チアミンによる水銀のけい光定量法

山根 靖弘， 宮崎 元一， 笠松 隆洋，
村上 詔子， 木藤 住子， 小室ひとみ*

(1972 年 8 月 21 日受理)

本定量法は，チアミン（ビタミン B_1 ）がアルカリ性において水銀イオンから生成する酸化水銀と反応して，チオクロムのけい光を発することを利用したものである．第二水銀，第一水銀のいずれもこの反応を示すが，第二水銀イオンのほうがけい光が強い．試料溶液にチアミン試液を加え，pH 9.5 で反応させイソブチルアルコールで抽出，得られたチオクロムのけい光を励起波長 375 nm，けい光波長 430 nm で測定する方法である．本定量法の定量下限は第二水銀イオンで $0.05 \mu\text{g/ml}$ ，第一水銀イオンで $0.20 \mu\text{g/ml}$ であり，ジチゾン比色法に比べておよそ 10 倍感度が高い．本定量法はチオクロムの生成に影響を与える酸化，還元性の無機イオンにより妨害をうける．

1 緒 言

水銀の定量にはジチゾンによる比色法がよく用いられているが，微量の水銀を含む試料ではジチゾン法の感度がじゅうぶんでなく，さらに高感度の分析法が必要な場合がある．

著者らは塩酸チアミン（ビタミン B_1 塩酸塩）による銅のけい光定量法を開発した際¹⁾，試料中に共存する Hg^{2+} は銅の定量を妨害することを見いだした．また，Holman²⁾ はカラスミギ（えん麦）中のチアミンをアルカリ性で塩化第二水銀により，チオクロムに酸化してけい光定量を行なったが，塩化第二水銀が最適の酸化剤であることを報告している．

これらの知見から，著者らはチアミンを試薬に用いて，チオクロム生成による水銀のけい光定量法を確立すべく検討を行ない，分析上じゅうぶん価値ある結果を得たので報告する．

2 試薬，装置

2.1 試 薬

チアミン試液：塩酸チアミン（ビタミン B_1 塩酸塩，武田薬品）を水-アセトンにより精製し，本品 50 mg を水に溶かして全量 1000 ml とする．本液を原液とし，用時適当に水でうすめて試液とする．

塩化第二水銀標準液：試薬特級塩化第二水銀 1.350 g をはかりとり，水に溶かして全量 1000 ml とし試料原液とする．本液 1 ml は Hg^{2+} 1.00 mg を含有する．

* 千葉大学薬学部：千葉市弥生町 1 丁目

本液を用時水で適当にうすめて試料溶液とする．

ほう砂-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 9.5）：0.1M ほう砂（ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ）溶液に 1N 水酸化ナトリウム液を加えて pH 9.5 に調整する．試薬は特級品を用いる．

イソブチルアルコール：試薬 1 級を蒸留して用い，あらかじめもうけい光のないことを確かめておく．

塩化ナトリウム：試薬特級を用いる．

硫酸キニーネ標準液：試薬特級硫酸キニーネ 20 mg をはかりとり，試薬特級を用いて調製した 0.1N 硫酸に溶かして全量 1000 ml とする．これを保存原液として用時 0.1N 硫酸で適当な濃度にうすめて 50% 強度調整用内標準液とする．

2.2 装 置

pH 測定には東亜電波製 pH 計 HM-5A 型を，けい光光度測定には日立分光けい光光度計 MPF-2A 型を用いた．

3 定量方法

試料溶液（水銀として $0.25 \sim 8.00 \mu\text{g}$ を含む）5 ml にチアミン試液 1 ml を加え 1 分間振り混ぜたのち，ほう砂-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 9.5）4 ml を加えさらに 1 分間振り混ぜる．ついで沸騰水浴中で 5 分間加熱後，氷浴中で冷却し，塩化ナトリウム 3.5 g を加え 1 分間振り混ぜる．さらにイソブチルアルコール 6 ml を加えて 1 分間振り混ぜて生成したチオクロムを抽出する．イソブチルアルコール層に抽出されたチオクロムのけい光を励起波長 375 nm，けい光波長 430 nm で測定する．

4 実 験

4.1 けい光スペクトル

3 の定量方法に従って励起およびけい光スペクトルを測定し, その結果を Fig. 1 に示した.

