

テクニカルレター

モリブドリン酸-ローダミン B 会合体のフィルター捕集法による
陸水中の微量リン酸の蛍光定量

玉 利 祐 三*

Spectrofluorometric determination of phosphate in land water by a filter
collection method using molybdophosphate - Rodamine B

Yuzo TAMARI*

*Faculty of Science and Engineering, Konan University, 8-9-1, Okamoto, Higashinada-ku, Kobe 658-0072

(Received 21 May 2001, Accepted 14 September 2001)

Trace phosphate ion was determined by a spectrofluorometric method using Rodamine B (RB^+) as an ion-pair reagent. Under a sulfuric acid solution, RB^+ formed an ion-pair with molybdophosphate ion produced by the reaction of the phosphate with molybdate. A RB^+ -molybdophosphate as an ion-pair was collected on a membrane filter, washed, dissolved with methylcellosolve, and then measured. The analytical procedure was as follows. Into a centrifugal tube (50-ml volume) 20 ml of a water sample was taken and 1.5 ml of 10 mol/l sulfuric acid was added; the mixture was made homogeneous by shaking for 3 min at 300 rpm. Then, 3 ml of a 5×10^{-2} mol/l ammonium molybdate solution was added, and the mixture was shaken for 3 min at 300 rpm. After two ml of a 5×10^{-4} mol/l RB^+ solution was added, the mixture was also shaken in the same manner dilution to 30 ml with water. The generated ion-pair precipitation was collected on a membrane filter (pore size, 3 μ m) by filtering, washed with 1.5 ml of 0.5 mol/l sulfuric acid 20 times, and dissolved with methylcellosolve including the filter. After dilution to 1/50 with methylcellosolve, the ion-pair solution was measured (Ex 558 nm; Em 577 nm). The detection limit for the determination and precision of this method was 0.1 ppb phosphorus(V), and 1.9% as RSD obtained for 7 determinations of a standard 10 ppb solution, respectively. The present method was applied to commercially available samples of groundwater and mineral water. The analytical values of phosphorus(V) obtained by this method almost agree with those of a spectrophotometric Molybdenum Blue method.

Keywords : phosphate; land water; fluorometry; Rodamine B; ion pair; filter collection

1 はじめに

リン酸化合物は、水、土壌、動植物・食品等、環境に幅広く存在しており、特に陸水中のリン酸濃度を把握することは、環境保全及び人の健康保護の立場から重要である。環境基本法には水質環境基準が定められており、生活環境の保全に関する項目では、河川、湖沼、海域等で基準値が異なっている。例えば湖沼では全リンに対する基準値は、

工業用水等では 0.1 μ g/ml 以下であるが、最も厳しいものでは 0.005 μ g/ml 以下の基準値が定められている¹⁾。したがって、このような微量リン酸の定量法の開発が望まれている。

一般的なリン酸の定量法として、モリブデン青吸光度法、すなわちリン酸イオンがモリブデン酸アンモニウムと反応して生じた黄色のモリブドリン酸を、モリブデン青に還元して吸光定量する方法²⁾があるが、その定量限界は約 1 μ g/ml³⁾ であり、上記のような 0.005 μ g/ml 以下を対象とすれば分析感度が乏しい。そのため、リン酸の濃縮等を

* 甲南大学理工学部機能分子化学科: 658-0072 兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1

