- 7) T. Curtius, H. Hille: *ibid.*, **64**, 404 (1908).
- 8) R. Stolle: *ibid.*, **69**, 486 (1913).
- 9) R. Stolle, L. Gutmann: *ibid.*, **69**, 497 (1913).

☆

Fluorometric determination of pyridoxal and pyridoxal-5-phosphate. (Studies on hydrazone derivatives in fluorometric analysis. I.) Toyozo UNO*, Saburo NAKANO and Hirokazu TANIGUCHI** (*Faculty Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto-shi; ** Meiji College of Pharmacy, Setagaya-ku, Tokyo)

Fluorescence reaction of pyridoxal(PAL) and pyridoxal-5-phosphate(PALP) with hydrazides (Table

I) was examined. PAL and PALP reacted with isobutyric acid hydrazide(IBH) to form hydrazones in an acetate buffer solution which gave green fluorescence in an alkaline medium. IBH was suitably used for the determination of PAL and PALP. By the proposed method, 0.01~1.0 μg per ml of PAL hydrochloride and 0.1~1.0 μg per ml of PALP could be determined. Ten fold amount of pyridoxine hydrochloride and equal amount of pyridoxamine hydrochloride did not interfere.

Separatory determination of PAL and PALP has been done by the combination of the proposed method with an enzymatic method using acid phosphatase.

(Received Feb. 2, 1971)

アルミニウムのけい光定量*

宇野 豊三**, 谷口 寛一***

(1971 年 3 月 1 日受理)

酢酸, フェニル酢酸, 安息香酸およびイソニコチン酸のヒドラジドと 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドからヒドラゾン合成し, スポットテストにより金属イオンとの反応を行なったところ, これらのヒドラゾンは酢酸酸性でアルミニウムと反応して強いけい光を示した. そのなかで安息香酸ヒドラゾンとアルミニウムからは励起極大波長 395 $\text{m}\mu$, けい光極大波長 475 $\text{m}\mu$ のけい光性錯体を形成した. またこのヒドラゾン-アルミニウム錯体のけい光はほかのアルミニウム錯体のけい光よりも強いので, 安息香酸ヒドラゾンを用いてアルミニウムのけい光定量法を確立した.

試薬(安息香酸ヒドラゾン)とアルミニウムを pH 4.6 の酢酸塩緩衝液中で 40~42°C, 30 分間加温して得られるけい光を測定する. この方法によるとアルミニウムの 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間で濃度とけい光強度の間に直線関係が成立した.

1 緒 言

ヒドラゾン誘導体に関するけい光分析の研究のなかには, サリチル酸ヒドラジドを用いたアルデヒドの分析的研究¹⁾, サリチルアルデヒド酢酸ヒドラゾンによるアルミニウムの定量²⁾, サリチルアルデヒド酢酸ヒドラゾンによるスカンジウムおよびガリウムの定量³⁾, レゾルシンアルデヒド酢酸ヒドラゾンによるスカンジウムの定量⁴⁾, スカンジウム, ガリウムおよびジルコニウムのベ

ーバークロマトグラフ^{5,6)} などがある. 著者らは¹⁾さきにヒドラゾン誘導体のけい光分析的研究を行ってきた^{2,7)}が, これらのうちイソニコチン酸ヒドラジドの定量法の研究⁸⁾, イソニコチン酸ヒドラジドが 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドと反応してヒドラゾンになり, 酢酸酸性でこのヒドラゾンがさらにアルミニウムと錯体を形成し, この錯体の示す強いけい光を測定することによった. したがって 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドから誘導されるヒドラゾンが金属の分析試薬として期待された. そこで本報では酢酸, フェニル酢酸, 安息香酸およびイソニコチン酸のヒドラジドと 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドからヒドラゾン合成し検討を試みた. これらヒドラゾンはアルミニウムと反応してけい光を発するようになり, そのなかでも安息香酸ヒドラゾン

* けい光分析におけるヒドラゾン誘導体について (第 2 報). 前報は宇野豊三, 中野三郎, 谷口寛一: 本誌, **20**, 1117 (1971)

** 京都大学薬学部: 京都市左京区吉田下阿達町

*** 明治薬科大学: 東京都世田谷区野沢 1 丁目

(2-hydroxy-1-naphthaldehyde benzoic acid hydrazone; HNBH) がアルミニウムと反応して最も強いけい光を発することがわかったので、HNBH によるアルミニウムのけい光定量法を確立した。

