マラカイトグリーンを用いる尿中のタリウムの比色定量

鈴木 俊 雄*

最近、タリウム化合物が殺そ剤などに使用されて以来、タリウム中毒患者の発生がしばしばみられるようになり、その治療上尿中のタリウムの微量定量法がすこぶる重要となった。著者は、マラカイトグリーンをタリウムの比色試薬とする定量法を検討し、従来のヨウ素法およびメチルバイオレット法などに比べて再現性、感度の点ですぐれていることがわかった。尿を一定量とり、同量の濃硝酸を加えて蒸発乾固したのち、臭素水でタリウムを酸化後イソプロピルエーテルで 0.5~1.0*N* 臭化水素酸溶液から抽出分離する。エーテル相を分離蒸発後、残留物を 1.5*N* 塩酸 10 ml に溶かして分液ロートに移し、これに 0.2% マラカイトグリーン溶液を 1 ml 加え、さらにベンゼンを 10 ml 正確に加えて激しく振とうする。ベンゼン相を 10 mm セルにとり、635 m μ の波長で吸光度を測定してタリウムを定量する。実際にタリウム中毒患者の尿について本法による定量法を応用したところ良好であった。

1 緒 言

最近、タリウム化合物が殺そ剤などに使用されて以来、タリウム中毒の発生がしばしばみられるようになり、その治療上尿中のタリウムの微量定量法がすこぶる重要となった。従来、尿中のタリウム定量法として、ヨウ素法¹⁾、メチルバイオレット法²⁾、ジチゾン法³⁾、ローダミンB法⁴⁾、炎光光度法⁵⁾などの報告があるが、再現性、感度の点でやや難点がある。著者は感度においてメチルバイオレット法、ローダミンB法よりすぐれているマラカイトグリーン試薬を用いるタリウム定量法を検討した。

従来、タリウムに対するマラカイトグリーンへの検討は十分でなく、ただ pH 1.0 緩衝溶液中でタリウム(III)をマラカイトグリーンで発色させた報告⁶⁾があるのみである。著者の検討により、タリウム(III)を 1.5*N* 塩酸酸性溶液中でマラカイトグリーンで発色させたのち、ベンゼンで抽出するほうがブランク値が非常に低く、呈色はきわめて安定で、かつ再現性のよいことが確かめられた。そこで、この方法を尿中のタリウムの定量法に応用したところ、良好な結果が得られたので報告する。

2 試薬および装置

2.1 試 薬

タリウム標準溶液：特級硝酸第一タリウム 0.1308 g を 0.5*N* 硝酸 100 ml に溶かしたものを原液とし、使用のつど原液から 1 ml をとり、蒸留水で 100 ml にうすめて使用した。この希釈溶液 1 ml はタリウム 10 μ g を

含む。

マラカイトグリーン溶液：マラカイトグリーンシュウ酸塩試薬(独 Farbenfabriken Bayer)を水に溶かして、0.2 w/v % 水溶液とした。

イソプロピルエーテルおよびエチルエーテル：それぞれ 1 級品を蒸留して精製したものを使用し、使用前に 1.0*N* 臭化水素酸溶液と振とうしておく。

ベンゼン、塩酸、硝酸、臭化水素酸その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2.2 装 置

吸光度の測定は、島津光電分光光度計 QR-50 形(セルは 10 mm)を、振とう機は、イワキ KM 式万能シェーカー S-L 形を、遠心分離器は、国産遠心器 KK 製 H 120 形(3000 rpm)をそれぞれ使用した。

3 定量条件の検討

3.1 マラカイトグリーン比色法の検討

マラカイトグリーンは、ガリウムの比色試薬として十分検討されている⁷⁾が、タリウムの比色試薬としては、一部の報告⁶⁾があるのみで不完全であるので、その定量法を次に検討した。

3.1.1 比色定量操作 一定量のタリウム標準溶液(0~10 μ g)をビーカーにとり、1.5*N* 塩酸溶液 1~2 ml、飽和臭素水数滴を加えたのち、おだやかに加熱して、タリウムを 3 価に酸化するとともに遊離した臭素を除去する。冷却後分液ロートに移し入れ、0.2% マラカイトグリーン溶液 1 ml、さらに 1.5*N* 塩酸を加えて 10 ml としたのち、ベンゼンを正しく 10.0 ml 加え、約 30 秒間振り混ぜる。水相を捨て、ベンゼン相を遠心器にかけて、有機相中の水滴を除いてから、635 m μ の波長でベンゼン

