報 文

コバルト(II) による鉄(III) の還元反応に及ぼす 2-(5-ニトロ-2-ピリジ ルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ) フェノールの効果と それを利用するコバルト(II) のフローインジェクション分析

田中 美穂¹, 渡辺 靖之¹, 大野 慎介¹, 田丸 貴臣¹,
手嶋 紀雄¹, 酒井 忠雄^{®1}

Effect of nitro-PAPS on the reduction of iron(III) with cobalt(II) and the flow-injection analysis of cobalt(II) in real samples

Miho TANAKA¹, Yasuyuki WATANABE¹, Shinsuke OHNO¹, Takaomi TAMARU¹,
Norio TESHIMA¹ and Tadao SAKAI¹

¹ Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247, Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota-shi,
Aichi 470-0392

(Received 1 December 2003, Accepted 14 January 2004)

The reduction reaction of iron(III) with cobalt(II) easily occurs in the presence of 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino)phenol (nitro-PAPS) at pH 3.5, in which iron(II)-nitro-PAPS chelate is formed. The chelate has a specific absorption maximum at 790 nm. Cobalt(II) can thus be determined by measuring the absorbance of the complex at the above-mentioned wavelength. The redox reaction is introduced into a two-channel flow system for the determination of cobalt(II). The calibration curve is linear in the concentration range of 2.5×10^{-7} M $\sim 1 \times 10^{-5}$ M cobalt(II) with a sample throughput of 70 samples h⁻¹. The detection limit ($S/N=3$) is 1×10^{-7} M and the relative standard deviation for 10 determinations is 0.3% for 2.5×10^{-6} M cobalt(II). The proposed flow-injection spectrophotometric method is applied to analyses of cobalt(II) in cobalt alloy (NIST SMR 862; High Temperature Alloy L 605) and pepperbush (NIES standard, No. 1) and to the indirect determination of vitamin B₁₂ in pharmaceuticals.

Keywords : cobalt(II); iron(III); nitro-PAPS; redox reaction; flow-injection.

1 緒 言

コバルト合金は、主としてクロム、タンゲステンあるいはモリブデンを加えた合金で、高い硬度をもち、耐酸化性や熱安定性に富む¹⁾。その特性を利用して医療用器具が開発され²⁾、最近では眼鏡フレーム、はさみ、装身具などにも利用されている。また、ビタミン B₁₂ のポルフィリン骨格の中心にコバルトが存在することは周知の事実であり、コバルトを定量することによってビタミン B₁₂ の間接定量が可能である³⁾。ビタミン B₁₂ は人体中で造血作用に関与

しており、これが不足すると神経痛、悪性貧血、眼精疲労を起こすことから⁴⁾、これら疾患の治療薬として用いられ、市販の点眼薬にも配合されている。したがって、純度試験や品質管理上、コバルトの高感度かつ簡便な分析法が要求されている。

水溶液中のコバルト(III)/コバルト(II)系の標準酸化還元電位は 1.81 V (対 NHE) であり⁵⁾、通常水溶液中ではコバルト(III)イオンはほとんど存在しない。このことは、電解によってコバルト(III)を生成させれば、強力な酸化剤として利用できることを意味している⁶⁾。しかし、コバルト(II)水溶液にコバルト(III)と安定な配位子を共存させれば、容易に酸化され置換不活性な錯体として安定に存

¹ 愛知工業大学工学部応用化学科: 470-0392 愛知県豊田市八草町八千草 1247

在することが知られている。したがって、適当な配位子の共存下で、コバルト(II)を還元剤として作用させることが可能である。Vydra と Pribil は^{7,8)}1,10-フェナントロリン(phen)の共存下、pH 2 で $\text{Co(phen)}_3^{3+}/\text{Co(phen)}_3^{2+}$ 系の条件酸化還元電位が 0.37 V であると報告している。著者らは、2,2'-ビピリジン又は phen の存在下でコバルト(II)がバナジウム(V)、クロム(VI)⁹⁾及びセリウム(IV)¹⁰⁾を定量的に還元することを示し、新規の酸化還元滴定の反応系を開発した。phen 共存下でコバルト(II)は、クロム(VI)と鉄(III)を逐次還元することができ、この滴定法は高炭素フェロクロム中の両金属の同時定量に応用された¹¹⁾。

