フロークーロメトリーによるリン酸の迅速定量法

藤永 太一郎[®], 岡崎 敏, 堀 智孝*

(1979 年 11 月 8 日受理)

フロークーロメトリーによるリン酸の定量法を研究、開発した。本フロー系では、0.05 M モリブデン酸-1.2 N 硫酸-20 % エタノール混合溶液をキャリアー溶液として用い、この系内に (10~100) μ l のリン酸試料をマイクロシリンジで注入すると、速やかにリンモリブデン錯体が生成し {(15~20) 秒}, 接続しているフロー電解セル室にキャリアーとともに導かれ、+0.25 V 対銀-塩化銀電位で、定量的に 2 電子還元を受ける。このとき記録される電解電気量から、リン酸量が算出されるのであるが、試料の注入量を 100 μ l とすると、(1×10^{-5} ~ 1×10^{-3}) M のリン酸が絶対定量される。その分析所要時間は 1 試料当たり約 2 分であって、簡便なリン酸の定量として機能した。

1 緒 言

100 ppb あるいはそれ以下の濃度範囲で溶存する微量リン酸は通常、黄色リンモリブデン錯体を化学的に還元して得られる青色の発色を利用して、吸光光度法で定量されるが、化学的な還元法を用いると錯体の還元が複雑に進行するため、安定した発色を得るのが困難となる。そのため、この方法によるリン酸の定量は、定量条件が厳しく規定されているのが通例で、しかも、細心の注意を払って操作を実行しても、精度が低くなるといううらみがある。

一方、ポーラログラフによる研究の結果、電解質溶液を適切に選ぶと、リンモリブデン錯体は明りょうな還元波を示し^{1)~3)}、電気化学的に安定な還元を受けることが明らかにされている。又この事実は、液体クロマトグラフ法におけるリン酸イオンの優れた検出法として、有効に利用されている⁴⁾。

本研究では、酸性モリブデン酸溶液をキャリアーとするフロー電解系において、リン酸試料を注入して生成するリンモリブデン錯体を電気化学的に還元し、このときの還元電気量を測定、記録することによって、リン酸を連続的にかつ簡便に絶対定量する方法を検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

リン酸標準溶液は、110°C で十分乾燥させた特級リン酸二水素カリウムを用いて調製した。

* 京都大学理学部化学教室：京都府京都市左京区北白川追分町

0.5 M モリブデン酸ナトリウム溶液、1.2 N 硫酸、並びに常圧下で 1 回蒸留精製したエタノールを準備し、これらの計算量を混合することによって、種々の組成を有する電解質溶液を調製した。

2.2 装 置

種々の電解質溶液中におけるリンモリブデン錯体のポルタモグラムは、回転ディスク・グラッシーカーボン電極 (ディスク直径 3 mm, 回転数 600 rpm) を作用電極、白金線に対極、銀-塩化銀電極を参照電極とする三電極法を適用し、柳本製ポーラログラフ装置 Yanaco, model P-8 を用いて測定した。

パッチ法及びフロー法による定電位電解には、繊維状グラッシーカーボン (東海電極製 F-carbon 3000) の 500 mg を作用電極とし、同様に三電極法を適用した。なお、この際、電位規制及び電流値の測定記録には、柳本製ポテンシオスタット model V8-2010 及びナショナル製ペンレコーダー model VP-654B を使用した。

リンモリブデン錯体の生成速度の測定は、吸光光度法によって行い、島津製作所製自記分光光度計 model UV 200 を使用した。

その他、定流量ポンプとして、ミツミ科学製ベリスタポンプ SJ-1211H を使用した。

3 結果と考察

3.1 キャリヤー溶液組成の検討

フロークーロメトリーによるリン酸の定量法においては、キャリアー溶液が極めて重要な働きをする。すなわち、この溶液の特徴として、(1) リン酸と反応して迅速かつ定量的にリンモリブデン錯体を生成する。(2) リンモリブデン錯体の還元電位では、還元を受けず試薬であると同時に支持電解質として働く。(3) 試薬キャリアー

溶液として長時間安定である。(4) 共存妨害物質, 例えば, ケイ酸イオンなどは反応しない, といった条件を選ぶことができる. このような特徴を有するものとして, ここではモリブデン酸-硫酸-エタノール混合溶液を取り上げ, その最適組成比をリンモリブデン錯体のボルタモグラムに基づいて決定した.

(0.5~1.0) N 硫酸酸性溶液中で, リンモリブデン錯体は, 明りょうな還元波を +0.3V 対銀-塩化銀 (以下, すべての電位は, 銀-塩化銀電極電位を基準にして示す) 近傍に示すが, この条件下ではケイモリブデン錯体も同時に還元波を生じ, 両錯体の還元波を分離するのは困難である. 硫酸濃度を 1.2 N 以上にするとケイモリブデン錯体の還元波は消失するが, Fig. 1, (a) に示すように, 目的錯体の還元波も不明りょうになる. Fig. 1, (b) には, 20% エタノール共存中におけるリンモリブデン錯体のボルタモグラムを示しているが, 錯体の還元波が著しく改善され, 1.2 N 硫酸酸性下でも錯体が十分還元されることが分かる. このような有機溶媒による効果は, 既に吸光光度法^{5)~7)}やポーラログラフ法³⁾でよく知られているが, リンモリブデン錯体を選択的に還元するために, 特に有効に利用できるのである.