目的とした方法が開発されてきた。生成したモリブデン青をメンブランフィルターに捕集して、フィルターを反射吸光測定する方法⁴⁾があるが、フィルターの種類により捕集率が異なる。ほかの吸光光度法では、硫酸酸性下でモリブドリン酸にマラカイトグリーン (MG^+) を反応させ、生成したイオン会合体を吸光測定する方法⁵⁾、モリブドリン酸に臭化ドデシルトリメチルアンモニウムを反応させた会合体をメンブランフィルターに捕集し、フィルターごとジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して測定する方法⁶⁾⁷⁾、生成したモリブドリン酸と MG^+ のイオン会合体をメンブランフィルターで捕集後、溶解して吸光測定する方法⁸⁾⁹⁾、それをヒ酸の定量に応用¹⁰⁾、血清リン脂質の吸光定量¹¹⁾に応用した方法がある。また、ケイ酸の吸光定量のために、モリブドケイ酸と MG^+ のイオン会合体を有機溶媒相と水相の界面に浮選 (flotation) させ極性溶媒に溶解、あるいはフィルターで捕集して測定¹²⁾されている。同様にモリブドリン酸あるいはヒ酸と MG^+ のイオン会合体を浮選¹³⁾、フィルター捕集¹⁴⁾により吸光定量する方法が報告されている。一方、蛍光光度法では、モリブドリン酸とローダミン B (RB^+) のイオン会合体を浮選により定量する方法¹⁵⁾、ローダミン 6G (R6G^+) とのイオン会合体をメンブランフィルターで捕集する方法¹⁶⁾等がある。その他、モリブドリン酸- MG^+ イオン会合体をフローインジェクション¹⁷⁾により吸光定量されている。また、水中の微量リン酸を酸化ジルコニウム (IV) に共沈濃縮¹⁸⁾、ジルコニウム担持活性炭による濃縮¹⁹⁾後、モリブデン青法で吸光定量されている。

本研究では、水中の微量リン酸分析の実用・簡便性を重視して蛍光光度法の開発を試みた。蛍光試薬には、 R6G^+ よりも安価でかつ高純度のものが供給されている RB^+ を選び、モリブドリン酸- RB^+ 会合体のメンブランフィルター捕集法による、微量リン酸の蛍光定量法を確立した。 RB^+ を用いた浮選による蛍光光度法でのリンの検出限界は 0.4 ng/ml ¹⁵⁾であり、 R6G^+ を用いた蛍光光度法¹⁶⁾ではその記載はないが、本法でのリンの定量限界は 0.1 ng/ml であり、これらの蛍光光度法の中では感度の良い方法と言える。また、同報¹⁵⁾¹⁶⁾では得られた分析値について他法との比較がないが、本法では分析の正確さを検討するために、同一の水試料についてモリブデン青吸光光度法でも定量し、リン酸の分析値について比較検討することにした。

2 実 験

2.1 試 薬

精製水: 水道水をイオン交換樹脂及び活性炭カラムで処理し、更に石英製の蒸留器で2回蒸留したものを用いた (以下、水とする)。

リン (V) 標準溶液 (1000 $\mu\text{g/ml}$ 保存溶液): リン酸二水

素カリウム (和光純薬製, 特級) 0.4394 g を精ひょうして水で溶解し 100 ml とした。

モリブデン酸アンモニウム溶液 ($5 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$): モリブデン酸アンモニウム溶液 (和光純薬製, 特級) 31 g を水で溶解し 500 ml とした。

ローダミン B (RB^+) 溶液 ($5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$): RB^+ (和光純薬製, 特級) 0.12 g を水で溶解後、濃硫酸 18 ml を加え水で溶解し 500 ml とした。

ケイ酸標準溶液 (1000 $\mu\text{g/ml}$ 保存溶液): 二酸化ケイ素 (和光純薬製, 99.9%) 0.1 g を精ひょうし白金るつばに採り、無水炭酸ナトリウム (和光純薬製, 特級) 約 1 g を加えよく混合した後、30 分間融解した。放冷後、水及び塩酸 (和光純薬製, 特級 20%) を加え融解物をホットプレート上でゆるやかに加熱溶解し、水で希釈して 100 ml とした。

硫酸 (和光純薬製, 精密分析用), メチルセロソルブ (2-メトキシエタノール, 和光純薬製, 特級) 及びその他の試薬は特級品を用いた。

フィルター: メンブランフィルター (東洋濾紙製, 孔径 3.0 μm , 直径 25 mm) を用いた。なお、地下水試料はフィルター (ミリポア製, 孔径 0.45 μm) で吸引汙過したものをを用いた。

2.2 装 置

蛍光強度の測定には、分光蛍光光度計 (日立製 650-10 型) を用い、スリット幅 5 nm で励起波長 558 nm, 蛍光波長 577 nm で、1 cm セルを用いて測定した。