近年、水溶性でモル吸光係数の大きな 2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール(nitro-PAPS)が設計され¹²⁾、血清鉄¹³⁾、血清亜鉛¹⁴⁾、血清鉄・銅・亜鉛¹⁵⁾の吸光光度法が開発された。また、nitro-PAPS は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)のプレカラムキレート剤として利用され^{16)~18)}、更にフローインジェクション分析(FIA)による鉄¹⁹⁾、バナジウム²⁰⁾の高感度定量法が報告されている。しかし、この配位子が及ぼす金属イオンの酸化還元反応への作用はこれまで定量的に議論されていない。

本研究ではコバルト(III)と鉄(II)が nitro-PAPS と安定な錯体を形成することに着目し、コバルト(II)による鉄(III)の還元反応を電位差滴定により検討した。その結果、通常は進行しないこの還元反応が nitro-PAPS の共存により進行することが明らかとなり、反応生成物である鉄(II)キレートの特有の吸収帯を利用することにより、迅速かつ簡便なコバルト(II)の FIA 法を開発した。本法はコバルト合金、リョウブ、市販医薬品中のコバルトの定量に応用され、良好な結果を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

すべての試薬は市販の特級試薬を精製せずにそのまま用いた。また、試薬溶液の調製及び希釈に用いた水は、アドバンテック製 GSH-210 型蒸留水製造装置により精製した蒸留水を用いた。

2.5×10^{-3} M (mol dm^{-3}) nitro-PAPS 溶液: nitro-PAPS (同仁化学研究所製) 0.126 g を水に溶かして全量を 100 ml とした。

2.0×10^{-2} M コバルト(II) 溶液: 塩化コバルト(II)六水和物(和光純薬製) 2.380 g を 5.0×10^{-2} M 硫酸に溶かして全量を 500 ml とした。

2.0×10^{-2} M 鉄(III) 溶液: 硫酸鉄(III)アンモニウム十水和物(和光純薬製) 4.822 g を 0.5 M 硫酸に溶かして全量を 500 ml とした。

Fig. 1 Flow-injection manifold for determination of cobalt(II)

C.S.: 0.01 M HCl; R.S.: a mixed solution of 2.0×10^{-5} M iron(III), 2.5×10^{-4} M nitro-PAPS and 0.5 M acetate buffer (pH 3.5); P₁ and P₂: pump (flow rate 1.5 ml/min); R.C.: reaction coil (i.d. 0.5 mm, 3 m); D: detector (790 nm); S: sample (200 μ l); V: six-way valve; Rec.: recorder; W: waste

なお、コバルト(II)溶液と鉄(III)溶液は EDTA 滴定法により標定した後、0.01 M 塩酸で正確に希釈して用いた。

1.0 M 酢酸塩緩衝液: 酢酸(シグマアルドリッチジャパン製) 28.6 ml を水に溶かして全量を 500 ml とし、1.0 M 酢酸溶液とした。酢酸ナトリウム(シグマアルドリッチジャパン製) 8.203 g を水に溶かして全量を 100 ml とし、1.0 M 酢酸ナトリウム溶液とした。それぞれの溶液を混合させて pH 3.5 に調整した。

後に示すフローシステムを用いて送液する試薬溶液は、上記の鉄(III)溶液、nitro-PAPS 溶液、酢酸塩緩衝液を最終濃度がそれぞれ 2.0×10^{-5} 、 2.5×10^{-4} 、0.5 M となるように適宜混合した。

2.2 装 置

電位差滴定: 三菱化学製自動滴定装置 GT-07 を使用した。pH の測定には堀場製作所製 F-22 型 pH メーターを使用した。

吸収スペクトル測定: 日本分光製 V-560 型分光光度計を使用し、セルは Pyrex 製の光路長 10 mm のものを用いた。

FIA: 溶液の送液には、日本分光製 PU-1580 型インテリジェント HPLC ポンプを使用し、サンプルの注入は六方切り替えバルブインジェクター(フロム製)により行った。検出器は、相馬光学製 S-3250 型波長可変可視分光検出器(フローセル容積 8 μ l)、記録計はエフ・アイ・エー機器製 FIA Monitor を使用した。反応コイルは内径 0.5 mm のポリテトラフルオロエチレン(PTFE)チューブを用いた。

2.3 FIA 操作

用いたフローシステムを Fig. 1 に示す。キャリアー溶液として 0.01 M 塩酸、試薬溶液として 0.5 M 酢酸塩緩衝液(pH 3.5)、 2.0×10^{-5} M Fe(III) 溶液、 2.5×10^{-4} M nitro-PAPS の混合溶液をそれぞれ 1.5 ml/min の流量で送

Fig. 2 Titration curves of iron(III) with cobalt(II) in the presence/absence of nitro-PAPS

Titrand (20 ml taken): a mixed solution of 5×10^{-4} M iron(III), 1.5×10^{-3} M nitro-PAPS and 0.25 M acetate buffer (pH 3.5); Titrant (2 ml at equivalent point): 5×10^{-3} M cobalt(II)

液した。六方バルブより 200 μ l の試料溶液をキャリアー溶液に注入し、長さ 3 m の反応コイル内で反応させ、吸光検出器に導入して生成した鉄(II)-nitro-PAPS キレート of 吸収である 790 nm における吸光度を測定した。

3 結果と考察

3.1 コバルト(II) による鉄(III) の還元反応

コバルト(II) と鉄(III) との酸化還元反応

の平衡定数 $K_{\text{Co-Fe}}$ は、コバルト(III)/コバルト(II) 系 (1.81 V 対 NHE) 及び鉄(III)/鉄(II) 系 (0.771 V 対 NHE)⁵⁾ の標準酸化還元電位を用いて、ネルンスト式から $10^{-17.6}$ と計算される。したがって、式(1)に示す反応は大きく左辺に偏っており、コバルト(II) は鉄(III) を還元することはできない。しかし、右辺の化学種とより安定な配位子を共存させることにより、平衡定数を大きくすることが可能である。そこで、鉄(III) と nitro-PAPS の混合溶液にコバルト(II) 溶液を滴下して、電位差滴定曲線を作成した。その結果を Fig. 2 に示す。nitro-PAPS を添加しない場合には電位の飛躍が見られない。すなわち、コバルト(II) は鉄(III) を還元することができない。しかし、nitro-PAPS が共存すると、著しい電位の飛躍が見られた。滴定曲線に及ぼす pH の影響では、pH 2.5~3.5 の範囲で当量

Fig. 3 Absorption spectra of iron-nitro-PAPS chelate after reduction with Co(II)

[Fe(III)]: 2.5×10^{-6} M; [nitro-PAPS]: 4×10^{-4} M; [acetate buffer]: 0.25 M (pH 3.5); molar ratio ([Co(II)]/[Fe(III)]): $\diamond$ 0 (iron(III) only); $\triangle$ 0.5; $\square$ 1.0; $\circ$ 1.5; $\times$ 2.0

点と終点がよく一致した。Fig. 2 に示す滴定曲線から見積もられる反応の条件平衡定数は $10^{4.9}$ であった。滴定分析に用いられる反応の平衡定数としては不十分であるが、以下に示す吸光光度分析の反応としては十分と考える。

3.2 吸収スペクトル

pH 3.5 において鉄(III) 濃度を 2.5×10^{-6} M に固定し、コバルト(II) とのモル比 ([Co(II)]/[Fe(III)]) を種々変化させ、反応生成物の吸収スペクトルを測定した。520~620 nm 付近の吸収は、モル比の増大とともに増加し、モル比が 1.0 を超えても増加する。モル比 1.0 以上での吸収の増加は、酸化剤である鉄(III) がほとんど存在しないので、コバルト単独のキレート生成に基づくものである。一方、790 nm における吸収は、モル比 1.0 まで増加し、それ以降コバルト(II) 濃度が増大しても増加しない。このことは、鉄(III) がコバルト(II) により還元されつくされ、790 nm に特有の吸収をもつ鉄(II) キレートがもはや生成しないことを意味している。吸収スペクトルの検討結果からも式(1)に示すとおり、この反応がコバルトと鉄との一電子酸化還元反応であることが示された。

