NAGA and Yoshimi UMEZAKI (National Research Institute for Pollution and Resources, 4-26-10, Ukima, Kita-ku, Tokyo)

Several metals show severe interferences in the determination of lead and cadmium by graphite furnace atomic absorption spectrometry. To suppress these interferences, the matrix modification was investigated, i.e., the matrix is changed into the harmless form by the addition of proper chemical compound into the graphite furnace. The addition of several ammonium salts was examined for this purpose. The added volume of these ammonium salts solution was 40 μ l for 20 μ l of sample solution. In the case of the atomic absorption of lead, the addition of 20% ammonium phosphate solution overcomes the interferences of any of foreign metal ions. In the case of cadmium determination, even the addition of 10% ammonium sulfate solution

was effective. This method was applied to the direct determination of lead and cadmium in smelting process water and sea water. Results gave a good agreement with those obtained by flame atomic absorption spectrometry combined with the solvent extraction.

(Received Nov. 24, 1978)

Keywords

Atomic absorption spectrometry

Cadmium

Graphite furnace

Interferences

Lead

Matrix modification

3-アミノチオカルボスチリルによるキノン類のけい光定量*

吉田 友彦**®, 宇野 豊三***

(1978 年 12 月 18 日受理)

p-ベンゾキノン類と 3-アミノチオカルボスチリルとを微量の過酸化水素の存在下, 硫酸酸性で沸騰水浴中において加熱した後, 溶液を pH 12 に調節し, 励起波長 394 nm, けい光波長 530 nm におけるけい光強度を測定することにより, (0.5~5.0) μ g/ml の *p*-ベンゾキノンの定量を行った。

又, 1,4-ナフトキノン類と 3-アミノチオカルボスチリルとを硫酸酸性で 75°C に加熱した後, アルカリ性でクロロホルムで抽出し, そのけい光強度を励起波長 564 nm, けい光波長 610 nm において測定することにより, (0.01~0.5) μ g/ml の 1,4-ナフトキノンの定量を行うことができた。

なお, 本法によっては *o*-ベンゾキノン類, 1,2-ナフトキノン類はけい光を発しない。

1 緒 言

p-ベンゾキノン (以下 BQ と略記) 類の定量法としては, シアノ酢酸エチルエステル¹⁾, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン²⁾, 1-フェニル-2,3-ジメチル-4-アミノピラズロン³⁾ などの試薬による比色法はあるが, けい光法を利用した分析法は見られない。

一方, 1,4-ナフトキノン (以下 NQ と略記) 類の定量法には, シアノ酢酸エチルエステル⁴⁾, マロニトリ

ル⁵⁾, 水酸化ナトリウム⁶⁾ などの試薬による比色法がある。又, けい光法については, *o*-フェニレンジアミンによるメナジオンの定量⁷⁾と *o*-アミノチオフェノールを用いるスポットテスト⁸⁾が報告されている。

近年, *o*-アミノチオフェノールが芳香族アルデヒドのけい光分析試薬として見いだされたが⁹⁾, 著者らは 3-ア

ミノチオカルボスチリル , 以下 ATC と略記

が *o*-アミノチオフェノールと異なり, *p*-ベンゾキノン類と特異的に反応することを見いだした。すなわち, BQ 類は ATC と微量の過酸化水素の存在下に硫酸酸性溶液中で反応し, これをアルカリ性になると黄緑色のけ

* 3-アミノチオカルボスチリルによるけい光分析 (第 1 報)

** 明治薬科大学: 東京都世田谷区野沢 1-35-23

*** 京都大学薬学部: 京都府京都市左京区吉田下阿達町

い光を発した。又、NQ 類は *o*-アミノチオフェノールと同様硫酸酸性で ATC と反応し、アルカリ性で有機溶媒に抽出され、有機溶媒層が赤色のけい光を発した。これらの反応を利用して BQ 及び NQ のそれぞれに特異的なけい光定量法を見いだした。

2 試薬及び装置

2.1 試薬

ATC 溶液：Tănăsescu ら¹⁰⁾の方法に従って合成した元素分析合格品 {mp (219~220)°C (未補正)} をエタノールに溶かして所定の濃度に調製した。用いた ATC 溶液は室温で暗所に保存すれば約 1 週間は安定である。