2.3 リン酸の定量操作

試料溶液 20 ml を共栓付き遠沈管 (50 ml) に採り、10 mol/l 硫酸 1.5 ml を加え、十分に混合 (300 rpm シェーカーで3分間振り混ぜる) する。 $5 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ モリブデン酸アンモニウム溶液 3 ml を加え十分に混合 (300 rpm シェーカーで3分間振り混ぜる) し、モリブドリン酸を生成させる。次いで $5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ RB^+ 溶液 2 ml を加え水で全量を 30 ml とし、十分に混合 (300 rpm シェーカーで10分間振り混ぜる) する。生成したモリブドリン酸- RB^+ 会合体をメンブランフィルター (孔径 3.0 μm) で吸引汉過する。但し、会合体沈殿は 0.5 mol/l 硫酸 1.5 ml で20回反復してよく洗浄する (上記の十分な試薬混合操作及び本洗浄操作により試薬空試験値を低減することができ、また空試験値の変動を軽減することができる)。

会合体沈殿物をフィルターごと共栓付き遠沈管 (10 ml) に移し、メチルセロソルブを加えて溶解し全量を 5 ml とする。この溶液 0.1 ml を別の共栓付き遠沈管 (10 ml) に採り、メチルセロソルブを加えて 5 ml に希釈し、これを測定溶液とする (本希釈操作を行わなければ蛍光強度は強

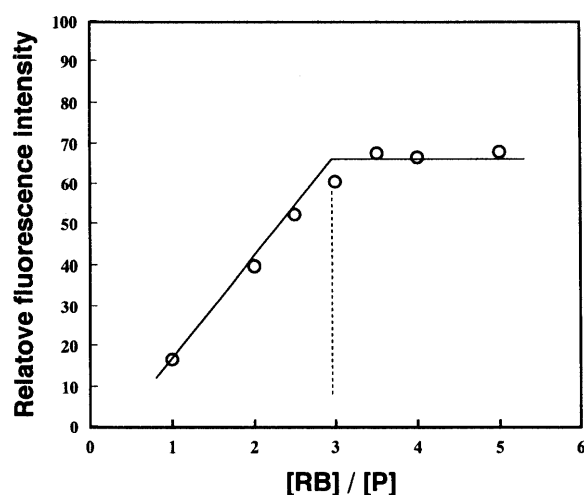


Fig. 1 Determination of the composition ratio of association (a mole ratio method)

H₂SO₄ 10 mol/l: 1.5 ml; Ammonium molybdate 5 × 10⁻² mol/l: 3 ml; Phosphorus (V) 5 × 10⁻⁶ mol/l: 1 ml; Rhodamine B 5 × 10⁻⁶ mol/l solution was used.

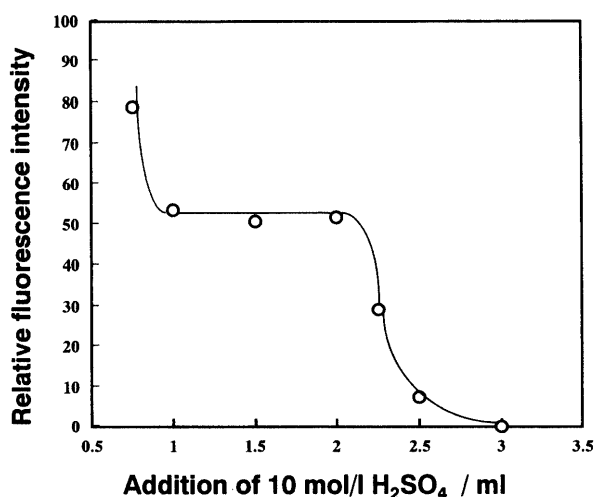


Fig. 2 Effect of the concentration of sulfuric acid
Standard P^V as PO₄³⁻: 10 ng/ml solution; Ammonium molybdate 5 × 10⁻² mol/l: 3 ml; Rhodamine B 5 × 10⁻⁴ mol/l: 2 ml

大なものとなり、正確に測定されにくくなる)。

3 結果及び考察

3.1 イオン会合体におけるモリブドリン酸と RB⁺ の組成比

モル比法によりモリブドリン酸と RB⁺ の組成比を検討したところ、1 : 3 のイオン会合体であることが分かった (Fig. 1)。また、連続変化法により検討を行ったが同様の組成比が得られた。すなわち、以下の反応が考えられる。