コバルト(III)-nitro-PAPS キレートの吸収極大は 560 nm 付近に存在するので (モル吸光係数 $12.2 \times 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁶⁾、この波長を利用すれば高感度な定量が可能である。しかし、この波長付近には銅、ニッケル、亜鉛キレートなどの吸収が存在するので、分離機能を介さずに迅速に定量するには、790 nm における吸収を利用するのが有利であると考え、790 nm を測定波長として選択した。

3.3 FIA による検討

3.3.1 実験諸条件の最適化 Fig. 1 のフローシステムに 2.5×10^{-6} M 及び 5.0×10^{-6} M のコバルト(II) を注入

Fig. 4 Effect of nitro-PAPS concentration on peak height

[Co(II)]: ● 2.5×10^{-6} M; ■ 5.0×10^{-6} M; other conditions as in Fig. 1

し、pH 2.2～4.9の範囲でpHの影響を検討した。pH 2.2～3.5までは吸光度が大きく増加し、pH 3.5からは緩やかに増加した。電位差滴定の結果より、pH 3.5のとき当量点と終点がよく一致したことを考慮してpH 3.5を選択した。

nitro-PAPS濃度の影響をFig. 4に示す。2.0 × 10⁻⁴ Mまでは吸光度は著しく増加するが、2.0 × 10⁻⁴ M以上ではほとんど変化が見られない。そこで、nitro-PAPS濃度は2.5 × 10⁻⁴ Mを選択した。

2.5 × 10⁻⁶～3.0 × 10⁻⁶ Mの濃度範囲で鉄(III)濃度の影響を検討した。その結果、5.0 × 10⁻⁶ M以上の濃度で一定の吸光度が得られたので、2.0 × 10⁻⁵ Mを選択した。

反応コイルの長さを0.5～5 mの範囲で検討したところ、ほとんど吸光度の変化は見られなかった。短い反応コイルはサンプル処理速度を増大させるが、短すぎるとキャリアーと試料溶液の混合が不十分になり、ノイズが増大した。そこで3 mを選択した。

キャリアーと試料溶液の流量を0.5～2.0 ml/minの範囲にわたり同流量で変化させた。それぞれの流量が0.75 ml/minまでは吸光度は緩やかに増加し、0.75 ml/min以上ではほぼ一定値を示した。サンプル処理速度を考慮してそれぞれの流量を1.5 ml/minに設定した。

サンプル注入量を120～280 μlの範囲で検討した。その結果、サンプル注入量が増加すると吸光度は増加し、感度も良くなった。しかし、サンプル注入量が増加するとサンプル処理時間が長くなるため、200 μlを選択した。

3.3.2 検量線 最適条件下で検量線を作成した。定量範囲は2.5 × 10⁻⁷～1.0 × 10⁻⁵ Mと比較的広範囲の定量が可能であった。検量線の相関係数は0.9999と非常によく、相対標準偏差 ($n = 10$) は2.5 × 10⁻⁶ Mコバルト(II)において0.3%であった。また、 $S/N = 3$ における検出限

Table 1 Effect of foreign ions on the determination of 2.5×10^{-6} M cobalt(II)

[Ion]/[Co(II)]	Ions added
10000	Na(I), Mg(II), Al(III), K(I), Ca(II) SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻
5000	Mn(II)
1000	Cd(II)
200	Zn(II), Rb(I), Sr(II), Ba(II)
50	Si(IV)
20	Cr(VI), Pb(II)
10	VO ₃ ⁻ , Ni(II), Cu(II)
2	W(VI)
1	Fe(III)

An error of ±5% was considered to be tolerable.

界は1 × 10⁻⁷ M、サンプル処理量は1時間当たり約70検体であった。

3.3.3 共存イオンの影響 コバルト合金には鉄が含まれ、点眼薬にも不純物として鉄が存在することがあるため、まず鉄イオンの影響を検討した。測定波長としてコバルト(III)-nitro-PAPS錯体の極大吸収波長である560 nmと鉄(II)-nitro-PAPS錯体の790 nmで比較した。2.5 × 10⁻⁶ Mコバルト(II)の試料溶液中に同濃度の鉄(III)を添加し、これをフローシステムに注入したところ、560 nmでのFIAピークは、コバルト(II)単独のピーク高の約2倍となった。しかし、790 nmでは同濃度の鉄(III)が添加されてもコバルト単独のピーク高と等しい高さとなった。このことから790 nmの測定波長の有利性が示された。