Fig. 1 Voltammograms of phosphomolybdate and isopolymolybdate in aqueous (a) and aqueous ethanol solutions (b)

Scan rate : 10 mV/s; 1 : 0.05 M molybdate+1.2 N sulfuric acid; 2 : 0.05 M molybdate+1.2 N sulfuric acid+ 1×10^{-4} M phosphate; 3 : 0.05 M molybdate+1.2 N sulfuric acid+20% ethanol; 4 : 0.05 M molybdate+1.2 N sulfuric acid+ 1×10^{-4} M phosphate+20% ethanol

リンモリブデン錯体の波高 (+0.25V における還元電流値, Fig. 1) は, 溶液中のエタノール濃度はもとより, 硫酸濃度, モリブデン酸濃度に依存して変化する. Fig. 2 の曲線 1 は, 波高とエタノール濃度の関係であ

る. エタノールが増加すると, 波高は急激に増加し, その濃度が 10% (v/v) で最大値に達し, 20% まで一定となる. 一方, モリブデン酸自身の還元によるバックグラウンドの電流値は, エタノール濃度が 10% 以下及び 25% 以上でわずかに認められるが, (10~25)% の濃度範囲では全く観測されず (曲線 2), 錯体のみが還元されることが明らかとなった.

Fig. 3 は, 錯体の還元に及ぼす硫酸濃度の影響を検討した結果である. 曲線 1 で示すように, (0.8~1.2) N 硫酸酸性で, 錯体の還元電流値は一定して最高となる. 一方, 曲線 2 はモリブデン酸自身の還元に基づく電流値を示しているが, 1 N 以下と 1.8 N 以上の硫酸酸性中で, わずかにモリブデン酸が還元される. 両曲線を比較し, 錯体の還元に適した条件として 1.2 N 硫酸酸性を選ぶことができる.

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the reduction current of phosphomolybdate (1) and isopolymolybdate (2)

Molybdate : 0.05 M; Sulfuric acid : 1.2 N; Phosphate (for curve 1) : 1×10^{-4} M

Fig. 3 Effect of sulfuric acid concentration on the reduction current of phosphomolybdate (1) and isopolymolybdate (2) in aqueous ethanol solutions

Molybdate : 0.05 M; Phosphate (for curve 1) : 1×10^{-4} M; Ethanol : 20%

同様に、硫酸 (1.2 N), エタノール (20 %) 共存中におけるモリブデン酸濃度の影響を検討した。その結果、0.03 M 以上のモリブデン酸が存在すると、 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 4×10^{-4} , 1×10^{-4} M の各リン酸濃度に対して、それぞれ一定比例した還元電流値、 $190 \mu\text{A}$, $93.3 \mu\text{A}$, $36.8 \mu\text{A}$, $9.48 \mu\text{A}$ が観測され、リンモリブデン錯体が定量的に生成し、しかも、安定した還元を受けることが明らかとなった。

又、Fig. 4 は錯体の生成速度に対するモリブデン酸濃度の影響を吸光度法によって検討した結果である。すなわち、Fig. 4 はモリブデン酸、硫酸、エタノール混合溶液 (調製した混合溶液中から、あらかじめ 4 ml を光路長 1 cm の石英セルに分取しておく) に計算量のリン酸 (0.1 M リン酸標準溶液 $16 \mu\text{l}$) をマイクロシリンジで注入し、すばやく混合した後、この時点为零時として 420 nm における吸光度の変化を自動記録したものである。錯体の生成速度は特にモリブデン酸濃度に著しく依存し、20 % エタノール、1.2 N 硫酸酸性溶液中において、モリブデン酸濃度が 0.05 M のとき、錯体は 8 秒で定量的に生成する (曲線 1) のに対し、0.04 M では 20 秒程度 (曲線 2)、又、0.03 M では 60 秒以上の時間 (曲線 3) を要することが明らかとなった。

Fig. 4 Effect of molybdate concentration on the formation rate of phosphomolybdate

Phosphate: 4×10^{-4} M; Sulfuric acid: 1.2 N; Ethanol: 20 %; Molybdate: (1) 0.05 M, (2) 0.04 M, (3) 0.03 M

以上の結果に基づいて、0.05 M モリブデン酸-1.2 N 硫酸-20 % エタノール混合溶液は、本フロークロメトリーにおけるキャリア溶液として優れていることを結論した。又、この混合溶液は約 1 週間を経過すると青色を呈するようになるが、着色の程度にかかわらずキャリア溶液として十分働き、2 週間を経過したものでも使用することができることも確かめた。

3.2 錯体の還元に関与する電子数

1×10^{-4} M リンモリブデン錯体溶液 (1×10^{-4} M リン酸, 0.05 M モリブデン酸, 1.2 N 硫酸, 20 % エタノール混合溶液) を調製し、その 100 ml について、バッチ法によって種々の電位で定電位電解を行った。還元に関与する電子数を電位に対してプロットし、その結果を Fig. 5 に示しているが、 $+0.28 \sim +0.20$ V の各電位で、錯体が 2 電子還元を受けることが明らかとなった。なお又、Fig. 5 において、白丸 (○) は除酸素のために窒素を、又黒丸 (●) は空気を通してながら電解した結果であるが、酸素の存否にかかわらず同じ結果が得られ、酸素が妨害とならないことが確かめられた。そのため、以後の実験については除酸素のための操作を省いた。

3.3 フロー電解系の組み立てとその機能

本研究で設計、使用したフロー電解系の概要を Fig. 6 に示す。ガラス製の容器に貯えられたキャリア溶液

Fig. 5 Numbers of electron involved in the reduction of phosphomolybdate at various potentials

At each batch operation, a 100 ml aliquot of the sample solution (composed of 0.05 M molybdate + 1×10^{-4} M phosphate + 1.2 N sulfuric acid + 20 % ethanol) was electrolyzed under bubbling nitrogen gas (○) and/or air (●).

Fig. 6 Schematic diagram for the flow-electrolysis line

Fig. 7 Designs for damper, injection port, mixing and reaction chamber, and flow-electrolysis cell

I : Damper; II : Injection port; III : