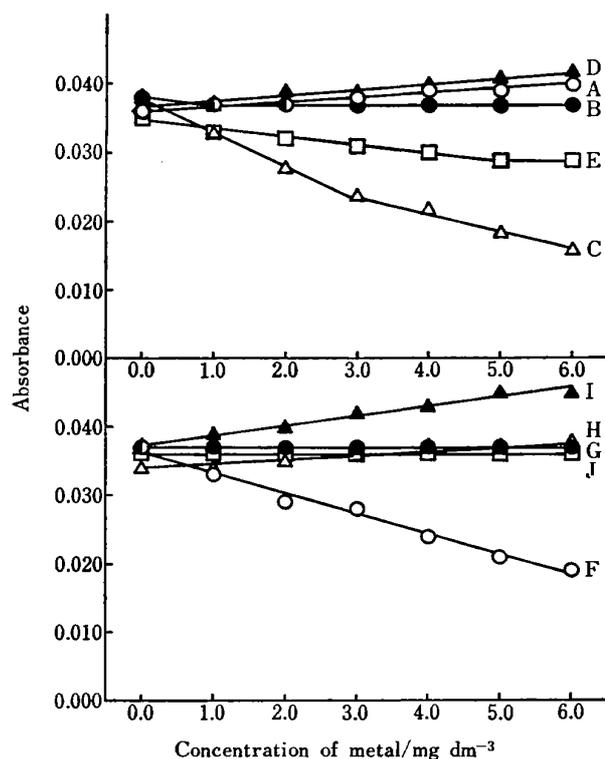


Fig. 4 Effects of foreign metals

Foreign metals were added to the calcium standard solution (3 mg dm^{-3}). A: Mg, B: Al, C: Mn, D: Fe, E: Ni, F: Cu, G: Zn, H: Sr, I: Cd, J: Ba

することが, 又マンガンは HNB を溶存酸素が酸化する触媒として働く²³⁾ことが負の誤差を示す一因と考えられるが, 測定波長により大きく影響される。

3.6 検量線及び応用試料の測定

Fig. 1 に示したフローダイアグラムの流路を使用し, 最適条件でカルシウム標準液を用いて作成した検量線を Fig. 5 に示す。検量線は $1.2 \sim 3.9 \text{ mg dm}^{-3}$ で良好な直線を示した。検出限界は 0.6 mg dm^{-3} であった。

天然水及び水道水中のカルシウムの定量結果を Table 1 に示す。応用試料はすべて 10 倍希釈し, pH 調整などの前処理なしに FIA にて測定した。なお滴定操作は試

Table 1 Determination of calcium in natural and tap waters

Sample	FIA ^{a)} / mg dm^{-3}	Titration ^{b)} / mg dm^{-3}
Pond of Inokashira Park (Tokyo)	22.8	23.0
Tap water (Tokyo)	25.4	25.7
" (Kanagawa)	20.4	20.2
" (Saitama)	28.2	26.7

a) Samples for FIA were diluted ten times with distilled water.

b) The titration was carried out by the JIS method.

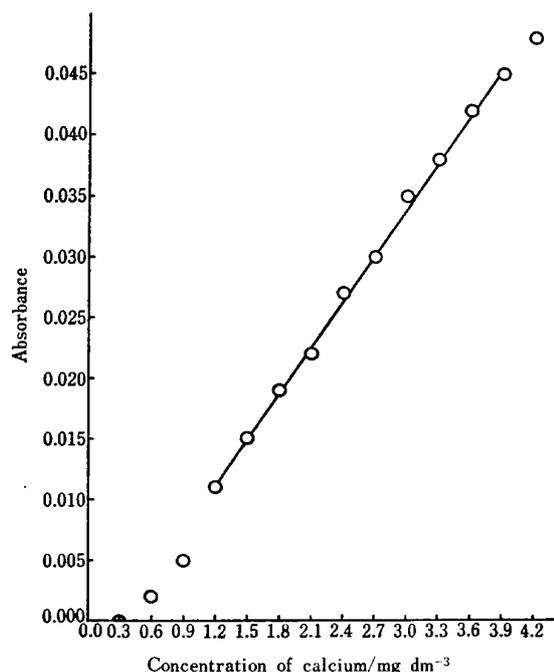


Fig. 5 Calibration curve for calcium

Absorbance was measured under the optimum conditions.

