文 献

- 1) J. H. Yoe, R. L. Grob : *Anal. Chem.*, **26**, 1465 (1954).
- 2) R. L. Grob, J. H. Yoe : *Anal. Chim. Acta*, **14**, 253 (1956).
- 3) E. C. Cogbill, J. H. Yoe : *Anal. Chem.*, **29**, 1251 (1957).
- 4) G. H. Ellis, E. G. Zook, O. Baudisch : *ibid.*, **21**, 1345 (1949).
- 5) D. A. Brewster : *ibid.*, **23**, 1809 (1951).
- 6) G. Matelli : *Aluminio*, **26**, 255 (1957); *Chem. Zentr.*, **129**, 811 (1958).
- 7) 若松茂雄: 本誌, **7**, 309 (1958).
- 8) 吉森孝良, 武内次夫: 本誌, **9**, 354 (1960).
- 9) H. Roth, W. Beck : *Z. anal. Chem.*, **141**, 404 (1954).
- 10) H. Roth, W. Beck : *ibid.*, **141**, 414 (1954).
- 11) H. Baron : *ibid.*, **143**, 339 (1954).
- 12) M. Codell, G. Norwitz : *Anal. Chem.*, **25**, 1446 (1953).
- 13) J. R. Martin, J. R. Hayes : *ibid.*, **24**, 182 (1952).

☆

Photometric determination of trace boron in aluminum. Akinari ICHIRYU and Shikao HASHIMOTO

(Sumitomo Light Metal Industries, Ltd.)

From the investigation of the determination of boron by 1,1'-dianthrimide method, the following procedure has been established.

Aluminum sample is dissolved in hydrochloric, nitric, and sulfuric acids. After adjusting the acidity of the solution by adding distilled water, most of aluminum is removed by adsorption on cation exchanger Dowex 50. The effluent is evaporated to fumes of sulfuric acid, and after cooling, heated with 1,1'-dianthrimide at 90°C for 90 min. Then, the absorbance is measured photometrically at 630 mμ.

Reaction ratio of this reagent and boron is found to be 1:1, but it is necessary to add a definite excess of the reagent, for the decomposition of the reagent proceeds at the same time with the complex formation.

It is unnecessary to hinder boron scattering by adding calcium oxide to the sample solution.

Calibration curve up to B 4 γ/10 ml is linear. Interfering elements are not found, except the precipitation of sulfates. Co-existence of aluminum less than 10 mg is not objectionable.

(Received Apr. 11, 1961)

ジピクリルアミンによる尿中カリウムの比色定量*

木村 道也**, 平山 忠允***, 前島 富美子****

ジピクリルアミンナトリウムによる尿中カリウムイオンの定量法を検討し, 簡易かつ精度の高い比色法を確立した。ジピクリルアミンナトリウム水溶液はカリウムイオンによって定量的にカリウム塩を析出し, したがって, その溶液の 420 mμ における吸光度は, 加えたカリウムイオン濃度の増大とともに減少するというのが本法の原理である。尿中多量に共存するアンモニウムイオンは反応を妨害するが, 水酸化ナトリウムと煮沸して除去したのち, 測定を行えばよいことが判明した。50~200 mg% にわたる各種濃度のカリウムイオンについて行なった測定は, 良好な再現性を示し (Table III), また尿に添加したカリウムイオンの回収率も 96.7% であった (Table IV)。

1 緒 言

体内カリウムの定量には炎光法が普及しつつあるが, 現在, なお化学的方法による分析の必要性の大なることが認められるので, われわれは従来教室において取扱っ

てきたニトロベンゼン化合物中, 純品が市販され, したがって容易に入手できるものとしてジピクリルアミン (以下 DPA と称す) を選び, これについて検討を重ねることとした。DPA は NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ などと選択的に結合して難溶性沈殿を形成し, 特に比較的多量の Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 存在下のカリウムの微量検出試薬^{1)~4)}とされて以来, さらに定量用試薬として種々検討が行なわれ, 重量法^{5)~8)}, 容量法^{9)~10)}, 比色法^{6)~7), 11)~17)}, その他^{18)~20)}などが報告されている。

われわれはまず重量法につき追試を行なったところ,

* 臨床分析化学の基礎的研究 (第3報) 有機試薬による体内無機イオンの分析 (その1)

** 北海道大学医学部薬学科: 札幌市北12条西9丁目

*** 現在 第一製薬株式会社: 東京都中央区日本橋江戸橋

**** 現在 札幌市厚生病院: 札幌市大通西19丁目

生成する DPA-K は一部微細浮遊状となり、その口過が困難かつ長時間を要し、また恒量となるにも長時間を要するなど種々の点で特に好ましい特徴を見出しえなかったため、比色による方法を検討することとした。

DPA による比色法を大別すれば、得られた DPA-K 塩をふたたび溶解して比色する直接的方法⁶⁾⁷⁾⁸⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾と、ロ液中に残存する過剰の DPA を測定する間接的方法¹³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾とに分けられるが、前者は重量法の変法とも見なされるべきものであり、したがって、上述のごとく微量の DPA-K 塩沈殿の定量的処理の不完全なることを考える時、後者の有利なことが結論される。

Amdun¹³⁾ は DPA-K 飽和の DPA-Li 溶液を沈殿試薬とし、乾燥固化せしめた検体に加え、放置後得られる上澄を採取し、適当濃度に希釈後比色を行なった。さらに、Bois ら¹⁴⁾ はその改良法として遠心分離により上澄を得、または希釈の代わりに特殊キュベットを使用した。われわれは重量法の検討に際して得られた知見に基づき、容易に入手できる市販 DPA-Na 塩を使用し、まず各種濃度の塩化カリウム水溶液について沈殿反応を行ない、小型口紙による自然口過で得られるロ液の一部を正確に採取し、ついでこれを適当濃度に希釈したものについて比色条件の検討を行なった。尿中カリウムイオン濃度の平均値を 150 mg% として、50~200 mg% の間を検体濃度範囲と想定し、この間において分光光度計の最適感度範囲である $T=15\sim65\%$ 、 $E=0.82\sim0.18$ を示すように上記ロ液を希釈して、これがベールの法則に従うことを見出した。

つぎに尿中に多量存在するアンモニウムイオンの妨害を除去する検討を行なったが、消泡剤として精製パラフィン添加した尿を水酸化ナトリウムとともに煮沸する方法が好適であったので、モデル実験として硫酸アンモニウム含有塩化カリウム水溶液につき、全く同様のアンモニア除去処理および上述の条件によるカリウムイオンの測定を行ない、上述の濃度範囲でベールの法則に従うことを確認した (Table III)。

最後に既知量のカリウムイオンを添加した尿について回収率を測定し、96.7% なるほぼ満足すべき結果を得た。また Table I に示すごとく、本法は炎光法とほぼ同様の測定値を与えることが判明した。

2 試薬および装置

2.1 試薬

ジピクリルアミンナトリウム：市販品（三菱化成加里定量用，小宗化学）をそのまま使用した。

その他の試薬は特に明記しないものはすべて特級品を使用した。

Table I Results of determination

Sample	Proposed method (mg%)	Flame photometry (mg%)
A	86.6	83.0
B	86.8	80.0
C	93.0	88.0
D	122.3	120.0
E†	156.0	168.0
F†	157.0	160.0
G†	233.0	232.0

† With silicone defoamer (TS 982) in stead of paraffin.

2.2 測定機器

吸収曲線の測定は Beckman DK II 型にて、また定量用には平間光電比色計を使用し、フィルター 420 m μ 、液層 1 cm のキュベットを用いた。

3 実験および考察

3.1 沈殿試薬について

3.1.1 試薬の選定 Kolthoff⁷⁾ らは DPA-Mg を、Amdun¹³⁾ は DPA-Li を使用したので、まず DPA を常法²³⁾にしたがって合成し、ついで両種の塩を調製し、また市販品を再結晶により精製し、三者につき比較検討を行なったが、実際上の差異が認められなかったため、容易に入手できる後者をそのまま使用することとした。