BQ 標準液：君島ら¹¹⁾の方法に従ってヒドロキノンから合成した BQ {mp (111~112)°C} を用いて 100 µg/ml 水溶液を調製し、これを適当に希釈して用いた。

NQ 標準液：試薬特級品をエタノールから数回再結晶し、用時 100 µg/ml エタノール溶液を調製し、これを適当に希釈して用いた。

他のキノン類及びその関連化合物：試薬特級品をそのまま用いるか、再結晶又は蒸留して用いた。市販品として入手しえなかったものは著者らが合成し精製した。

過酸化水素溶液：試薬特級 30% 過酸化水素水 1 ml を採り、用時水で希釈して 200 ml とした。

クロロホルム：試薬特級クロロホルムを常法に従い精製して用いた。

緩衝液：0.5 M 水酸化ナトリウムと 0.5 M リン酸水素二ナトリウムを用いて pH 12 の緩衝液を調製した。

2.2 装置

日立 512 型分光けい光光度計，日立-堀場 M-7E 型 pH メーター，東芝 PAN UV ランプ。

3 定性試験

3.1 ベンゾキノンの定性

小試験管に試料溶液 1 滴，30% (w/v) 硫酸 1 滴，過酸化水素溶液 1 滴及び 0.2% ATC 溶液 1 滴を加え，沸騰水浴中で 20 分間加熱，冷後 20% 水酸化ナトリウム溶液 2 滴を加えてけい光を観察する。

3.2 ナフトキノンの定性

共せん小試験管に試料溶液 1 滴，30% (w/v) 硫酸 1 滴及び 0.2% ATC 溶液 1 滴を加え，沸騰水浴中で 20 分間加熱，冷後 20% 水酸化ナトリウム溶液 2 滴を加え，更にクロロホルム 0.5 ml を加えて良く振り混ぜ，クロロホルム層のけい光を観察する。

3.3 定性試験結果及び検出限界

上記操作法に従って検出限界を求めた (Table 1, 2)。その結果，置換基の少ない BQ 類やヒドロキノン，ア

Table 1 Identification limit of benzoquinones and the related compounds

Compound No.	Compounds	Identification limit ^{a)} (µg/ml) ^{b)}
1	<i>p</i> -Benzoquinone	3
2	2-Methyl- <i>p</i> -benzoquinone	5
3	2,3-Dimethyl- <i>p</i> -benzoquinone	30
4	2,5- "	80
5	2,6- "	100
6	2,3,5-Trimethyl- <i>p</i> -benzoquinone	N. D. ^{c)}
7	2,3,5,6-Tetramethyl- <i>p</i> -benzoquinone	N. D.
8	2-Chloro- <i>p</i> -benzoquinone	5
9	2,3-Dichloro- <i>p</i> -benzoquinone	10
10	2,5- "	30
11	2,6- "	50
12	2,3,5-Trichloro- <i>p</i> -benzoquinone	N. D.
13	2,3,5,6-Tetrachloro- <i>p</i> -benzoquinone	N. D.
14	2,3-Dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone	N. D.
15	2,5-Dichloro-3,6-dihydroxy- <i>p</i> -benzoquinone	N. D.
16	<i>o</i> -Benzoquinone	N. D.
17	Hydroquinone	5
18	Pyrocatechol	N. D.
19	Resorcinol	N. D.
20	Pyrogallol	N. D.
21	Arbutin	30
22	Hydroquinone monomethyl ether	N. D.
23	<i>p</i> -Aminophenol	N. D.

a) Fluorescence color : Yellow-green; b) Concentration of sample solution; c) N. D. : Not detected

Table 2 Identification limit of naphthoquinones and the related compounds

Compound No.	Compounds	Identification limit ^{a)} (µg/ml) ^{b)}
1	1,4-Naphthoquinone	0.1
2	2-Methyl-1,4-naphthoquinone	1
3	2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone	N. D. ^{c)}
4	4-Amino-1-naphthol hydrochloride	5
5	4-Amino-2-methyl-1-naphthol	5
6	2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone	N. D.
7	2-Chloro-1,4-naphthoquinone	0.5
8	2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone	0.5
9	2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone	5
10	2,3-Dihydroxy-1,4-naphthoquinone	N. D.
11	1,2-Naphthoquinone	N. D.
12	1,2-Naphthoquinone-4-sulfonic acid	N. D.
13	Anthrone	N. D.
14	9,10-Anthraquinone	N. D.
15	9,10-Phenanthrenequinone	N. D.

a) Fluorescence color : Red; b) Concentration of sample solution; c) N. D. : Not detected

ルブチンなどは黄緑色のけい光を発するが，*o*-ベンゾキノロン，ピロカテコール及び *p*-アミノフェノールはけい光を発しなかった。BQ の置換基の影響については，置換基の数の増加とともに検出限界が高くなり，置換基 3 個以上の場合にはけい光を発しなかった。

又，BQ により生じた黄緑色のけい光は，クロロホルム，ベンゼン，キシレン，エーテル，イソペンチルアル

コールなどの有機溶媒にはほとんど抽出されなかった。

NQ 類の反応液をアルカリ性でクロロホルムで抽出すると、クロロホルム層に赤色のけい光を認めた。しかし、1,2-ナフトキノン類, 9,10-アントラキノン, 9,10-フェナントレンキノンはけい光を発しなかった。

4 定 量 法

4.1 *p*-ベンゾキノンの定量

BQ 試料溶液 {(0.5~5.0) $\mu\text{g/ml}$ } 5.0 ml を共せん試験管に採り, 60% (w/v) 硫酸 2 ml, 過酸化水素溶液 0.1 ml 及び 0.1% ATC 溶液 0.3 ml を加えて沸騰水浴中で 30 分間加熱する。室温まで冷却した後 50 ml のメスフラスコに洗い込み, 10% 水酸化ナトリウム溶液を加えて中和した後 pH 12 の緩衝液 10 ml を加え, 更に水を加えて一定量とする。励起極大波長 394 nm, けい光極大波長 530 nm におけるこの液のけい光強度を測定する (5.0 $\mu\text{g/ml}$ のウラニン溶液のけい光強度を 100 とする)。別に BQ 標準液を用いて試料溶液と同様に操作して求めた検量線から濃度を算定する。空試験は水を用いて操作する。

4.2 1,4-ナフトキノンの定量

NQ の試料溶液 {(0.01~0.5) $\mu\text{g/ml}$ } 5.0 ml を共せん遠心管に採り, 5% (w/v) 硫酸 2 ml 及び 0.2% ATC 溶液 2 ml を加えて 75°C の水浴上で 90 分間加熱する。室温まで放冷した後 10% 水酸化ナトリウム溶液 10 ml を加えてアルカリ性とし, クロロホルム 5 ml で 3 回抽出する。各抽出液を脱脂綿でせんをした漏斗でろ過し, 漏斗及び脱脂綿をクロロホルムで洗浄し, 更にクロロホルムを加えて全量を 20.0 ml とする。励起極大波長 564 nm, けい光極大波長 610 nm におけるこの抽出液のけい光強度を測定する。別に NQ 標準液を用いて試料溶液と同様に操作して求めた検量線から濃度を算定する。ただし機器の感度の調節は, 硫酸キニーネ溶液 (0.2 $\mu\text{g/ml}$) を用いて励起波長 365 nm, けい光波長 460 nm における機器のメーターの読みを 50 に合わせて行った。空試験はエタノールを用いて操作する。

4.3 *p*-ベンゾキノンの定量条件の検討

4.3.1 けい光スペクトル 4.1 の定量法に従って測定した励起, けい光スペクトル (未補正) を Fig. 1 に示す。励起極大波長は 394 nm, けい光極大波長は 530 nm であった。このけい光は室温で少なくとも 7 時間は安定であった。

4.3.2 試薬量の影響 硫酸の濃度が (50~80)%

Fig. 1 Excitation and emission spectra

1: Excitation spectrum; 2: Emission spectrum; *p*-Benzoquinone: 3.0 $\mu\text{g/ml}$

(w/v) の範囲でけい光強度は一定であったので, 60% (w/v) 硫酸を用いることにした。

過酸化水素の濃度が (0.06~0.3)% の範囲でけい光強度は一定であったので, 本定量法では 0.15% 過酸化水素溶液を用いることにした。

Fig. 2 Effect of amount of ATC

—▲— *p*-Benzoquinone, 1.0 $\mu\text{g/ml}$; —●— *p*-Benzoquinone, 3.0 $\mu\text{g/ml}$; —○— *p*-Benzoquinone, 5.0 $\mu\text{g/ml}$

0.1% ATC 溶液の添加量の検討では, Fig. 2 に示すように, 最大けい光強度を示す 0.1% ATC 溶液の添加量は BQ の濃度に依存し, 過剰の ATC の存在はけい光強度を低下させることが分かった。そこで本定量法では BQ の 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 3.0 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ を用いたときに最大けい光強度を示した 0.1% ATC 溶液の 0.25 ml を加えることにした。

4.3.3 反応条件 反応温度が 85°C 以上でけい光

強度は一定となったので、反応は沸騰水浴中で行うことにした。次に沸騰水浴中における反応時間の検討では、(15~45)分の間でけい光強度は一定であったので、反応時間を30分間と定めた。

又、反応液のpHを9~13.5まで変化させてけい光強度を測定した結果、Fig. 3に示すようにpH 11.5~12.5の範囲でけい光強度は一定となったので、本定量法ではpHを12に調節してけい光強度を測定することにした。

Fig. 3 Effect of pH
p-Benzoquinone : 3.0 μ g/ml

4.3.4 検量線 BQ濃度とけい光強度との関係を検討した結果、BQの(0.5~5.0) μ g/mlの濃度範囲で良い直線関係を示すことが分かった。なお、BQの3.0 μ g/mlにおける変動係数は0.6% ($n=10$)であった。

4.4 1,4-ナフトキノンの定量条件の検討

4.4.1 けい光スペクトル 4.2の定量法に従って測定した励起、けい光スペクトル(未補正)をFig. 4に示す。励起極大波長は534 nmと564 nmにあり、各各を励起波長とした場合のけい光スペクトルはほとんど

Fig. 4 Excitation and emission spectra
1 : Excitation spectrum; 2 : Emission spectrum; 1,4-Naphthoquinone : 0.2 μ g/ml

同じで、そのけい光極大波長は610 nmであった。以後の条件検討には励起波長564 nm, けい光波長610 nmを用いた。

4.4.2 試薬量の影響 硫酸の濃度が(2~10)% (w/v)の範囲でけい光強度は一定であったので、5% (w/v)硫酸を用いることにした。

0.2% ATC溶液の添加量が(1.3~3) mlの範囲でけい光強度は一定であったので、本定量法では0.2% ATC溶液2 mlを加えることにした。

4.4.3 反応条件 反応温度が(65~85)°Cでけい光強度は一定であったので反応温度を75°Cと定めた。次に75°Cにおける反応時間の検討では、(70~120)分の間でけい光強度は一定であったので、反応時間を90分間と定めた。

4.4.4 抽出溶媒と抽出回数 本定量法に用いる抽出溶媒を検討した。クロロホルム、メチルイソブチルケトン、1,2-ジクロロエタン、ベンゼン、キシレンなどの溶媒には抽出されて赤色のけい光を発するが、イソペンチルアルコール、ヘプタン、シクロヘキサンなどの溶媒ではけい光は認められなかった。これらの抽出溶媒のうち、クロロホルムを用いた場合が最も強いけい光強度を示した。

又、4.2の定量法に従って、クロロホルム5 mlで抽出したところ、3回の抽出で完全に抽出されることが分かった。更にこのクロロホルム層の赤色のけい光は、少なくとも24時間は安定であった。

4.4.5 検量線 NQの濃度とけい光強度との関係を求めた結果、NQの濃度(0.01~0.5) μ g/mlの範囲で原点を通る直線関係を示した。なお、NQの0.2 μ g/mlにおける変動係数は1.8% ($n=10$)であった。

5 結 語

(1) *p*-ベンゾキノン(BQ)はATCと酸性で反応し、その反応液をアルカリ性になると黄緑色のけい光(励起極大波長:394 nm, けい光極大波長:530 nm)を発するが、*o*-キノンはけい光を発しない。この反応を利用することにより、BQの微量定量{(0.5~5.0) μ g/ml}が可能であった。又、本法はBQに誘導できるアセトアミノフェンのような医薬品のけい光分析に応用できる。

(2) 1,4-ナフトキノンの(NQ)はATCと酸性で反応し、その反応液をアルカリ性でクロロホルムで抽出し、クロロホルム層の赤色のけい光を測定(励起極大波長:564 nm, けい光極大波長:610 nm)することにより、NQの(0.01~0.5) μ g/mlの範囲で定量ができた。