* 新潟大学理学部化学教室：新潟市西大畑町

ンを対照として吸光度を測定してタリウムを定量する。

3.1.2 吸収曲線 タリウムを $10\mu\text{g}$ とし、3.1.1 操作法で得た Tl-マラカイトグリーン錯体のベンゼン溶液の吸収スペクトルを Fig. 1 の I に示し、試薬ブランクを Fig. 1 の II に示した。Fig. 1 から $637.5\text{m}\mu$ に吸収極大がみられるが、以後の実験にはすべて $635\text{m}\mu$ の波長を用いた。

Fig. 1 Absorption spectrum of Tl-Malachite Green complex in benzene solution

Curve I: Tl $10\mu\text{g}$ II: Reagent blank
Reference: Benzene

3.1.3 塩酸濃度の影響 タリウム $10\mu\text{g}$ を発色抽出する場合の塩酸濃度の影響を Fig. 2 に示す。なお、試薬のブランクも合わせて記した。Fig. 2 から、塩酸濃度 $0.5N$ 以下は吸光度はやや大きい酸濃度の影響がはなはだ大きい。しかも、水相は青色溶液となり、これが一部ベンゼン相に分配されるためブランク値が若干増加する傾向がある。それに対して、塩酸濃度 $0.5\sim 2.5N$ になると酸濃度の影響はほとんどなく、ブランクの吸収はほとんど無視できるほどである（塩酸 $1.5N$ 溶液でのブランク値は 0.002 ）。以後の実験は、 $1.5N$ 塩酸濃度とし、試薬ブランクが少ないためベンゼンを対照液として吸光度を測定した。

3.1.4 呈色の安定度 タリウム $10\mu\text{g}$ をとり、 $0.1N$ および $1.5N$ 塩酸溶液からそれぞれ発色させたのち、ベンゼンで抽出したものの呈色の安定度を調べた結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より、 $1.5N$ 塩酸溶液から発色抽出したほうが、 $0.1N$ 塩酸溶液のそれよりも、はるかに

Fig. 2 Effect of hydrochloric acid concentration on absorbance of the organic phase

Curve I: Tl $10\mu\text{g}$ II: Blank
Reference: Benzene

Fig. 3 Effect of standing time on the absorbance

Tl: $10\mu\text{g}$
Curve I: Extraction from $1.5N$ hydrochloric acid
II: Extraction from $0.1N$ hydrochloric acid

に呈色の安定度がすぐれていることがわかった。従来のタリウムのマラカイトグリーン法⁹⁾は $\text{pH } 1.0$ 程度の酸濃度から発色するため酸濃度の影響が大きく、また呈色が不安定である欠点がある。ゆえに $1.5N$ 塩酸溶液から発色抽出するほうがすぐれている。

3.1.5 試薬濃度と抽出溶媒の影響 タリウム $10\mu\text{g}$ に対して、 0.2% マラカイトグリーン水溶液の容量に対する吸光度の変化を Fig. 4 に示す。また、Tl-マラカイトグリーン錯体を種々の抽出溶媒で抽出した結果を Table I に示す。

Fig. 4 から試薬量を 1ml とし、また Table I より抽出溶媒にベンゼンを用いた。

Fig. 4 Effect of Malachite Green concentration

Curve I: Tl 10 μ g II: Blank
Reference: Benzene

Table I Effect of solvent on extraction

Solvent	Vol. ratio of mixed solvent	Tl (μ g)	Absorbance	Reference
Benzene	—	10	0.544	Benzene
"	—	0	0.002	"
Chlorobenzene-CCl ₄	3:1	10	0.656	Chlorobenzene
"	"	0	0.256	"
Isopropyl ether	—	10	0.151	Isopropyl ether
Benzene-isopropyl ether	3:1	10	0.554	Benzene
"	"	0	0.004	"

Vol. of solvent: 10.0 ml, Shaking time: 30 sec.

3-1-6 呈色における温度と水相の容量の影響 マラカイトグリーンでタリウムを⁹⁾、ローダミンBでタリウムを⁸⁾それぞれ比色定量する場合、それぞれの錯体が完全に有機相に抽出されないため、水相の容量および温度を規制する不便さがある。本法において、これらの影響を調べた結果を Fig. 5 の I および II に示す。これらの結果より、抽出時の温度および水相の容積の影響はほとんどないことが知られる。

3-1-7 検量線 以上の検討により、タリウムの検量線を作成した結果を Fig. 6 に示す。タリウム 0~10 μ g の範囲でよくベールの法則に従い、再現性もきわめてよいことがわかった。

3-1-8 他の比色法との比較 現在、タリウムの比色定量に最も広く用いられているローダミンB法⁸⁾およびメチルバイオレット法¹⁰⁾と本法の感度を比較した結

Fig. 5-I Effect of temperature on extraction

Tl: 10 μ g

Temperature of measurement of absorbance: 18~20°C

Fig. 5-II Effect of aqueous phase volume

Tl: 10 μ g, Volume of organic phase: 10 ml

Fig. 6 Calibration curve

果を Table II に示す。Table II より、マラカイトグリーン法が感度において、他の二法よりすぐれていることがわかる。

Table II Sensitivity of Tl determination

Method	Wavelength (m μ)	Sensitivity† (μ g Tl/cm ²)
Rhodamine B	560	0.0023 ⁹⁾
Methyl Violet	620	0.0032 ¹⁰⁾
Malachite Green	635	0.0018

† Micrograms of Tl in a column of solution of 1 cm² cross section giving an absorbance of 0.001

3.2 尿の分解とタリウムの分離法の検討

3.2.1 尿の分解 尿を一定量 (10~20 ml) ビーカーにとり、これに同量の濃硝酸 (比重=1.38) を加えて加熱板上に静かに蒸発乾固する。残留物が黒味をおびているならば、さらに濃硝酸を約 5 ml 加えふたたび蒸発乾固し、この操作を蒸発残留物が淡黄色になるまでくり返す。この操作により、尿中の有機物はほとんど分解され、しかも加熱によるタリウムの損失もないことが確かめられ、従来の煩雑な操作よりもすみやかに処理することができた。

3.2.2 タリウムの分離 尿中のタリウムの分離法として、操作法の簡単な臭化水素酸溶液からのエーテル抽出法を採用した。なお、タリウム (I) はエーテルに不完全にしか抽出されない⁹⁾ ので、あらかじめ臭素水でタリウム (III) に酸化してから、次の操作で抽出条件を検討してみた。

タリウムを一定量とり、飽和臭素水で酸化後、これに臭化水素酸溶液を加えて 20 ml とし、さらに同量のエチルエーテルを加えて 30 秒間激しく振り混ぜたのち、水相中のタリウムを上述の比色法または pH 5 でキシレノールオレンジ指示薬を用いる キレート滴定法¹²⁾ で求めて、臭化水素酸濃度による抽出百分率を計算した結果を Table III に示す。

Table III より、mg および μ g のタリウム量はいずれも 99% 以上の抽出率を示し、和田¹¹⁾らの結果とほとんど同じ傾向を示した。イソプロピルエーテルを用いてもエーテルとほとんど同様な結果が得られた。なお、抽出の際に塩化ナトリウムを 1 g 共存させても、タリウムの抽出率には全く影響がなかった。以後の実験には、イソプロピルエーテルを用いて、0.5~1.0N 臭化水素酸溶液からタリウムを抽出した。タリウムの酸化に使用する臭素水の過剰の存在は、タリウムの抽出率をやや低めることが知られたので、加熱揮発法またはスルホサリチ

ル酸 (またはフェノール) を加えることにより、過剰の臭素を除去した。

Table III Extraction of Tl(III) as a function of hydrobromic acid concentration

Tl taken	HBr concentration(N)	Tl extracted(%)
11.0 mg	1.0	99.7
" "	0.5	99.5
" "	0.3	99.5
" "	0.1	99.3
10.0 μ g	1.0	99.4
" "	0.5	99.2

Ether was pre-equilibrated with HBr by shaking with an equal volume of 1N HBr.

4 尿試料の分析

4.1 分析操作

以上の実験の結果次の分析法を確立した。

尿 20 ml を 100 ml ビーカーにとり、これに同量の濃硝酸を加え静かに蒸発乾固する。残留物が黒味をおびているならばさらに濃硝酸を追加しふたたび蒸発乾固し、この操作を残留物が淡黄色になるまでくり返す。残留物を 1N 臭化水素酸 10 ml に溶かし、これに飽和臭素水 5 滴を加えおだやかに加熱して、タリウムを酸化する。ついで、10%スルホサリチル酸 (またはフェノール) を加えることにより、過剰の臭素を除去する。これを 40 ml 分液ロートに移し、同量のイソプロピルエーテルを加え、約 1 分間振とうしてタリウム (III) をエーテル相に抽出する。水相を捨て、エーテル相を 50 ml ビーカーに移し、静かに熱してエーテルを除く。残留物を 1.5N 塩酸溶液 10 ml に溶かし、ふたたび分液ロートに移し、0.2% マラカイトグリーン溶液を 1 ml 加え、さらにベンゼンを 10.0 ml 正確に加えて 30 秒間激しく振とうし、Tl-マラカイトグリーン錯体をベンゼン相に抽出する。分相後ベンゼン相を遠心機にかけたのち 10 mm セルにとり、635 m μ の波長でベンゼンを対照として吸光度を測定し、3.1.1 操作法により求めた検量線によりタリウム量を求める。