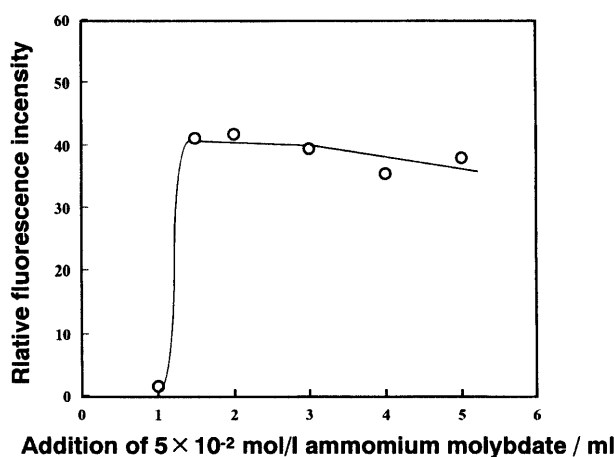
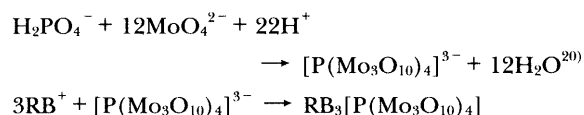


Fig. 3 Effect of the concentration of ammonium molybdate

Standard P^V as PO₄³⁻: 10 ng/ml solution; H₂SO₄ 10 mol/l: 1.5 ml; Rhodamine B 5 × 10⁻⁴ mol/l: 2 ml



3.2 硫酸濃度による影響

前項の定量操作において 10 ng/ml のリン(V) 標準溶液 20 ml を用い、10 mol/l 硫酸の添加量による影響を検討したところ、添加量が 0.5 ml と少なれば相対蛍光強度は高くなるものの、試薬空試験液のそれも高くなり、蛍光強度は安定しない。また、溶液の酸濃度を均一にし得られる蛍光強度を一定なものに保持するために、十分な混合 (シェーカーによるかくはん) を行うことにした。

本法では、安定な蛍光強度が維持される 10 mol/l 硫酸 1.5 ml を添加することにした (Fig. 2)。

3.3 モリブデン酸アンモニウム添加量の影響

前項の定量操作において 10 ng/ml のリン(V) 標準溶液 20 ml を用い、10 mol/l 硫酸 1.5 ml を添加し、5 × 10⁻² mol/l モリブデン酸アンモニウム溶液の添加量による影響を検討した。添加に際しては、硫酸の場合と同様に、十分な混合 (シェーカーによるかくはん) を行うことにした。

5 × 10⁻² mol/l モリブデン酸アンモニウム溶液 1.5 ml 以上で相対蛍光強度はほぼ一定値を示し、4 ml 以上では徐々に減少することから、本法では 3 ml を添加することにした (Fig. 3)。

3.4 RB⁺ 添加量の影響

前項の定量操作において 10 ppb のリン(V) 標準溶液 20 ml を用い、10 mol/l 硫酸 1.5 ml、5 × 10⁻² mol/l モリブデン酸アンモニウム溶液 3 ml 添加の条件で、5 × 10⁻⁴

Table 1 Effects of foreign ions on the measurement of 10 ng/ml P^V

Ion/concentration	R.F.I.
P^V as NaH_2PO_4 /10 ng ml ⁻¹	100
Na^I as $NaCl$ /100 μg ml ⁻¹	100
Na^I as $NaCl$ /1000 μg ml ⁻¹	105
Na^I as $NaCl$ /10000 μg ml ⁻¹	110
K^I as KCl /10000 μg ml ⁻¹	100
Ca^{II} as $CaCl_2$ /100 μg ml ⁻¹	100
Mg^{II} as $MgCl_2$ /100 μg ml ⁻¹	100
Si as soluble SiO_2 /10 μg ml ⁻¹	100
Si as soluble SiO_2 /20 μg ml ⁻¹	100 ~ 150
Se^{IV} as H_2SeO_3 /1000 ng ml ⁻¹	100
Se^{VI} as Na_2SeO_4 /10 ng ml ⁻¹	100
Se^{VI} as Na_2SeO_4 /100 ng ml ⁻¹	110
Se^{VI} as Na_2SeO_4 /1000 ng ml ⁻¹	110
As^{III} as $NaAsO_2$ /100 ng ml ⁻¹	100
As^V as Na_3AsO_4 /10 ng ml ⁻¹	130
As^V as Na_3AsO_4 /50 ng ml ⁻¹	280
As^V as Na_3AsO_4 /100 ng ml ⁻¹	400