Fig. 1 Excitation and emission spectrum of thiochrome

(a) Excitation spectrum, 375 nm; (b) Emission spectrum, 430 nm

4.2 試液濃度

本定量法における Hg^{2+} の定量範囲は, チアミン試液の濃度により変動することが見いだされたが, 6 で述べるように Hg^{2+} 0.05~1.60 $\mu\text{g/ml}$ の範囲では, 高濃度 (5.0 $\mu\text{g/ml}$) および低濃度 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) のチアミン試液を使い分けることにより良好な結果を得た. したがって今後は, 試料の Hg^{2+} 量に応じて 2 種類のチアミン試液を用いることにした.

4.3 緩衝液の pH

Hg^{2+} (1.00 $\mu\text{g/ml}$) 5 ml とチアミン試液 1 ml を用い, 緩衝液の pH を変えた場合のけい光強度を測定した結果を Fig. 2 に示した. pH 9.0~10.0 付近でけい光強度は最大であったので, 本定量法では, pH 9.5 の緩衝液を用いることにした.

4.4 反応時の温度と時間

Table I に示す実験条件で各条件におけるけい光強度を検討した. Table I に見られるように, 水浴中の温度が 80°C 以上でけい光強度はほぼ一定となり, しかも最大となった. 次に水浴の沸騰状態において反応時間を変化させたときのけい光強度を調べた結果を Fig. 3 に示

Fig. 2 Effect of pH on fluorescence intensity

Hg^{2+} solution : 5 ml (1.00 $\mu\text{g/ml}$); Thiamine reagent : 1 ml (5.0 $\mu\text{g/ml}$); Wavelength : 375 nm/430 nm; 50 div. with the quinine sulfate reference solution (1.6 $\mu\text{g/ml}$)

Table I Effect of reaction temperature

Time (min)	Temp. (°C)				
	60	70	80	90	100
5	48.0	62.5	66.6	67.2	68.0
15	60.0	63.5	68.0	68.0	70.6
30	60.5	63.0	68.2	67.2	67.8

Hg^{2+} solution : 5 ml (1.00 $\mu\text{g/ml}$); Thiamine reagent : 1 ml (5.0 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3 Effect of reaction time at 100°C

Hg^{2+} solution : 5 ml (1.00 $\mu\text{g/ml}$); Thiamine reagent : 1 ml (5.0 $\mu\text{g/ml}$); Wavelength : 375 nm/430 nm; 50 div. with the quinine sulfate reference solution (1.6 $\mu\text{g/ml}$)

した.

Fig. 3 に見られるように, けい光強度は反応時間 1 分間ですでに最大となり, さらに時間を長くしてもほとんど

ど一定であった。以上の結果から、本法では反応は沸騰状態で5分間行なうことに定めた。

4.5 塩析剤 (塩化ナトリウム) の量

生成したチオクロムをイソブチルアルコールで抽出する際、塩析剤として塩化ナトリウムが消光作用がなく、ほかの試薬よりすぐれていた。Hg²⁺ (1.00 µg/ml) 5 ml, チアミン試液 (5.0 µg/ml) 1 ml を用いた場合、塩化ナトリウムの量を変えて検討し、Table II に示す結果が得られた。

Table II Effect of amount of sodium chloride

Amount of NaCl added (g)	Fluorescence intensity
0.5	62
1.0	68
1.5	76
2.0	83
2.5	91
3.0	101
3.5	101
4.0	102

Extracting solvent : *iso*-Butyl alcohol; Hg²⁺ solution : 5 ml (1.00 µg/ml); Thiamine reagent : 1 ml (5.0 µg/ml); Wavelength : 375 nm/430 nm

すなわち、Table II から明らかなように、塩化ナトリウム 3.0~4.0 g でチオクロムの抽出は完全であり、したがって塩析剤は塩化ナトリウム 3.5 g を用いることにした。

5 共存物質の影響

本定量法に及ぼす共存物質の影響について検討した。Hg²⁺ 1.00 µg, および Hg²⁺ に対してそれぞれ 10, 100, 1000 倍モルの共存物質を含む試料溶液 5 ml に、チアミン試液 (0.5 µg/ml) 1 ml を加えて実験し、共存物質の影響を調べた。妨害を示した例を Table III に示したが、陽イオンでは、Ag⁺, Sn²⁺ が約 10 倍量で、Bi³⁺, Fe³⁺ が 1000 倍量でそれぞれ妨害を示し、また陰イオンでは、I⁻ 100 倍量, S₂O₃²⁻, SO₃²⁻, S²⁻, Fe(CN)₆⁴⁻, Fe(CN)₆³⁻, MnO₄⁻, CrO₄²⁻, Cr₂O₇²⁻ がそれぞれ 10 倍量の共存で妨害を示した。Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Cr³⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Br⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, 酢酸イオン, 酒石酸, クエン酸は妨害を示さなかった。

Table III から明らかなように、イオウに親和性のある陽イオンや酸化、還元性の陽、陰イオンは、本法の妨害となることが示唆された。これらのイオンによる妨害

Table III Interfering ions

Ion	Added as	Mole ratio to Hg ²⁺	Recovery of Hg ²⁺ (%)
Ag ⁺	AgNO ₃	1000	8
		100	15
		10	88
Bi ³⁺	Bi(NO ₃) ₃	1000	81
Sn ²⁺	SnCl ₂	1000	15
		100	13
		10	17
Fe ³⁺	FeCl ₃	1000	84
I ⁻	KI	1000	29
		100	85
		10	14
S ₂ O ₃ ²⁻	Na ₂ S ₂ O ₃	1000	15
		100	15
		10	35
SO ₃ ²⁻	Na ₂ SO ₃	1000	14
		100	28
		10	87
S ²⁻	Na ₂ S	1000	16
		100	18
		10	17
Fe(CN) ₆ ⁴⁻	K ₄ Fe(CN) ₆	1000	21
		100	19
		10	20
Fe(CN) ₆ ³⁻	K ₃ Fe(CN) ₆	1000	324
		100	256
		10	185
MnO ₄ ⁻	KMnO ₄	1000	11
		100	19
		10	55
CrO ₄ ²⁻	K ₂ CrO ₄	1000	97
		100	65
		10	81
Cr ₂ O ₇ ²⁻	K ₂ Cr ₂ O ₇	1000	92
		100	67
		10	88

は、一般にけい光の減少となって現われるが、例外として Fe(CN)₆³⁻ はけい光を増強させた。これは従来のチアミンのチオクロム法による定量法で、試薬にフェリシアン塩が用いられることから明らかなように、本法においても、Fe(CN)₆³⁻ が試薬として加えたチアミンを酸化してチオクロムを生成させるためであると考えられる。また、クロム酸塩では 1000 倍量の共存において Fe(CN)₆³⁻ と同様に、試薬のチアミンのチオクロムへの酸化が著しくなり、10~100 倍量の共存で見られた消光的妨害を見かけ上打ち消して、けい光の増強を起こすと推定される。

6 検量線

けい光測定時の内標準液として硫酸キニーネ水溶液を用い、本法により作成した Hg²⁺ の検量線の例を Fig. 4, 5 に示した。チアミン試液および硫酸キニーネ標準液の濃度を適当に選ぶことにより、Hg²⁺ 0.05~1.60 µg/ml の間で定量が可能であり、定量下限は Hg²⁺ 0.05 µg/ml であった。また、Hg²⁺ 5.00 µg を含む試料でチアミン試液 (5.0 µg/ml) 1 ml を用い、本法により 10 回分析を行なった結果を Table IV に示したが、誤差は ±2% 程度であった。

Table IV Reproducibility

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean	σ	Error (%)
Found Hg_2^{2+} (μg)	5.00	5.00	4.95	4.94	5.04	4.94	5.08	5.04	4.94	5.13	5.01	0.07	2.0

Hg_2^{2+} solution : Hg_2^{2+} 5.00 μg ; Thiamine reagent : 1 ml (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$); σ : Standard deviation

Fig. 4 Calibration curve

Thiamine reagent : 1 ml (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$); NaCl : 3.5 g;
375 nm/430 nm, 50 div. with the quinine sulfate reference solution (2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Fig. 5 Calibration curve

Thiamine reagent : 1 ml (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); NaCl : 3.5 g;
375 nm/430 nm, 50 div. with the quinine sulfate reference solution (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

7 第一水銀イオンの定量

Hg^{2+} のほかに Hg_2^{2+} について検討したところ, 本定量法でチアミン試液により強いけい光を生成することが見いだされた. この現象は下記の反応式 (1) により

Hg_2^{2+} の場合も Hg^{2+} と同様に酸化第二水銀の生成が可能で, チオクロムを生成させるためと考えられる.

反応が式 (1) により進むならば, Hg_2^{2+} 1 モルが Hg^{2+} 1/2 モルに相当する酸化第二水銀を生成することになり, したがって Hg_2^{2+} により生成されるチオクロムは, 同量の Hg^{2+} の場合に比べて半量となることが予想される.