4.2 尿試料の定量

あらかじめ分光分析的にタリウムの全く認められない正常な尿一定量に既知量のタリウムを添加したのち行なった定量結果を Table IV に示す。Table IV から、再現性もよく満足な結果が得られる。

よって、実際のタリウム中毒患者 (♂および♀) について、尿を 10~20 ml ずつとり本法によりタリウムを定量し、治療の経過とともに記した一例を Table V に示す。

Table IV Determination of Tl in urine by the recommended procedure

Vol. of urine (ml)	Tl added to urine (μ g)	Absorbance	Tl found (μ g)	Error (μ g)
20	0	0.002	0	0
20	10	0.543	10.0	0
20	10	0.539	9.9	-0.1
20	10	0.545	10.0	0
20	5	0.267	4.9	-0.1
20	2	0.115	2.1	+0.1
20	1	0.051	1.0	0

Reference : Benzene

Table V Analytical results of urine samples of patients

Urine sample of patient	Vol. of urine (ml)	Date	Tl found (ppm)	Spectrographic test† (Intensity of 3519.24Å)
♂	10	Jan. 16, 1964	0.48	++ (visible)
"	"	" 18, "	0.44	++ (")
"	"	" 29, "	0.20	+ (")
"	20	Feb. 1, "	0.14	+ (")
"	"	" 6, "	0.12	+ (")
"	"	" 23, "	0	- (not visible)
♀	10	Jan. 30, "	0.20	+ (visible)

† Spectrographic test was made by using a Shimadzu quartz spectrograph QF 60 under the following conditions: Excitation 100V D. C. arc, 9A; Exposure time 30 sec.

終りに、本研究にご指導を賜った新潟大学理学部化学教室小山誠太郎教授、外林 武助教授、また尿試料を提供され有益な助言をいただいた同大学医学部小児科教室鈴木好文氏に感謝します。

文 献

- 1) F. D. Snell, C. T. Snell : "Colorimetric Methods of Analysis", Vol. IIA, p. 19 (1959), (D. Van Nostrand Co., Inc. Princeton, New Jersey).
- 2) E. E. Campbell, M. F. Milligan, J. A. Lindsey : *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **20**, 23 (1959).
- 3) A. Dyfverman : *Anal. Chim. Acta*, **21**, 357 (1959).
- 4) F. Rappaport, F. Eichhorn : *Clin. Chim. Acta*, **2**, 16 (1957) ; *Chem. Abstr.*, **51**, 9768 (1957).
- 5) W. B. Stavinoha, J. B. Nash : *Anal. Chem.*, **32**, 1695 (1960).
- 6) 松尾 力, 船田俊佑 : 本誌, **12**, 521 (1963).
- 7) J. Jankovský : *Talanta*, **2**, 29 (1959).
- 8) H. Onishi : *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 567 (1957).
- 9) E. B. Sandell : "Colorimetric Determination of Traces of Metals", 3rd Ed., p. 826 (1959), (Interscience Publishers Inc., New York).
- 10) S. D. Guřev : *Sbornik Nauch. Trudov Gosudarst. Nauch.-Issledovatel. Inst. Tsvetnykh Metal*, **10**, 371 (1955) ; *Anal. Abstr.*, **3**, 3301 (1956).
- 11) 和田猪三郎, 石井頼三 : 理化学研究所彙報, **13**, 264 (1934).
- 12) 上野景平 : "キレート滴定法", p. 318 (1960), (南江堂).

☆

Photometric determination of thallium in urine with Malachite Green. Toshio SUZUKI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Niigata University, Nishiōhata-cho, Niigata)

In the study of thallotoxicosis, it has become necessary to determine accurately a low thallium content of urine. A method has been developed for the determination of thallium with malachite green. After wet ashing of the urine sample by conc. nitric acid, the residue is dissolved in hydrobromic acid and saturated bromine water is added to oxidize thallium to the trivalent state. Thallium is extracted with isopropyl ether from a 0.5~1.0N hydrobromic acid solution. The aqueous phase is discarded, and the organic phase is evaporated.

The residue is dissolved in 10ml of 1.5N hydrochloric acid and the solution is transferred to a separatory funnel. One ml of 0.2% Malachite Green solution and 10.0ml of benzene are added, and the system is shaken for 30 sec. The organic phase is centrifuged, and the absorbance is measured at 635 m μ . Known amounts of thallium added to urine sample were recovered satisfactorily by this method.

(Received Aug. 19, 1964)