2 試薬および装置

2.1 試薬

標準 アルミニウム溶液：特級カリウムミョウバンを 0.01*N* 硫酸溶液に溶かし、アルミニウムとして 0.1～1.0 $\mu\text{g/ml}$ 溶液をつくる。

酢酸塩緩衝液：1*M* 酢酸と 1*M* 酢酸ナトリウム溶液をつくり、pH メーターを用いて pH 4.6 の溶液を調製する。

混合溶媒：メタノール 2 容とジメチルホルムアミド 1 容の割合に混合する。

HNBH 溶液：4:1 で合成した HNBH 4 mg をエタノール 50 ml に溶かし、蒸留水 50 ml を加え 50% エタノールで全量 100 ml にする。

ヒドラゾン溶液：4:1 で合成した 4 種のヒドラゾン誘導体の 0.005% エタノール溶液にする。

溶媒：メタノールは特級試薬、エタノールは特級試薬を硝酸銀と水酸化カリウムで脱アルデヒドしたのち蒸留する。ジメチルホルムアミドは特級試薬を蒸留精製する。

硫酸キニーネ溶液：硫酸キニーネの 0.005%，0.1*N* 硫酸溶液にする。

2.2 装置

けい光分光光度計：MPF-2A 形日立分光けい光光度計。

けい光光度計：FPL-2 形日立けい光光度計。

pH メーター：日立堀場 M-5 形 pH メーター。

恒温そう：40～43°C に調節できる恒温そう。

3 定量法

アルミニウムとして 0.1～1.0 $\mu\text{g/ml}$ に対応するように試料を量り、0.01*N* 硫酸溶液で試料溶液をつくる。

試料溶液 4 ml に酢酸塩緩衝液 1 ml および混合溶媒 6 ml を混ぜ、ただちに氷水中で冷やす。HNBH 溶液 2 ml を混ぜ、40～42°C で 30 分間加温後、室温にもどし、50% メタノールで全量 20 ml にしてからけい光強度を測定する。別に標準アルミニウム溶液を同様に操作して検量線を作成して濃度を算定する。から試験は蒸留水を用いて操作する。けい光光度計の 1 次フィルターは $\lambda 365$ ，二次フィルターは $\lambda 47$ を使用、機器の感度は硫酸キニーネ溶液を用いて調節する。

4 実験

4.1 試薬の合成

4.1.1 酢酸ヒドラゾン

酢酸^{*}ヒドラジド 1 g を水

10 g に溶かし、2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒド 1 g を 10 ml のエタノールに溶かして加え、5 分間還流、析出した結晶を濾取、エタノールから再結晶、淡黄色結晶，mp 252°C，収量 42.2%，元素分析値：計算値 ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) C 68.41%，H 5.30%，N 12.27%；実測値 C 68.60%，H 5.54%，N 12.38%。

4.1.2 フェニル酢酸ヒドラゾン フェニル酢酸ヒドラジド 0.75 g を水 10 ml に溶かし、2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒド 0.86 g をエタノール 10 ml に溶かして加え、5 分間還流、析出する結晶を濾取、エタノールから再結晶、黄色結晶，mp 211°C，収量 66.2%，元素分析値：計算値 ($\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$) C 74.98%，H 5.30%，N 9.20%；実測値 C 75.02%，H 5.54%，N 9.21%。

4.1.3 HNBH 安息香酸ヒドラジド 1.36 g を水 10 ml に溶かし、2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒド 1.72 g をエタノール 10 ml に溶かして加え、5 分間還流、析出する結晶を濾取、エタノールから再結晶する、淡黄色結晶，mp 212～214°C，収量 80%，元素分析値：計算値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$) C 74.47%，H 4.86%，N 9.65%；実測値 C 74.36%，H 5.01%，N 9.78%。

4.1.4 イソニコチン酸ヒドラゾン 既報⁶⁾のようにイソニコチン酸ヒドラジドと 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドより合成した。

4.2 スポットテスト

4.1 で合成した試薬が金属のけい光試薬として有用かどうかを調べる目的で、金属イオンとの反応をスポットテストにより調べた。

これらの試薬のアルカリ性溶液はけい光を示すが、酸性ではけい光は非常に弱くなる。そこで試薬は 0.005% エタノール溶液にして、金属イオン 0.01% 溶液との反応を次の方法で行なった。用いた金属イオンは Ag^+ ， Pb^{2+} ， Hg^{2+} ， Cd^{2+} ， Cu^{2+} ， Fe^{2+} ， Fe^{3+} ， Cr^{3+} ， Al^{3+} ， Zn^{2+} ， Co^{2+} ， Ni^{2+} ， Mn^{2+} ， Ba^{2+} ， Ca^{2+} ， Sr^{2+} ， Mg^{2+} ， Be^{2+} および Th^{4+} の諸イオンである。

試薬溶液 1 滴，酢酸塩緩衝液 1 滴および金属溶液 1 滴を混合して紫外線下のけい光を調べた。同時にから試験も行なった。

この方法によると Al^{3+} だけが強いけい光を示したので、さらにアルミニウム溶液を希釈して、アルミニウムの確認限界を求めた。その結果を Table I に示す。

4.3 アルミニウム錯体のけい光と強度

4.1 で合成した試薬の 0.005% エタノール溶液、アルミニウム 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 溶液について、3 の定量操作に

Table I Identification of aluminum

No.	Reagent	Fluorescence colour	Limit of identification ($\mu\text{g}/\text{drop}$)
1	$\text{CH}_3\text{CONH}\cdot\text{N}=\text{CH}-$	Violet	0.015
2	- $\text{CH}_2\text{CONH}\cdot\text{N}=\text{CH}-$	Violet	0.015
3	- $\text{CONH}\cdot\text{N}=\text{CH}-$	Blue	0.005
4	- $\text{CONH}\cdot\text{N}=\text{CH}-$	Greenish yellow	0.010

従って測定液をつくり、励起およびけい光スペクトルを測定した。励起スペクトルはけい光分光光度計のけい光波長をけい光極大波長に合わせ、けい光スペクトルは励起波長を励起極大波長に合わせて測定した。1次、2次のスリット幅、記録計の感度は全部同一にして測定した。その結果を Fig. 1 および 2 に示す（測定条件の詳細は図中に示しておいた）。

それぞれの錯体の示すけい光強度を比較するため、Fig. 2 のスペクトルからけい光極大波長におけるけい光強度比を求めた。酢酸ヒドラゾン-アルミニウム：フェニル酢酸ヒドラゾン-アルミニウム：HNBH-アルミニウム：イソニコチン酸ヒドラゾン-アルミニウム=34.0：

Fig. 1 Excitation spectra of hydrazone-Al complexes

--- HNBH-Al; — Isonicotinic acid hydrazone-Al; — — Acetic acid hydrazone-Al; - - - Phenylacetic acid hydrazone-Al; Excitation slit width: 3.5 mμ; Emission slit width: 3.5 mμ; Recorder sensitivity: 4

Fig. 2 Emission spectra of hydrazone-Al complexes

--- HNBH-Al; — Isonicotinic acid hydrazone-Al; — — Acetic acid hydrazone-Al; - - - Phenylacetic acid hydrazone-Al; Excitation slit width: 3.5 mμ; Emission slit width: 3.5 mμ; Recorder sensitivity: 4

32.5 : 100 : 47.5 となり、HNBH の錯体の示すけい光が最も強いことがわかった。この結果は 4・2 のスポットテストによるアルミニウムの確認限界からの試薬の感度とはほぼ一致した。

4・4 定量条件の検討

4・4・1 緩衝液の pH けい光強度に及ぼす pH の影響について、pH の異なる 1M 酢酸塩緩衝液を用いて調べた。その結果を Fig. 3 に示したが、pH 4.4~4.8

Fig. 3 Effect of pH of buffer solution

4 μg Al³⁺; 0.004% HNBH solution 2 ml/20 ml; Primary filter: #365; Secondary filter: #47; Voltage sensitivity: 1

の緩衝液で一定のけい光強度を示したので、定量法ではその中間の pH 4.6 の緩衝液を用いることにした。

4.4.2 溶媒の種類 3の定量法に従って溶媒だけを変えてけい光強度を測定した結果を Table II に示す。溶媒として水を用いた場合は測定値が非常にばらつくので、Table II にはその値は記入しなかった。

Table II Effect of solvents

Solvent	Relative fluorescence intensity†
Methanol (CH ₃ OH)	95
Ethanol	77
Dioxane	80
Dimethyl formamide (DMF)	84
Acetone	62
CH ₃ OH : DMF (5 : 1)	97
" (4 : 2)	97
" (3 : 3)	96

† Primary filter : # 365; Secondary filter : # 47; Voltage sensitivity : 1; Al³⁺ taken : 1.0 μg/ml

メタノールを用いた場合は測定値にばらつきが見られたが、一方 CH₃OH-DMF の 2 : 1 の混合溶媒はけい光強度が大で、測定値のばらつきも少ないのでこの混合溶媒を用いた。

4.4.3 溶媒の量 混合溶媒の量とけい光強度の関係について調べた。その結果を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 Effect of amount of solvent

4 μg Al³⁺; 0.004% HNBH solution 2 ml/20 ml; Primary filter : # 365; Secondary filter : # 47; Voltage sensitivity : 1

溶媒は 3~7 ml の間で一定のけい光強度を示したので定量法ではその中間の 5 ml を用いた。

4.4.4 HNBH の量 HNBH 溶液の添加量とけい光強度の関係について調べた。その結果を Fig. 5 に示す。

HNBH 溶液の量が 1.5~3.5 ml の間で、けい光強度はほぼ一定であった。したがって定量法では 2 ml の

Fig. 5 Effect of amount of HNBH

4 μg Al³⁺/20 ml; Primary filter : # 365; Secondary filter : # 47; Voltage sensitivity : 1

HNBH 溶液を用いた。

4.4.5 加温温度 アルミニウムと HNBH を加温反応させる際の温度の影響について調べた。その結果は Fig. 6 に示すように、37~45°C で一定のけい光強度を示したので定量法では 40~42°C に加温してアルミニウムの定量を行なうことにした。

Fig. 6 Effect of reaction temperature

4 μg Al³⁺; 0.004% HNBH solution 2 ml/20 ml; Primary filter : # 365; Secondary filter : # 47; Voltage sensitivity : 1

4.4.6 加温時間 アルミニウムと HNBH を 41°C で反応させて定量操作を行なう際の加温時間の影響について検討した。その結果は Fig. 7 に示したように 20 分以後 80 分まで一定のけい光強度を示したが、安全性を考慮して 30 分間加温することにした。

4.4.7 測定液の安定性 3の定量法に従ったアルミニウムの測定液の安定性を調べる目的で、測定液を調製後、けい光強度の経時変化を調べたところ、調製直後から 70 分間経過したが、けい光強度は一定で変化がなかった。

Fig. 7 Effect of reaction time of aluminum with HNBH

4 μg Al^{3+} ; 0.004% HNBH solution 2 ml/20 ml; Primary filter: #363; Secondary filter: #47; Voltage sensitivity: 1

4.5 検量線

種々の濃度の標準アルミニウム溶液をつくり, 3 の定量法に従ってけい光強度を測定した. その結果アルミニウムの 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間で濃度とけい光強度の間に直線関係が成立した.

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアルミニウム溶液を 5 回測定した結果, 測定値の標準偏差は 0.84% であった.

4.6 共存イオンの影響

0.01N 硫酸溶液の 1 ml にアルミニウムイオンとして 0.5 μg と, ほかのイオン 50 μg または 5 μg を含むような溶液をつくり, 3 の定量法に従ってけい光強度を測定して共存イオンの影響を調べた. その結果を Table III に示した.

Table III において, アルミニウムに対して銅は同量以上でまったくけい光を示さず, 鉄(II), (III) は同量以上で負誤差を与え, コバルト(II), ニッケルは 10 倍量で負誤差を与えた.

5 結 語

金属のけい光分析試薬としてヒドラゾン誘導体を用いた報告は Holzbecher らの研究^{23,24}に見られるように, 主として脂肪酸ヒドラジドから誘導したヒドラゾンである.

Table III Effect of diverse ions

Ions added	Amount of ion ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Aluminum found (%)
Ag^+	50	100.0
	5	100.0
Pb^{2+}	50	102.0
	5	98.0
Hg^{2+}	50	102.0
	5	100.0
Cd^{2+}	50	102.0
	5	98.9
Cu^{2+}	50	0
	5	0
Fe^{2+}	50	3.1
	5	12.5
Fe^{3+}	50	41.6
	5	81.2
Cr^{3+}	50	100.2
	5	100.2
Zn^{2+}	50	104.0
	5	100.0
Co^{2+}	50	91.0
	5	98.6
Ni^{2+}	50	56.2
	5	98.9
Mn^{2+}	50	100.2
	5	100.2
Ba^{2+}	50	100.2
	5	100.2
Ca^{2+}	50	100.2
	5	100.2
Sr^{2+}	50	100.2
	5	100.2
Mg^{2+}	50	102.0
	5	102.0
Be^{2+}	5	98.0
	5	98.9

Al^{3+} taken: 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

本報ではヒドラゾンの母体カルボニル化合物は 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドであるが, R に相当する部分が芳香族のものについても検討を行なった. その結果, R に相当する部分がベンゼンである HNBH がアルミニウムと反応して, 最も強いけい光を示すことがわかったので, HNBH を用いてアルミニウムの定量法を確立した. それによるとアルミニウムは 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で定量が可能となった.