R.F.I.: relative fluorescence intensity

mol/l RB^+ 添加量による影響を検討した。添加に際しては、硫酸及びモリブデン酸アンモニウムの場合と同様に十分な混合（シェーカーによるかくはん）を行うことにした。

5×10^{-4} mol/l RB^+ 溶液 0.5 ~ 4 ml の添加で相対蛍光強度はほぼ一定値を示したことから、本法では 2 ml を添加することにした。

3.5 リン(V)の検量線

リン(V) 標準溶液列を調製し、確立した最適条件下でリン(V) の検量線を作成した。10 及び 100 ng/ml までのリン(V) について検討したところ、いずれも良好な直線性が認められ、ng/ml レベルの極微量リン(V) の定量が可能となることが分かった。

また、リン(V) 10 ng/ml 標準溶液 7 試料及び空試験試料 7 試料を調製し、本法により相対蛍光強度を測定したところ、それぞれ平均値 87.1 ± 1.7 より相対標準偏差 (RSD) は 1.9%, 平均値 8.9 ± 0.5 より RSD は 6% となった。両結果から本法は、空試験値の変動も少なく、微量分析としては分析精度がほぼ満足し得る結果が得られた。また、本法の定量限界（空試験値の 2 倍の標準偏差）は、0.1 ng/ml リン(V) と算出できた。

3.6 共存元素による影響

陸水中の微量リン酸を定量する目的で、共存元素による影響を検討した。すなわち、陸水で主成分のナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、可溶性ケイ酸、ま

Table 2 Analytical results of phosphorous (V) in water samples

Sample	This fluorometric method/ μg ml ⁻¹	Spectrophotometric M. B. method/ μg ml ⁻¹
Groundwater-I	1.84	1.59
Groundwater-5	2.19	1.74
Mineral water-O	0.035	0.03
Mineral water-V	0.240	0.20
Mineral water-K	0.086	0.09

Groundwater: A few meters of depth from surface. Mineral water: Commercially available. M.B.: Molybdenum Blue method. There is a positive relationship between the present method and M. B. method ($r = 0.998$, $p < 0.05$ in z-test).

た定量目的のリン酸と類似のオキシ酸としてセレン（亜セレン酸、セレン酸）及びヒ素（亜ヒ酸、ヒ酸）についても検討を加えた。

Table 1 には標準リン(V) 10 ng/ml について共存イオンの影響を検討した結果を示す。ナトリウムは 1000 μg/ml、カリウムは 10000 μg/ml 程度まで、またカルシウム及びマグネシウムはそれぞれ 100 μg/ml まで共存してもほとんど影響がないことから、一般に陸水中の主成分の陽イオンはほとんど影響を及ぼさないことが分かった。しかし、可溶性ケイ酸については約 10 μg/ml 以上、すなわちリンの約 1000 倍以上の濃度で共存すればリン(V) の定量に正の誤差を及ぼすことが分かった。共存ケイ酸は、 $R6G^+$ を用いる蛍光光度法では 1000 倍⁽¹⁶⁾まで、 RB^+ を用いる浮選吸光光度法では 400 倍⁽¹⁵⁾まで影響されないとの報告から、ケイ酸については本法でもほぼ同程度の干渉があることが分かった。

一般に陸水にセレン及びヒ素が μg/ml レベル含まれることはまれであるが、それらの影響を検討したところ、亜セレン酸イオンは 1 μg/ml、セレン酸イオンは 10 ng/ml 程度までは影響がなかった。亜ヒ酸は 100 ng/ml まで影響しないが、ヒ酸はその共存濃度と正比例して著しく影響する。換言すれば本法によりヒ酸の定量が可能であることも示している。

3.7 陸水試料への適用

陸水試料として浅層地下水及び市販のミネラルウォーターを選び、本法により試水中のリン(V) の定量を行った。その結果を Table 2 に示す。本法は、低濃度のリン分析に有効であるが、高濃度のリン(V) を含むものについては適宜希釈して試水（試料の 1, 2, 5 ml 等を探り、水で希釈して 20 ml としたもの）とした。なお、同一試料についてモリブデン青吸光光度法⁽²⁾を適用し、得られたリン(V) の分析値を比較した。