方, 1,2-ナフトキノンはけい光を発しないという特異性が見いだされた。

なお, 上記けい光物質の構造については検討中である。

(1976年4月, 日本薬学会第96年会において講演)

文 献

- 1) J. Gal, R. Perrin, M. F. Berny : *Bull. Soc. Chim. France*, **1965**, 186; *Chem. Abstr.*, **62**, 13849.
- 2) D. P. Johnson, F. E. Critchfield : *Anal. Chem.*, **33**, 910 (1961).
- 3) H. Tielemann : *Pharmazie*, **25**, 699 (1970).
- 4) J. Tyfczynska : *Diss. Pharm. Pharmacol.*, **21**, 81 (1969); *Chem. Abstr.*, **71**, 53635.
- 5) C. E. Gonter, J. J. Petty : *Anal. Chem.*, **35**, 663 (1963).
- 6) Z. Bellen : *Chem. Anal. (Warsaw)*, **6**, 531 (1961); *Chem. Abstr.*, **56**, 6641.
- 7) M. Kofler : *Helv. Chim. Acta*, **28**, 702 (1945).
- 8) E. Sawicki, W. C. Elbert : *Anal. Chim. Acta*, **23**, 205 (1960).
- 9) 宇野豊三, 谷口寛一: 分化, **21**, 76 (1972).
- 10) I. Tănăsescu, I. Dénes, G. Rusu : *Chem. Ber.*, **90**, 1295 (1957).
- 11) 君島卓三, 岸野 昇: 工化, **47**, 273 (1944).

☆

Fluorimetric determination of quinones with 3-aminothiocarbostyryl. (Fluorimetric analysis with 3-aminothiocarbostyryl. I.) Tomohiko YOSHIDA* and Toyozo Uno** (*Meiji College of Pharmacy, 1-35-23, Nozawa, Setagaya-ku, Tokyo; **Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida-Shimodachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto)

A selective fluorimetric method for the determination of *p*-benzoquinone(BQ) and 1,4-naphthoquinone(NQ) with 3-aminothiocarbostyryl (ATC) was developed on the basis of the fact that characteristic fluorescence was formed by the reaction of ATC with BQ and with NQ, but no fluorescence with *o*-benzoquinone and with 1,2-naphthoquinone. (1) BQ reacts with ATC in a

dilute sulfuric acid solution in the presence of a small amount of hydrogen peroxide. The reaction product develops, in an alkaline solution, a yellow green fluorescence which has the excitation maximum at 394 nm and the emission maximum at 530 nm. Fluorescence is linear over the range (0.5~5.0) $\mu\text{g ml}^{-1}$. The coefficient of variation is 0.6% ($n=10$) for 3.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of BQ. The recommended procedure is as follows: To 5.0 ml of the test solution are added 2 ml of 60% (w/v) sulfuric acid, 0.1 ml of 0.15% hydrogen peroxide solution, and 0.25 ml of 0.1% ethanolic solution of ATC. The mixture is heated in a glass-stoppered test tube for 30 min in a boiling water bath and cooled to room temperature. The reaction mixture is neutralized with 10% sodium hydroxide, adjusted to pH 12 by the addition of 10 ml of 0.5 M NaOH-0.5 M Na_2HPO_4 buffer solution, diluted with water to 50.0 ml. The fluorescence intensity of the solution is measured at 530 nm with excitation at 394 nm. (2) NQ reacts with ATC in a dilute sulfuric acid solution. The reaction product develops, in a chloroform solution, a red fluorescence which has excitation maxima at 534 and 564 nm and emission maximum at 610 nm. Fluorescence is linear over the range (0.01~0.5) $\mu\text{g ml}^{-1}$. The coefficient of variation is 1.8% ($n=10$) for 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of NQ. The recommended procedure is as follows: To 5.0 ml of the test solution are added 2 ml of 5% (w/v) sulfuric acid and 2 ml of 0.2% ethanolic solution of ATC. The mixture is heated for 90 min at 75°C, and cooled to room temperature. Ten ml of 10% sodium hydroxide solution is added to the solution and extracted with three 5-ml portions of chloroform. The chloroform layers are combined and diluted with chloroform to 20.0 ml. The fluorescence intensity of the solution is measured at 610 nm with excitation at 564 nm.

(Received Dec. 18, 1978)

Keywords

3-Aminothiobarbostyryl

p-Benzoquinone

Fluorimetric analysis

1,4-Naphthoquinone