3.1.2 試薬溶液の濃度 後述のごとく、沈殿反応は 0°C において行なわれるが、DPA-Na は難溶性であるうに、沈殿析出を完全にするために DPA-K を飽和 (20°C) させる必要があるため、高濃度は期待できない。

常温において DPA-Na 塩は Mg 塩とはほぼ同様に約 1.5% が飽和状態であるが、1% 溶液では 0°C でも沈殿は生じない。これに室温下 DPA-K 塩を飽和させたもののロ液はよく使用目的に適合する。

3.1.3 溶液の安定性と pH 一般に DPA 塩類溶液は酸性では直ちに遊離し、また pH 10 以上では徐々に分解する。沈殿反応機構よりアルカリ性が望ましいので、Gastinger¹⁵⁾ にしたがって pH 9.8 の緩衝液（炭酸ナトリウム・ホウ砂）で溶液を調製したが、この条件下では約 1 カ月間にわたって著明な変化は見られなかった。

3.1.4 試薬溶液の調製 DPA-Na 5.0000 g を上記 pH 9.8 緩衝液 500 cc に溶解し、これに DPA-K 100 mg を飽和させ、一度口過後冷暗所に貯える（以下これを DPA-試液と呼ぶ）。

3.2 沈殿形成について

3.2.1 温度 恒温下の操作が望ましいことは本法

の原理より予測されるところである。室温下沈殿生成の例も見られるが¹³⁾¹⁴⁾, DPA-K の水に対する溶解度は $0^{\circ}\text{C} : 4.50 \times 10^{-4}$, $5^{\circ}\text{C} : 5.65 \times 10^{-4}$, $15^{\circ}\text{C} : 9.33 \times 10^{-4}$ (6.7×10^{-4} ⁵⁾), $25^{\circ}\text{C} : 1.58 \times 10^{-3}$ であり¹⁾(あるいは 0°C , $0.02N$ DPA-Ca 塩中の溶解度は $3.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, 5°C では $5.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ²¹⁾), $0^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ の間で、溶解度は約 10 倍に変化する⁷⁾。したがって、最も容易に得られ、しかも好適なる温度として 0°C (氷水中) を採用することとした。

3.2.2 時間 DPA-試液を使用すれば、瞬間的に橙色微細結晶が析出し、放置すると結晶は比較的大型に成長するが、Amdun¹³⁾, 佐藤¹⁴⁾らの報告にも見られるごとく、2 時間以内での定量的沈殿は望めず、小濃度の場合特にその傾向は著明であった。しかるに DPA-試液添加後約 30 秒間激しくかきまぜ、45 分間 0°C に保つ時はほぼ定量的な値が得られる。なお、それ以下の時間では沈殿の成長が一定でなく、不安定なバラツキを示した。

3.2.3 試薬使用量 DPA による重量法, 容量法, 比色法の報告によれば K : DPA のモル比は 1 : 1.5~2 程度である。われわれの場合はその原理より、モル比が可及的に 1 : 1 に近いことが望ましいが、反応完結のためには試薬の小過剰も必要であり、佐藤¹⁴⁾の条件を参考とし、検体中に想定される最大カリウム濃度 245 mg% において約 $0.35 \times 10^{-2} \text{ mol}$ 程度の過剰となるようにした。

3.3 沈殿との分離

前述のごとく、生成する沈殿は微細結晶となり、一部は液面に浮遊する。Amdun¹³⁾ は 2 回の遠心分離によって上澄を得ることに成功しているが、われわれの条件で得た微細結晶は 6000 rpm, 5~10 分にも完全に沈殿せず、かつ 0°C 下の遠心分離は操作を複雑化する。しかも、われわれの方法は原理的に沈殿全量の変換は必ずしも必要とせず、後述のごとくロ液の少量 (約 2 cc) を得ればよい。したがって、小型定量用口紙 (東洋汙紙 No. 51, 径 4 cm) を使用する自然口過が、むしろ好適であった。なお、口紙の吸着によるロ液中 DPA-Na 濃度の減少 (したがって測定時の吸光度値の減少) を考慮して最初に流出するロ液の 0.5 cc を除き、また、温度上昇に伴う DPA-K 溶解度の増大を考慮してロ液中最後の 0.5 cc を廃棄することとした。