5.0 × 10⁻⁶ Mのコバルト(II)の定量に及ぼす共存イオンの検討結果をTable 1に示す。モル比([共存イオン]/[Co(II)])で鉄(III)は1、タンゲステン(VI)は2、ニッケル(II)及び銅(II)などは10を超えて正の妨害を与えた。しかし、これらの金属は、コバルト合金中に妨害金属の許容量を超えて存在しないので、コバルト合金試料への応用には影響はない。

リョウブ中に多く含まれているカリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガンなどはモル比1000でも影響はなかった。しかし、リョウブ中には鉄が205 μg/g、つまりモル比で約9.4含まれている。したがって、リョウブ試料への応用には鉄の妨害を除く必要がある。

3.3.4 実試料中のコバルトの定量 本法を市販医薬品、コバルト合金及びリョウブ中のコバルト(II)定量に応用した。

ビタミンB₁₂試料には、メコバラミンを主成分とする錠剤、シアノコバラミンを主成分とする目薬を用いた。ビタミンB₁₂の分解は、錠剤6粒あるいは目薬10 mlをビーカーに取り、濃硝酸20 mlを加え、時計皿でふたをして200℃のホットプレート上で2時間加熱分解した。更に濃

Table 2 Determination of cobalt(II) in practical samples

Sample	Cobalt(II) or Vitamin B ₁₂ found ^{a)}	Labeled or certified value
Vitamin B ₁₂ ^{b)}	1430 ± 10 µg/3 tablets	1500 µg/3 tablets
Vitamin B ₁₂ ^{c)}	0.014 ± 0.000 ₅ %	0.015%
Cobalt alloy	51.1 ± 0.1%	51.5 ± 0.3%
Pepperbush ^{d)}	20.7 ± 0.1 µg/g	23 ± 3 µg/g

a) Average for three determinations; b) Tablet; c) Eye lotion; d) The iron in pepperbush was removed by solvent extraction with hinokitiol.

硝酸 10 ml と過塩素酸 2 ml を加えて蒸発乾固した。その後, 1 M 塩酸 30 ml を加えて内容物を加温溶解して水で全量 50 ml にしたものを原液とした。

コバルト合金試料は, NIST (National Institute of Standard and Technology) より頒布されているコバルト合金標準試料 (NIST SMR 862; High Temperature Alloy L 605) を用いた。コバルト合金の分解は, マイルストーンゼネラル製 ETHOS PLUS マイクロウエーブ試料前処理装置により, 試料約 0.1 g に濃硝酸 2 ml, 濃塩酸 2 ml, 濃フッ化水素酸 1 ml を加えて 230℃ で 30 分間分解した。その後, 分解溶液を水で全量 100 ml にしたものを原液とし, 0.01 M 塩酸で希釈して使用した。

リョウブ試料は, 国立環境研究所 (National Institute for Environmental Studies, NIES) より頒布されているリョウブ標準試料 (NIES No. 1) を用いた。リョウブの分解は試料約 0.2 g をテフロン小容器に取り, 濃硝酸 2 ml, 過塩素酸 0.4 ml, フッ化水素酸 0.2 ml を加え, 容器を回転して混酸中に試料を分散させた後, ふたをしっかりと閉めた。小容器を水 1.5 ml とともにテフロン外容器に入れてふたを閉めた。外容器をステンレス製耐圧容器に収めてレンチとバイスを使用して密封した。90℃ の乾燥機中で 2 時間, 130℃ の乾燥機中で 2 時間加熱分解し, 30 分間放冷した後 30 分間冷凍庫に入れて冷却した。小容器を取り出して開封し, 赤外線ランプとホットプレートを用いて蒸発乾固した。その後, 0.1 M 塩酸 4 ml を加えて内容物を加温溶解した。リョウブ中の鉄を除去するために, ヒノキチオールのベンゼン溶液を用いて抽出を行った。鉄を除去した試料溶液を原液とし, 0.01 M 塩酸で希釈して定量した。