試料数 ($n = 5$) は少ないが、両法でのリンの分析値を t

検定 (有意水準 $p < 0.05$: 統計処理には Statistical Analytical System, Stat View を使用) した結果, 両者に有意な差を見いだすことはできなかった. また, z 検定 (有意水準 $p < 0.05$: 統計処理には Statistical Analytical System, Stat View を使用) したところ両者に正相関が見られ, 相関係数は 0.998 と算定されたことから, 本法の正確さを確認することができた.

本研究を行うにあたり協力をいただいた甲南大学理学部の高橋健一, 福原知宏, 山崎良行の諸学徒に感謝の意を表す.

(1995 年 5 月, 第 56 回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) 環境庁告示第 140 号 (1982) 及び第 16 号 (1993); 徳永則正: ぶんせき, **1994**, 853.
- 2) JIS K 0102, 工場排水試験方法 p. 137 (1981).
- 3) 松原チヨ, 高村喜代子: 衛生化学, **37**, 315 (1991).
- 4) K. Hiroy, T. Tanaka, A. Kawahara, M. Adachi, K. Fukushima: *Bunseki Kagaku*, **31**, E401 (1982).
- 5) S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Tohei: *Analyst* (London), **108**, 361 (1983).
- 6) 田口 茂, 糸岡永幸, 後藤克己: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **33**, 453 (1984).
- 7) S. Taguchi, E. Tto-oka, K. Masuyama, I. Kasahara, K. Goto: *Talanta*, **32**, 391 (1985).
- 8) 松原チヨ, 高橋正嘉, 高村喜代子: 薬学雑誌, **105**, 1155 (1985).
- 9) C. Matsubara, Y. Yamamoto, K. Takamura: *Analyst* (London), **112**, 1257 (1987).
- 10) 松原チヨ, 高村喜代子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, 803 (1987).
- 11) 松原チヨ, 吉原一博, 小林成美, 米原義之, 高村喜代子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 627 (1989).
- 12) S. Motomizu, M. Oshima, T. Ikegami: *Analyst* (London), **114**, 1679 (1989).
- 13) 後藤伸武, 大島光子, 本水昌二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 151 (1993).
- 14) S. Motomizu, J.P. Susanto, M. Oshima, H. Mikasa, Y. Hori: *Anal. Sci.*, **11**, 155 (1995).
- 15) T. Nasu, H. Minami: *Analyst* (London), **114**, 955 (1989).
- 16) M. Kan, T. Nasu, M. Taga: *Anal. Sci.*, **7**, 87 (1991).
- 17) J.P. Susanto, M. Oshima, S. Motomizu, H. Mikasa, Y. Hori: *Analyst* (London), **120**, 187 (1995).
- 18) 中島 靖, 吉田 烈: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 1169 (1994).
- 19) M. Okumura, K. Fujinaga, Y. Seike, K. Hayashi: *Anal. Sci.*, **14**, 417 (1998).
- 20) 高村喜代子: Dojin News, No. 63, p. 3 (1992).

要 旨

硫酸酸性でオルトリン酸とモリブデン酸の反応により生成したモリブドリン酸に, 蛍光試薬であるローダミン B を反応させ, 生成したモリブドリン酸-ローダミン B イオン会合体沈殿をメンブランフィルター上に捕集し, 沈殿の洗浄後, メチルセロソルブに溶解してこれを測定溶液とした. 励起波長 558 nm, 蛍光波長 577 nm で蛍光強度を測定することにより ng/ml レベルの微量リン酸の定量法を確立した. 本法におけるリン(V) の定量限界は 0.1 ng/ml である. 本法を地下水等の試料に適用した結果, 31 ~ 1740 ng/ml のリンが定量できた. また, リン 10 ng/ml 標準溶液 7 試料から算出した蛍光強度の平均値に伴う相対標準偏差は 1.9% であった. また, 同一水試料のモリブデン青吸光度法によるリンの分析結果と本法による結果はよく一致したことから, 本法の信頼性が確認できた.