3.4 吸収曲線

DPA-Na の可視部吸収曲線は Fig. 1 のごとく、 $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ m}\mu$ の単純な曲線を得た。DPA-Na: $\epsilon = 2.6^{\circ} \times 10^{-4}$, DPA-K: $\epsilon = 2.69^{\circ} \times 10^{-4}$ 。

Fig. 1 Visible absorption spectrum of sodium dipicrylamine

3.5 口液の希釈

口液はきわめて強い光線吸収を示すので、適当に希釈せねばならない。Twyman-Lothian の関係²²⁾より、透過度を 15~65% 内にもたらすためには、口液 0.2 cc を 500 倍の水に希釈し、液層 1 cm のキューベットを使用するのが最適であった。

Fig. 2 に示すごとく、この条件下ではベールの法則がよく適合する。

3.6 塩化カリウム水溶液による検討

尿中カリウム値が通常 80~240 mg% であることから塩化カリウムを用い、カリウムイオンに関して 50, 100, 150, 200 mg% の溶液を調製した。その 1 cc ずつを内容約 15 cc の試験管に採取し、DPA-試液 3 cc を加え、約 30 秒間ガラス棒でかきまぜたのち 45 分間 0°C (氷水中) に保ち、自然口過 (流出するロ液の前後 0.5 cc ずつを廃棄) したロ液の 0.2 cc を採取し、脱イオン水で 500 倍に希釈する。この溶液を光電比色計を用い、420 mμ において測定したが、上記濃度範囲内ではよくベールの法則が成立した (Fig. 2)。

3.7 アンモニウムイオンの除去

3.7.1 DPA-Na に対するアンモニウムイオンの妨害

DPA-Na はアンモニウムイオンと難溶性化合物を形成して定量を妨害する。0.5, 0.8, 1.6, 3.3, 5.0 NH_4^+ mg% 硫酸アンモニウム溶液を使用して検討したところ、0.8 mg% 以上のアンモニウムイオンが妨害した。

3.7.2 アンモニウムイオン除去操作の検討

沈殿反応に影響を与えない簡単かつ確実な方法は、カリウムイオン不含の特級水酸化ナトリウム溶液との加熱である。尿中正常値に等しいアンモニウムイオン濃度 (硫酸アンモニウム 167 mg% 水溶液) を示す水溶液について、

5% 水酸化ナトリウム水溶液 2 cc を加え、電熱器上で加熱した溶液のネスラー試薬による比色定量*を試みて、つぎの条件を選んだ。検体に 5% 水酸化ナトリウム水溶液 2 cc を加えたのち約 15 分間加熱する。この条件により脱アンモニア操作を行なった硫酸アンモニウム含有塩化カリウム溶液（カリウムイオンとして 50~200 mg% 水溶液）の定量値の再現性を検討したところ、ほぼ満足すべきものとなった (Table II)。

Table II Reproducibility of determination of K^+ in aq. KCl solutions containing $(NH_4)_2SO_4$ after elimination of NH_4

No.	K^+ (mg%)				
	0	50	100	150	200
1	0.785	0.607	0.460	0.319	0.167
2	0.772	0.614	0.456	0.311	0.173
3	0.767	0.600	0.449	0.305	0.173
4	0.796	0.599	0.469	0.326	0.174
5	0.791	0.620	0.471	0.323	0.173
6	0.770	0.620	0.456	0.318	0.170
7	0.775	0.612	0.450	0.319	0.181
Mean value	0.779	0.610	0.459	0.317	0.173
Error	1.22%	1.12%	1.49%	1.70%	1.48%

3-7-3 消泡剤 尿を苛性アルカリと煮沸する時は、はげしく発泡し、大きな誤差を招くおそれがあるので、消泡剤としてシリコン（東芝 TS 982）、白色ワセリン、固形パラフィンなどについて検討したが、固形状の精製パラフィンが最適であった (Table I)。

3-7-4 全操作を含む場合の再現性 以上に定めた脱アンモニアおよび消泡操作を含む条件下では、尿検体のモデルとしての硫酸アンモニウム含有塩化カリ水溶液定量値の再現性は、ほぼ満足すべきものとなった (Table III)。