これらの結果を Table 2 に示す。ビタミン B₁₂ の含有量はコバルトの定量値から見積もられ, 表示値とほぼ一致し

た。コバルト合金, リョウブ中のコバルト定量値も保証値とよく一致する良好な値を得たことから, 本法は実用分析法として有用である。

本研究の一部は平成 15 年度私立大学学術研究振興資金及び愛知工業大学総合技術研究所プロジェクト研究資金によるものである。コバルト合金及びリョウブの試料分解にご協力いただいたマイルストーンゼネラル(株), 及び名古屋工業大学の内田哲男教授に深謝する。また電位差滴定のデータを取得していただいた当研究室卒業生の伊藤将之氏, 渡辺珠帆氏に謝意を表する。

(2003 年 11 月, 第 44 回フローイン
ジェクション分析講演会-創立 20
周年記念大会において一部発表)

文 献

- 1) I. V. Pyatnitskii: "Analytical Chemistry of Cobalt", (1969), (Ann Arbor, London).
- 2) J. A. Disegi, R. L. Kennedy, R. Pilliar: "Cobalt-Base Alloys for Biomedical Applications", (1999), (American Society for Testing and Materials).
- 3) 酒井忠雄, 大野典子, 佐々木英人: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **40**, 305 (1991).
- 4) G. F. Combs, Jr.: "The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition, and Health", 2nd edition, (1998), (Academic Press, San Diego).
- 5) 日本分析化学会編: "改訂 4 版分析化学データブック", (1994), (丸善).
- 6) H. Tanaka, H. Morita, S. Shimomura, K. Okamoto: *Anal. Sci.*, **13**, 607 (1997).
- 7) F. Vydra, R. Pribil: *Talanta*, **3**, 103 (1959).
- 8) F. Vydra, R. Pribil: *Talanta*, **5**, 44 (1960).
- 9) N. Teshima, T. Kawashima: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 1975 (1996).
- 10) H. Katsumata, N. Teshima, T. Kawashima: *Anal. Sci.*, **13**, 825 (1997).
- 11) H. Katsumata, N. Teshima, T. Kawashima: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2151 (1997).
- 12) 斉藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **30**, 635 (1981).
- 13) T. Makino, M. Kiyonaga, K. Kina: *Clin. Chim. Acta*, **171**, 19 (1988).
- 14) T. Makino: *Clin. Chim. Acta*, **197**, 209 (1991).
- 15) 大野典子, 酒井忠雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 937 (1997).
- 16) C. Ohtsuka, K. Matsuzawa, H. Wada, G. Nakagawa: *Anal. Chim. Acta*, **256**, 91 (1992).
- 17) T. Okutani, Y. Tsukada, A. Sakuragawa, T. Yamaji, S. Morita: *J. Chromatogr. A*, **788**, 113 (1997).
- 18) C. Ohtsuka, Y. Mori, S. Hayashi, T. Tsuda, H. Wada: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **23**, 669 (2000).
- 19) T. Yamane, H. Yamada: *Anal. Chim. Acta*, **308**, 433 (1995).
- 20) T. Yamane, Y. Yamaguchi: *Mikrochim. Acta*, **130**, 111 (1998).

要 旨

コバルト(II) による鉄(III) の還元反応は、2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール (nitro-PAPS) の共存下、pH 3.5 の条件で進行する。この反応の生成物である鉄(II)-nitro-PAPS キレートは、790 nm に鉄(II) キレート特有の吸収極大を有する。したがって、この錯体の吸光度を測定することにより、コバルト(II) の吸光光度定量が可能である。この酸化還元反応を 2 流路のフローシステムに導入したところ、コバルト(II) $2.5 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ M の範囲で直線性の良い検量線が得られた。コバルト(II) の検出限界 ($S/N=3$) は 1.0×10^{-7} M であり、 2.5×10^{-6} M のコバルト(II) を 10 回繰り返して測定した際の相対標準偏差は 0.3% であった。1 時間当たり約 70 検体のサンプル処理が可能である。本法は、コバルト合金 (NIST SMR 862; High Temperature Alloy L 605) 及びリョウブ (NIES 標準試料 No. 1) 中のコバルトの定量に応用され、良好な結果が得られた。更に本法により市販医薬品中のコバルトを定量し、間接的にビタミン B₁₂ を測定することができた。