トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオン によるサリチル酸の溶媒抽出吸光光度定量法*

山本 勇麓, 熊丸 尚宏, 林 康久, 大槌 光枝**

(1968 年 8 月 30 日受理)

著者らは有機陰イオンを有色の金属キレート陽イオンとともに有機溶媒に抽出して、有機相における金属キレートの吸光度を測定することによって当該陰イオンを比色定量する方法について一連の系統的な研究を行なっている^{1)~3)}。本報はその一環として、トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンを用いるサリチル酸の抽出吸光光度定量法を検討したものである。

トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンは微量のサリチル酸陰イオンとともにニトロベンゼンに抽出され、516 m μ に極大吸収を示す。pH 5.5~9.5 の範囲において、トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオン濃度がサリチル酸に対して 50 倍モル以上であれば、最大一定の抽出が得られ、また水相中のサリチル酸濃度が $8 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-5} M$ の範囲でベール則に従うことがわかった。共存物質として食品衛生法でその使用が許可されている合成保存料、人工甘味料、サリチル酸類縁化合物などについて、それらの影響を検討したところ、サッカリン、サイクラミン酸ナトリウムは正誤差を与えるが、デヒドロ酢酸、安息香酸、ソルビン酸などの保存料は 5~30 倍モル存在しても影響しないことを認めた。この方法を市販清酒中のサリチル酸の定量に応用した結果、公定法の紫外吸収法による定量結果と良好な一致を示した。

1 緒 言

サリチル酸の定量法としては、保存料試験法として公定法⁴⁾に採用されている鉄みようばんによる比色法および紫外吸収スペクトル法があり、そのほか、中和滴定¹⁰⁾、ポーラログラフィー¹¹⁾による定量法などが知られている。サリチル酸は防腐剤として指定食品に添加されているが、最近サリチル酸の人体に対する影響が重要視されている現状にかんがみ、サリチル酸の新しい定量法の開発を目的として、トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンを用いるサリチル酸の吸光光度定量法を検討したものである。トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンは、水相中の微量のサリチル酸の陰イオンと会合イオン対をつくり、選択的にニトロベンゼン相に抽出され、かつ有機相の赤色(極大吸収波長: 516 m μ)の強度が水相のサリチル酸の濃度に比例することを見いだした。このような現象に基づいてサリチル酸を比色定量する場合の基礎的条件を検討した結

果、水相中のトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンの濃度をサリチル酸の 50 倍モル以上、pH 5.5~9.5 に保って抽出すれば、 $8 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-5} M$ の濃度範囲でサリチル酸を定量しうることを確認した。

次に、この方法を実試料に応用する試みとして、サリチル酸が食品保存料として特に酒類および食酢についてのみその使用が許可されている¹²⁾ことから、ここでは特に清酒中に添加されている微量のサリチル酸の定量を行ない、公定法のうち広く採用されている紫外吸光光度法と比較検討した。その結果、両者による定量値は良好な一致を示し、さらに本法のほうが感度が高いことがわかった。またさらに、著者らは本法と同様の原理に基づいたバトフェナントロリン-鉄(II) キレート陽イオンによるサリチル酸の溶媒抽出吸光光度定量法を報告した¹⁾。バトフェナントロリン-鉄(II) キレート陽イオンによる方法は本法に比較して感度がさらに高い点に特長があるが、試薬が高価であり、操作がやや煩雑であることを考慮すると、本法のほうが実用であると考えられる。

2 実 験

2.1 装 置

(1) 分光光度計: 日立製 139 型分光光度計, 吸収セ

* 金属キレート陽イオンによる陰イオンの溶媒抽出(第 33 報)。第 32 報は山本勇麓, 岡本信子, 峠 暎二: 日化, 89, 399 (1968)

** 広島大学理学部化学教室: 広島市東千田町

ルはガラス製すり合わせキャップ付き 10 mm のものを使用した。

(2) pH メーター: 日立-堀場製 H-5 型ガラス電極 pH メーターを使用した。

(3) 振り混ぜ器: イワキ製 KM 型を使用した。

2.2 試 薬

(1) サリチル酸標準溶液: エタノール-水混合溶媒で再結晶して精製したサリチル酸 (mp 158~159°C) の 0.3488 g を水に溶かして 250 ml とし $1.00 \times 10^{-2} M$ の貯蔵液を調製した。なお, サリチル酸の希薄溶液は中性またはアルカリ性で保存すると時間とともにその濃度が減少する傾向を示すが, 一方, pH 2 以下の酸性溶液では, そのような変化は認められないのでサリチル酸の貯蔵液は硫酸酸性 (pH 1.7) に保つこととした。実験に際しては $2.0 \times 10^{-4} M$ にうすめて用いた。