Fig. 2 Calibration curve of proposed method

* ネスラー試薬によるアンモニウムイオンの呈色は 0.16 mg% で淡黄色、0.8 mg% で濃橙黄色、420 m μ での吸光度はそれぞれ 0.417, 1.678 であった。

Table III Reproducibility of standard procedure

No.	K^+ (mg)			
	50	100	150	200
1	0.613	0.476	0.319	0.187
2	0.620	0.469	0.323	0.179
3	0.616	0.462	0.322	0.173
4	0.613	0.457	0.316	0.162
5	0.611	0.458	0.328	0.170
Mean value	0.615	0.464	0.322	0.174
Error	0.45%	1.3%	0.99%	4.02%

3-8 回収試験

患者尿**ならびに正常尿に、一定既知量の塩化カリウムを加え、上記条件にしたがって定量を行ない、ほぼ満足すべき結果を得た (Table IV)。

Table IV Recovery of K^+ added to urine

Sample	K^+ added (mg%)	K^+ found (mean value) (mg%)	K^+ recovered (mg%)	Recovery (%)
A†	0	84.5		
	50	133.0	48.5	97.0
B†	0	84.7		
	50	134.5	49.8	99.6
	100	180.4	95.7	95.7
C†	0	93.0		
	50	140.5	47.5	95.0
D†	0	120.0		
	50	167.9	47.9	95.8
E††	0	71.5		
	50	120.7	49.2	98.4
	100	167.9	96.4	96.4
F††	0	97.5		
	50	145.5	48.0	96.0
G††	0	139.0		
	50	187.8	48.8	97.6
H††	0	148.5		
	50	195.8	47.3	94.6
I††	0	162.8		
	50	211.4	48.6	97.2
			Mean	96.7

† Abnormal urine †† Normal urine

3-9 本法の誤差に関する検討

3-9-1 量器によるもの ひょう量、測容を通じて許容誤差最大のは 0.2 cc のメスピペットであり、約 4% の相対誤差を伴う。

3-9-2 検体よりの脱アンモニア操作によるもの

脱アンモニアを行なった検体をろ過しつつ洗い出して正確に最初の採取量にもどす際に、多少の危険性が存在し本法施行にあたり特に留意すべき手技のひとつとなる (Table II, III を比較参照)。

3-9-3 DPA-K 塩の溶解によるもの 沈殿のろ過

** 北海道大学附属病院中央検査室において得た。

には約 90 秒を要するが, この間に温度は約 8°C (室温 18°C) に上昇する. 平均温度を 4°C とする時, 佐藤のデータ²¹⁾より換算して DPA-Na 塩として概略 0.26×10^{-4} g の増量, したがってカリウム値に約 0.07% の負の相対誤差を与えるが, これはほとんど無視できる値である.

3.9.4 ロ紙吸着によるもの 使用ロ紙を測定条件下に浸した溶液について, その前後の吸光度を測定し, カリウム量として約 2.0% の正の相対誤差を与えることが判明した. しかしロ過当初口液 0.5 cc の廃棄によってこの誤差はほとんど消失する.

3.9.5 全要因を含む誤差 以上の誤差をすべて含むものとしては Table III のごとく, 最大 4.02% の相対誤差となった.

4 定 量 法

4.1 脱アンモニア操作

50 cc の三角コルベンに検体尿 10 cc を正確に採り, 5% 水酸化ナトリウム 2 cc, 沸騰石少々, 精製パラフィン約 0.1 g を加え, 約 15 分間金網付アスベストを乗せた電熱器* 上で加熱する (蒸発乾固寸前まで). 室温にまで冷却後, ピペットにて 10 cc のメスコルベンに移し, 脱イオン水で水洗しながら正確に 10 cc とする.

4.2 カリウム測定操作

脱アンモニア操作を経た検体尿を正確に 1 cc 採取し, 内容約 15 cc の試験管中で DPA-試液 3 cc を加え, 約 30 秒間ガラス棒でかきまぜる. 45 分間 0°C に保ち (氷冷), 東洋汙紙 No. 51 で自然口過 (流出の当初および最後の各 0.5 cc ずつを廃棄) した口液の 0.2 cc を採取し, 脱イオン水で 500 倍に希釈する. 液層 1 cm, 420 $\text{m}\mu$ における吸収値を測定し, 検量線よりカリウム値を求める. なお, 検量線は DPA-試薬調製ごとにとることが望ましい.