料を希釈せず直接 JIS 法¹⁾²⁾に従って行った。FIA の値と滴定値はほぼ一致した。応用試料において相対標準偏差 (R.S.D.) は 1.12% ($n=15$) で, 試料処理能力は約 40 試料/時間と, 迅速であった。

文 献

- 1) JIS K0101, 工業用水試験方法 (1979).
- 2) 並木 博: "詳解工場排水試験方法", p. 322 (1982), (日本規格協会).
- 3) A. Itoh, K. Ueno: *Analyst* (London), **95**, 583 (1970).
- 4) 上野景平: "キレート滴定法", p. 102 (1979), (南江堂).
- 5) 田中誠之, 飯田芳男: "機器分析", p. 100 (1974), (裳華房).
- 6) 石橋信彦, 与座範政訳: "フローインジェクション分析法", p. 11 (1983), (化学同人); {J. Růžička, E. H. Hansen: "*Flow Injection Analysis*", (1981), (J. Wiley & Sons, Inc., New York)}.
- 7) 上野景平, 喜納兼勇: "フローインジェクション分析法入門", p. 3 (1983), (講談社).
- 8) F. H. Pollard, J. V. Martin: *Analyst* (London), **81**, 348 (1955).
- 9) H. J. Gitelman: *Anal. Biochem.*, **18**, 521 (1967).
- 10) 浅井孝道: 検査と技術, **10**, 31 (1982).
- 11) E. H. Hansen, J. Růžička, A. K. Ghose: *Anal. Chim. Acta*, **100**, 151 (1978).
- 12) W. D. Basson, J. F. van Staden: *Analyst* (London), **103**, 296 (1978).
- 13) W. D. Basson, J. F. van Staden: *Analyst* (London), **104**, 419 (1979).
- 14) 牧野鉄男: ドージンニュース, **32**, 1 (1985), (同仁化学研究所).

- 15) G. Nakagawa, H. Wada, C. Wei : *Anal. Chim. Acta.*, **145**, 135 (1983).
- 16) 伊藤敦子, 上野景平 : 分化, **19**, 393 (1970).
- 17) G. Catledge, H. G. Biggs : *Clin. Chem.*, **11**, 521 (1965).
- 18) 飯田喜俊, 石倉保彦 : 臨床検査, **11**, 1069 (1967).
- 19) R. W. Goettsch : *J. Pharm. Sci.*, **54**, 317 (1965).
- 20) 上野景平 : “キレート滴定法”, p. 104 (1979), (南江堂).
- 21) 内田和秀, 友田正子, 齋藤眞一 : 日本分析化学会第 33 年会講演要旨集, p. 560 (1984).
- 22) 中西香爾, 黒野昌庸, 中平靖弘訳 : “有機化学”, p. 928 (1974), (東京化学同人); {R. T. Morrison, R. N. Boyd : “Organic Chemistry”, (1966), (Allyn & Bacon, Inc., Boston)}.
- 23) 上野景平 : “キレート滴定法”, p. 337 (1979), (南江堂).

☆

Determination of calcium by flow injection analysis with Hydroxynaphthol Blue. Kazuhide UCHIDA, Masako TOMODA, and Shinichi SAITO (General Science Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Sophia University, 7-1, Kioi-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102)

Flow injection analysis is proposed for the rapid and simple determination of calcium in natural and tap waters with spectrophotometric detection. The method is based on the color change reaction between calcium in the sample and indicator at pH 13. The change in the absorbance of Hydroxynaphthol Blue (HNB) owing to the complex formation of HNB with

calcium is measured spectrophotometrically at 455 nm, for calcium in the sample. No masking reagent for magnesium is required because magnesium hydroxide forms at high pH. The flow injection system was investigated to obtain the optimum conditions for the following: mixing coil length, reaction coil length, flow rate, pH and wavelength. The effects when metals were added to the calcium standard solution were examined. Barium, zinc, and aluminium did not interfere at all. Magnesium, strontium, and iron did not interfere in amounts up to the amount of calcium present. Nickel, copper, and manganese gave negative errors, and cadmium gave a positive one. A linear relationship was observed between concentration of calcium (from 1.2 to 3.9 mg dm⁻³) and absorbance. This method allows the analysis of ca. 40 samples per h. The relative standard deviation was 1.12% ($n=15$). The results for analysis of natural and tap waters agreed well with those obtained by standard EDTA titration with NN as indicator. For a single analysis the sample volume injected was as little as 50 mm³; no complicated operation is required. When the pH range of sample is from weak acid to strong base, no buffer solution is required.

(Received March 27, 1985)

Keyword phrases

flow injection analysis; determination of calcium in tap and natural waters; spectrophotometry with Hydroxynaphthol Blue.

.....