(2) トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) 硫酸塩溶液: 1,10-フェナントロリンの 7.929 g と硫酸第一鉄アンモニウム (モール塩) の 3.922 g を希硫酸に溶かしたのち, 水で 1000 ml に希釈しトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) として $1.0 \times 10^{-2} M$ の溶液 (pH 2~3) を調製した。

(3) 緩衝溶液: 0.3M リン酸二水素カリウム溶液と 0.3M リン酸二水素ナトリウム溶液を適当に混合して調製した。

(4) その他の試薬類: 市販の特級品をそのまま用いた。

2.3 標準操作

分液漏斗に 0.3M リン酸塩緩衝溶液 (pH 6) の 5 ml, サリチル酸標準溶液 ($2.0 \times 10^{-4} M$) の 5 ml, トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) 溶液 ($1.0 \times 10^{-2} M$) の 8 ml を加え, 蒸留水で 25 ml に希釈したのち, ニトロベンゼンの 10 ml を加えて約 2 分間振り混ぜる。分相のため約 30 分間静置したのち, 有機相を分離し, 無水硫酸ナトリウム 1 g で脱水し, 試薬ブランクまたはニトロベンゼンを対照として, 516 mμ の吸光度を測定する。

3 結果と考察

3.1 吸収スペクトル

操作 2.3 に従って得られた有機相の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。曲線 1 および 2 は, それぞれ水相中にサリチル酸が存在する場合およびサリチル酸が存在しない場合について, ニトロベンゼンを対照として測定したものである。Fig. 1 からわかるように, このような条件では赤色のトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンは微量のサリチル酸が存在するときはじめてニトロベンゼンに抽出されるが, サリチル酸が存在しないと, ほとんど抽出されないことが明らかである。ま

Fig. 1 Absorption spectra

1—Spectrum of the extract with salicylic acid, Aqueous phase: 25 ml [$\text{Fe}(\text{phen})_3$ $3.2 \times 10^{-3} M$, salicylic acid $4.0 \times 10^{-5} M$, buffer (pH 6) 0.06M], Organic phase: 10 ml (Nitrobenzene); 2—Spectrum of the extract without salicylic acid; Reference: Nitrobenzene

た, 有機相における抽出種の極大吸収波長は 516 mμ であり, 以後の実験では 516 mμ を測定波長として用いることにした。

3.2 抽出に及ぼす pH の影響

2.3 の操作で水相の pH を種々変化させて, 抽出後の有機相の吸光度を測定した。pH の調整は 0.3M リン酸二水素カリウム-リン酸二水素ナトリウム系緩衝溶液を用い, 低い pH では硫酸, 高い pH では水酸化ナトリウム溶液を併用した。Fig. 2 に示すように pH 5.5~9.5 の間で最大かつ一定の抽出が得られる。

一方, サリチル酸の pK_1 は 2.98, pK_2 は 13.61 であり¹³⁾, この値から計算すると pH が 5.5~9.5 の範囲では, サリチル酸は 1 価の陰イオンとして存在していることになる。このことから, この場合サリチル酸は 1 価の陰イオンとして, トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンとイオン対を形成して抽出されることが考えられる。

3.3 トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート濃度の影響

2.3 の操作に従って, トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレートの添加量を種々変えたときの抽出率

Fig. 2 Effect of pH on the extraction of salicylic acid and its homologues

1: Salicylic acid; 2: Benzoic acid; 3: Phenol; 4: *p*-Hydroxybenzoic acid; Concentration: $4.0 \times 10^{-5} M$; Reference: Reagent blank

動を調べた。その結果を Fig. 3 に示す。これより、トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート溶液の濃度が $2.0 \times 10^{-3} M$ 以上、すなわち、サリチル酸に対して 50 倍モル以上の濃度であれば一定の抽出が得られる

Fig. 3 Effect of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) concentration

Concentration of salicylic acid: $4.0 \times 10^{-5} M$; Reference: Reagent blank

ことがわかる。この実験ではトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート溶液の濃度を $3.2 \times 10^{-3} M$ に保つことにした。

3.4 振り混ぜ時間

2.3 の操作において、振り混ぜ時間について検討した。その結果、1 分間以上の振り混ぜ時間で吸光度は最大一定となり、抽出はきわめてすみやかに平衡に達することを認めた。この実験においては便宜上、2 分間振り混ぜることにした。

3.5 呈色の安定性

2.3 の操作において、サリチル酸の濃度を $4.0 \times 10^{-5} M$ および $2.0 \times 10^{-5} M$ に保って抽出を行ない、得られた有機相の室温における呈色の経時変化を調べたところ、有機相の吸光度は抽出後少なくとも 3 時間はほとんど一定であり、呈色はかなり安定であることがわかった。

3.6 検量線

以上の諸条件を検討した結果から 2.3 の標準操作を定めた。2.3 の操作において、サリチル酸標準溶液の添加量を変化させて試薬ブランク対照で 516 mμ の吸光度を測定する。その結果は Fig. 4 に示すように水相中のサリチル酸の濃度が $8 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-5} M$ の範囲でベール則を満足している。

Fig. 4 Calibration curve

Reference: Reagent blank

この標準操作に従って8回のくりかえし精度を求めた結果, サリチル酸の濃度が $4.0 \times 10^{-5} M$ の水準で, すなわち, 平均吸光度 0.413 で標準偏差は 0.5% であった. また, 抽出時の温度による影響も少なく $10 \sim 30^\circ C$ の実験範囲では, 試薬ブランクを対照とする場合ほとんど吸光度に変化はみられなかった.

3.7 溶媒の選択

2.3 の標準操作において, サリチル酸濃度を $4.0 \times 10^{-5} M$ に保ち, 抽出溶媒として, ニトロベンゼンのほかにクロロベンゼン, ベンゼン, クロロホルム, 四塩化炭素, 1,2-ジクロロエタンなどの溶媒について, 抽出の挙動を観察した結果, ニトロベンゼン以外の溶媒にはほとんど抽出されなかった. したがって, 本実験ではニトロベンゼンを最適溶媒として用いることにした.

3.8 抽出種の組成

3.2 においても考察したように, この抽出においては, トリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンとサリチル酸の1価の陰イオンが会合イオン対を形成してニトロベンゼンに抽出されると考えられる. このことを確かめるために pH 6 においてトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) 硫酸塩とサリチル酸の混合比を

Fig. 5 Continuous variation plots at pH 6

1: 516 mμ; 2: 480 mμ; Total concentration: $1.2 \times 10^{-3} M$; Reference: Reagent blank

種々変えて, 連続変化法による検討を行なった. その結果を Fig. 5 に示す.

これからトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンとサリチル酸の陰イオンとのモル組成比は 1:2 であることがわかる. したがって, サリチル酸の解離種のうち1価の陰イオンが抽出に関与することが明らかであり, 抽出種の化学形は, $[Fe(phen)_3]^{2+} \cdot [C_6H_4(OH)COO^-]_2$ と推定される.

3.9 共存物質の影響

2.3 の操作に従ってサリチル酸を定量する場合, 多量のリン酸イオン, 硫酸イオン, ホウ酸イオンなどの無機陰イオンが共存しても影響しないことは既報^{2,4)}の場合と同様である. ここでは特に食品衛生法で許可されている合成保存料, 人工甘味料, その他の食品添加物およびサリチル酸類縁化合物が共存する場合について検討を行なった. その結果を Table I に示す.

Table I Determination of salicylic acid in the presence of various substances

Substance	Mole ratio to SA	Recovery of SA (%)
Dehydroacetic acid	{ 5 10	102 113
Potassium sorbate	30	106
Nitrofurazone	1	100
Benzoic acid	5	105
Phenol	10	102
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	10	103
Saccharose	500	101
Dulcin	10	108
Sodium cyclamate	0.5	125
Saccharin sodium	0.1	115
Glycine	1000	118
Sodium glutamate	1000	105
Sodium citrate	100	100
Sodium chloride	50	116
Sodium bicarbonate	50	110
Potato starch	500 (weight ratio)	105

Salicylic acid (SA): $4.0 \times 10^{-5} M$

クエン酸, グルタミン酸ナトリウム, でん粉, グリシンなどはサリチル酸に対して 100~1000 倍モル共存しても影響は認められない. 一方, サイクラミン酸, サッカリン酸はサリチル酸と同様にトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II) キレート陽イオンとともにニトロベンゼンに抽出され^{2,3)} 正誤差を与える. 保存料としてのデヒドロ酢酸については同様にして定量できることをさきに報告した⁴⁾. しかし, 定量感度が低いことに加えて本法では低い pH で抽出を行なうので 5 倍モル程度の共存は

影響しないことがわかった。なお、そのほか β -ナフトールについても検討したが、pH 10 以上でわずかに抽出される程度であり、本実験の pH 6 における抽出では全然妨害しないことがわかった。さらに、ホルマリン、ヘキサミン、メナジオンおよびエステル類などは陰イオンを形成しにくいので、糖類などと同じように多量共存しても障害しないものと考えられる。

一方、サリチル酸を工業的に製造する場合、その試料には類縁化合物である安息香酸、フェノール、*p*-ヒドロキシ安息香酸がきょう雑し、サリチル酸と同様に抽出され妨害するおそれがある。そこで、この三者については特に抽出の pH 変化を調べた。その結果は Fig. 2 に合わせて示したように、これらの類縁化合物はサリチル酸と同量程度共存しても pH 8 以下ではほとんど抽出されず、妨害しないことが明らかである。

4 清酒中のサリチル酸の分析

以上のような種々の基礎的条件を検討した結果、サリチル酸の定量にじゅうぶん利用できることがわかったのので、実試料への応用の 1 例として清酒市販品中のサリチル酸の定量を試みた。

4.1 清酒中のサリチル酸の分離定量

公定法⁹⁾ではサリチル酸をエーテル抽出によって分離したのち、紫外法による定量法が規定されているので本法を適用する前にまず公定法によって分離を行なった。

4.1.1 サリチル酸の分離 試料の 100 ml を正確にとり、10% 水酸化ナトリウム溶液を加えてアルカリ性とし、これを約 30 ml になるまで水浴上で蒸発濃縮し、アルコールを除去する。次に蒸留水を加えて 100 ml としたのち、そのうちの 50 ml を分液漏斗にとり、液がアルカリ性を呈するときは、10% 塩酸溶液で中和したのち、さらに 10% 塩酸溶液 2 ml を加え、50 ml のエーテルで 2 回抽出する。ついで、有機相を蒸発さらに移し、エーテルの大部分を留去したのち、自然に揮散させ残留物をサリチル酸の定量に供試する。

4.1.2 公定法 (UV 法) による定量 4.1.1 で得られたエーテル蒸発残留物をエチルアルコールに溶解し 200 ml とする。これから 25 ml をとりアルコールで 100 ml に希釈して 305 m μ における吸光度を測定する。別にサリチル酸を含まない清酒中にサリチル酸標準溶液を加えて同様の操作によって得られた検量線を用いてサリチル酸を定量する。

4.1.3 本法による定量 4.1.1 によって得られたエーテル蒸発残留物を少量の温湯に溶かし、蒸留水を加え

て 500 ml に希釈する。これから 5 ml をとり、2.3 の標準操作に従ってニトロベンゼン相の吸光度を測定する。別にサリチル酸を含まない清酒中にサリチル酸標準溶液を加えて同様の操作によって得られた検量線からサリチル酸を定量する。

4.2 定量結果

本法ならびに公定法により 3 種類の市販清酒 (1 級) 中のサリチル酸の定量を行なった結果を Table II に示す。これより 3 社の市販品はいずれもサリチル酸の法定添加限度 0.25 g/l ($1.81 \times 10^{-3} M$)⁹⁾ の範囲内にあることがわかる。

本法による結果は紫外吸収法のそれと良好な一致を示しているが、紫外吸収法に比べ感度が高く、したがって試料採取量を少なくすることもでき、選択性もすぐれていることなどが特長である。

Table II Determination of salicylic acid in Japanese Sake

Maker	Salicylic acid (g/l)	
	Proposed method	Official (UV) method
A	0.244	0.239
	0.242	0.242
B	0.138	0.135
	0.137	0.138
C	0.159	0.151
	0.156	0.152

文 献

- 1) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 坪内正弘, 沖村一三: 本誌, **16**, 937 (1967).
- 2) Y. Yamamoto, T. Kumamaru, Y. Hayashi, T. Kobayashi, R. Tanaka: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **15**, 1437 (1967).
- 3) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 山手万知子: 薬誌, **88**, 28 (1968).
- 4) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 登 芳男: 同上, **87**, 1346 (1967).
- 5) 山本勇麓, 岡本信子, 峠 咲二: 本誌, **14**, 343 (1965).
- 6) 小辻奎也, 桜井俊之, 山本勇麓: 日化, **86**, 519 (1965).
- 7) Y. Yamamoto, T. Kumamaru, Y. Uemura: *Anal. Chim. Acta*, **39**, 51 (1967).
- 8) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 山手万知子: 本誌, **16**, 1181 (1967).
- 9) 厚生省編: “衛生検査指針 III 食品衛生検査指針 (II) [III] 保存料検査法”, (1963).
- 10) 船久保英一: “有機化合物確認法”, 中巻, p. 24 (1954), (養賢堂).
- 11) C. H. Hale: *Anal. Chem.*, **26**, 1078 (1954).
- 12) 日本薬学会編: “衛生試験法注解”, p. 165 (1956), (金原出版).