5 結 語

本法は従来の多くの DPA 法における場合と異なり, 沈殿の定量的口別を必要としない. 溶媒としては水のみを使用し, 発色その他の複雑な反応を含まず, かつ検液の呈色は安定で, 少なくとも 24 時間以内には変化が見られない. さらに, 炎光法のごとき特殊の機械器具を必要とせず, また, 試薬はすべて入手が容易である. 本法は以上のごとき多くの利点を有するものであり, 尿中カリウムの定量法として簡単かつ精度の高い方法といえよう.

(昭和35年11月, 本会北海道支部第6回研究発表会講演)

* 実際上バーナーよりも好適である.

文 献

- 1) N. S. Poluektoff: *Microchemie*, **14**, 265 (1934).
- 2) C. J. Van Nieuwenberg, Miss T. van der Hoek: *ibid.*, **18**, 175 (1935).
- 3) F. Feigl: "Spot-test", (1958).
- 4) 佐藤省三: 化学の領域, **2**, 271 (1948).
- 5) A. Winkel, H. Maas: *Z. angew. Chem.*, **49**, 827 (1936).
- 6) J. Kielland: *Ber.*, **71**, 220 (1938).
- 7) I. M. Kolthoff, G. H. Bendix: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **11**, 94 (1939).
- 8) 木羽敏泰: 日化, **60**, 1073 (1939).
- 9) 佐藤省三: 同上, **72**, 489 (1950).
- 10) H. Sueda, M. Kaneko: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **16**, 137 (1941).
- 11) P. R. Lewis: *Analyst*, **80**, 768 (1955).
- 12) C. R. Harington: *Biochem. J.*, **35**, 545 (1941).
- 13) E. Amdun: *Anal. Chem.*, **12**, 731 (1940).
- 14) E. Bois, M. Jean: *ibid.*, **25**, 727 (1954).
- 15) E. Gastinger: *Z. anal. Chem.*, **140**, 335 (1953).
- 16) K. Riedler, L. Schreiner: *Chem. Teck. (Berlin)*, **11**, 593 (1959).
- 17) W. Köhn: *Z. anal. Chem.*, **128**, 1 (1947).
- 18) 井出勝彦, P. S. Elskop: 小児科臨床, **10**, 741 (1957).
- 19) Y. Yasumori: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **24**, 107 (1951).
- 20) B. Sadberg: *Svensk Kem.*, **58**, 197 (1946).
- 21) 佐藤省三: 日化, **72**, 450 (1950).
- 22) G. F. Lothian: "Absorption Spectrophotometry", Chapter IV, (1949), (Hilger, London).
- 23) E. J. Hoffman, P. A. Dame: *J. Am. Chem. Soc.*, **41**, 1013 (1919).

☆

Colorimetric determination of urinary potassium with dipicrylamine. (Fundamental studies on clinical samples with organic reagents. III. Determination of inorganic ions in biological samples with organic reagents. 1) Michiya KIMURA, Tadamasu HIRAYAMA and Fumiko MAEJIMA (Faculty of Pharmaceutical Sciences, School of Medicine, Hokkaido University)

Determination of K^+ in urine by use of sodium dipicrylamine has been investigated, and a simple colorimetric method was presented. Addition of an aqueous solution of sodium dipicrylamine to the urine resulted in quantitative precipitation of K salt, and the method was based on the fact that the light absorbancy of the filtrate at 420 $\text{m}\mu$ (Fig. 1) was inversely related to the concentration of K^+ .

Although the presence of a large amount of NH_4^+ in the urine interfered with the reaction, the influence was removed by boiling off ammonia with NaOH. Good reproducibilities were obtained for the concentrations of 50~200 mg% of K^+ (Table III), and the recovery of K^+ added into the urine was 96.7% (Table IV).

(Received May 4, 1961)