Fig. 1 に示したように 4 種のヒドラゾン-アルミニウム錯体の示す励起スペクトルはほぼ類似のスペクトルを示すので既報⁶⁾のように, 酸ヒドラジドに 2-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒドおよびアルミニウムを反応する方法で, そのけい光反応液のスペクトルから酸ヒドラジドの微量定性分析が可能になるものと考えられる.

終わりに, 元素分析を担当した京都大学分析センターの諸氏ならびに明治薬科大学の松村美代子氏に感謝します.

(1970 年 7 月, 日本薬学会第 90 年会において講演)

文 献

- 1) P. S. Chen: *Anal. Chem.*, **31**, 296 (1957).

- 2) Z. Holzbecher, P. Půlkráb : *Collection Czech. Chem. Commun.*, **27**, 1142 (1962).
- 3) Z. Holzbecher : *Microchem. J.*, **9**, 288 (1965).
- 4) Z. Holzbecher : *Acta Chim. Hung. Tomus*, **27**, 413 (1961).
- 5) Z. Holzbecher : *Collection Czech. Chem. Commun.*, **26**, 1204 (1961).
- 6) 宇野豊三, 谷口寛一 : 本誌, **20**, 997 (1971).
- 7) 宇野豊三, 中野三郎, 谷口寛一 : 同上, **20**, 1117 (1971).

Fluorometric determination of aluminum.

(Studies on the hydrazone derivatives in fluorometric analysis. II.) Toyozo UNO* and Hirokazu TANIGUCHI** (* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto-shi; **Meiji College of Pharmacy, Setagaya-ku, Tokyo)

Four derivatives of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde

hydrazones (from acetic acid hydrazide, phenylacetic acid hydrazide, benzoic acid hydrazide and isonicotinic acid hydrazide) were synthesized.

The spot test on the fluorescence due to the reactions between these hydrazones and various metal ions indicated that they were useful for the analysis of aluminum. 2-Hydroxy-1-naphthaldehyde benzoic acid hydrazone (HNBH) gave the strongest fluorescence and a fluorometric method for the determination of aluminum was established by using HNBH. The recommended procedure was as follows. To a sample solution of 4 ml were added 1 ml of acetate buffer solution (pH 4.6), 6 ml of mixed solvent (CH_3OH : DMF = 2 : 1) and 2 ml of 0.004% HNBH in ethanol. The solution was then warmed at 40~42°C and was diluted to 20 ml with 50% methanol. Blue fluorescence with the maximum at 475 m μ was measured. From 0.1 to 1.0 μg of aluminum per ml was successfully determined.

(Received Mar. 1, 1971)

入射角度大の赤外全反射吸収スペクトル法による 高分子測定の研究

田中 誠之, 松井 とも子*

(1971 年 2 月 15 日受理)

多重反射 ATR 法で試料への入射角が通常 (45°) より大きくなるように KRS-5 高屈折率媒質の設計, 試作を行ない, 70~76° までの数種の入射角で 4~15 回の多重反射測定ができた。これらを用いて, 高屈折率試料の例として従来の ATR 法ではスペクトルを得ることが不可能であった高カーボンブラック含有ブタジエンアクリロニトリルゴムの測定を行なったところ良好なスペクトルを得ることができた。また薄い表面層の測定への応用としてシリコンゴムおよびセルロース表面にメチルメタアクリレートにコーティングした試料の測定を行なったところ, 45° 入射では第 2 層のピークのため不明りょうであったメチルメタアクリレートの吸収を検出することができた。

1 緒 言

高分子化合物の赤外吸収スペクトルを測定する場合, 従来の透過法ではすべての物質が測定できるとはかぎらない。たとえば溶媒に不溶で柔軟性, 弾力性のある物質などは微粉末にすることもできず, スペクトルを得ることは困難であるし, また厚い膜あるいは板の形でしか得られないもの, さらに不透明な物の上に塗られて調製さ

れた薄い膜などはそのままの形では測定不能である。このような試料に対しては現在赤外全反射吸収スペクトル法 (以下 ATR 法と略記) が適用され, この種の問題の多くのものが解決されている。

これらの測定条件としては一般に入射角 45° で 1 ないし十数回の多重反射法が用いられているが, まだこの方法でも満足なスペクトルを測定できないものがある。たとえば高分子表面を処理加工したものの非常に薄い処理層のみの測定, あるいは試料の屈折率が通常の有機物より高く全反射条件を満足しにくい状態にある試料の測定

* 東京大学工学部工業化学科 : 東京都文京区本郷 7 丁目