本法による実験の結果は, Hg_2^{2+} によるチオクロムのけい光強度はやはり同量の Hg^{2+} に比べておよそ半分以下であった. また Hg_2^{2+} の検量線は 0.40~1.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間でほぼ直線性があり, 定量下限は 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった. 定量誤差についても Hg^{2+} の場合と同じであった. Hg_2^{2+} の検量線の例を Fig. 6 に示した.

Fig. 6 Calibration curve

Thiamine reagent : 1 ml (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$); NaCl : 3.5 g;
375 nm/430 nm, 50 div. with the quinine sulfate reference solution (1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

8 結 言

本法は水銀イオン (Hg^{2+} , Hg_2^{2+}) により, アルカリ性でチアミンが酸化されて生成するチオクロムに基づく水銀の微量けい光定量法であるが, 5 に述べた妨害物質が存在しない場合には, 従来のジチゾン比色法に比べておよそ 10 倍感度が上昇し, その検量線も再現性がよい

ので分析上有利な方法であると考えられる。

(1971年4月, 日本薬学会第91年会上において講演)

文 献

- 1) 山根靖弘, 宮崎元一, 大多和昌克: 本誌, **18**, 750 (1969).
- 2) W. I. M. Holman: *Biochem. J.*, **38**, 338 (1944).

☆

Fluorometric determination of mercury with thiamine. Yasuhiro YAMANE, Motoichi MIYAZAKI, Takahiro KASAMATSU, Noriko MURAKAMI, Sumiko KITO and Hitomi KOMURO (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba, Yayoi-cho, Chiba-shi)

The thiochrome formation by the reaction of thiamine with mercuric oxide was quite sensitive, and the resulted thiochrome showed strong fluorescence. Therefore, the above reaction was applied to the determination of micro amounts of mercury, since both mercuric and mercurous ions were found to form mercuric oxide in alkaline medium, and to react with thiamine.

5 ml of sample solution containing 0.25~8.00 μg of mercury was shaken with 1 ml of either 0.5 or 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of thiamine reagent depending on the quantity of mercury in the sample solution. After shaking them, 4 ml of sodium hydroxide-borate buffer at pH 9.5 was added to the above mixture, and the whole solution was further shaken for 1 min. Furthermore, after being heated for 5 min, in a boiling water bath, the solution was cooled in an ice bath. As the salting-

out reagent, 3.5 g of sodium chloride was dissolved in the solution, and then the thiochrome produced was extracted with 6 ml of *iso*-butyl alcohol. The intensity of the fluorescence in the *iso*-butyl alcohol at 430 nm excited by 375 nm rays was then measured using quinine sulfate solution as the reference.

Calibration curves were obtained in the range of 0.05~1.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of mercuric ion, and in the range of 0.20~1.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of mercurous ion. By comparing the intensity of fluorescence of mercuric and mercurous ions, it was found that the former showed stronger fluorescence than the latter.

Interference by diverse ions with this method was studied in the mole ratio range from 10 upto 1000 of the testing ion to 1 μg of mercuric ion. Cations and anions such as Ag^+ , Sn^{2+} , Bi^{3+} , Fe^{3+} , I^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} , S^{2-} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, MnO_4^- , CrO_4^{2-} , and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ were found to interfere more or less with the thiochrome formation, and hence with the determination of mercury. The cations and anions; Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , acetate, tartrate, and citrate, on the other hand, gave no interference with the determination.

From these it was concluded that in the absence of interfering substances, the sensitivity of this method is expected to be about ten times greater than that of the ordinary colorimetric method with dithizone, and the limit of determination of mercuric and mercurous ions were 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

(Received Aug. 21, 1972)

うすい沈でん試薬による焦点クロマトグラフ法の研究

——フッ化カリウムによるアルカリ土類および希土類元素の分離分析——

古嶋 一敬*, 品川 睦明**

(1972年8月24日受理)

沈でん試薬としてフッ化カリウムを用い, 従来の焦点クロマトグラフ法の要領で, 負極液にうすいフッ化カリウム溶液, 正極液に塩酸を用い, いくつかのアルカリ土類および希土類元素の放射性核種イオンを試料とした. これらの焦点化に及ぼす影響について, 沈でん剤の pH, 濃度の変化, 通電時間などを検討した.

その結果, (セリウム-144 とプラセオジウム-144), (バリウム-140 とランタン-140), (ストロンチウム-90 とイットリウム-90) などの親娘核種の分離およびアルカリ土類金属と希土類元素との群別分離をするうえにおいて良好な結果が得られた.

* 近畿大学理工学部原子炉工学科: 大阪府東大阪市小若江

** 大阪大学工学部原子力工学教室: 大阪府吹田市字山田上