- 13) M. Calvin, K. W. Wilson: *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 2003 (1945).

☆

Spectrophotometric determination of salicylic acid by solvent extraction with tris(1, 10-phenanthroline)iron(II) chelate cation. Yuroku YAMAMOTO, Takahiro KUMAMARU, Yasuhisa HAYASHI and Mitsue ORSUCHI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University, Higashisenda-machi, Hiroshima-shi)

A new spectrophotometric method is proposed for the determination of salicylic acid. The method is based on solvent extraction of the ion-pair formed between tris(1, 10-phenanthroline)iron(II) and the anion of salicylic acid into nitrobenzene.

The color intensity of the organic phase (516 $m\mu$) is proportional to the initial amount of the salicylic acid in aqueous phase.

The constant extraction is obtained when the cationic

metal chelate concentration is $3.2 \times 10^{-3} M$ in the aqueous solution buffered at pH 5.5 to 9.5.

The calibration curve is constructed as follows.

To 5 ml of 0.3 M phosphate buffer solution (pH 6) and 8 ml of tris(1, 10-phenanthroline)iron(II) solution ($1.0 \times 10^{-2} M$) are added varying amounts of the standard salicylic acid solution ($2.0 \times 10^{-4} M$, 0~5 ml). It is diluted to 25 ml with water, and is shaken for 2 min. with 10 ml of nitrobenzene. The absorbance of the organic phase is measured at 516 $m\mu$ against the reagent blank.

A linear relationship is obtained over the range of 8×10^{-6} to $4 \times 10^{-5} M$ of salicylic acid in aqueous solution.

The effect of diverse organic compounds such as preservatives, sweetening agents and others on this method was investigated.

The proposed method was applied to the determination of salicylic acid in commercial Japanese Sake and the results were in good agreement with those by official UV method.

(Received Aug. 30, 1968)

ネオクプロイン-銅(I) とのイオン対抽出による硝酸イオンの 間接原子吸光分析法*

山本 勇麓, 熊丸 尚宏, 林 康久, 大谷 譲**

(1968 年 8 月 30 日受理)

原子吸光分析法の新しい応用を目的として, 金属キレートを用いる溶媒抽出法を併用する硝酸イオンの定量法を検討した. 水溶液中に微量の硝酸イオンが存在するとき, ネオクプロイン-銅(I) キレート陽イオンは硝酸イオンとともに選択的にメチルイソブチルケトンに抽出され, さらにその有機相を空気-アセチレン炎に噴霧し, 3247 Å の銅共鳴線を用いる原子吸光分析によって銅濃度を定量すれば, 間接的に硝酸イオンの定量が可能であることを見いだした. 基礎的諸条件を検討した結果, pH 3.5~5.5 のもとで抽出を行なえば, 硝酸イオンの濃度は $10^{-5} \sim 7 \times 10^{-5} M$ の範囲で有機相の銅の吸光度と直線関係を示すことがわかった. また, 共存イオンの影響は, 硫酸イオン, リン酸イオンは硝酸イオンに対して 1000 倍モル程度, 炭酸イオンは 100 倍モル程度, 亜硫酸イオンは 10 倍モル程度共存してもほとんどさしつかえなく, また, 塩素イオンやケイ酸イオンは等モル程度共存しても影響しなかった. しかし, チオシアン, 過塩素酸イオンはかなりの正誤差を示した.

1 緒 言

原子吸光分析法は 1955 年 Walsh によって開発されて以来, 主として金属元素の定量手段として多方面で活

用されるに至っているが, この方法の制約の一つは定量しようとする元素と同じ元素からなる光源が必要であるということであり, 非金属元素ではホウ素, ケイ素, ヒ素, セレン, テルルのように定量されるようになったものもあるが, なお多くの非金属元素に対しては本法を直接適用できないのが現状である. 本研究はこのような原子吸光分析法を無機および有機陰イオンへの適用にまで拡大する試みの一環として, 硝酸イオンの定量法を検討

* 金属キレート陽イオンによる陰イオンの溶媒抽出 (第 38 報). 第 37 報は T. Kumamaru: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **42**, No. 4 (1969), 印刷中

** 広島大学理学部化学教室: 広島市東千田町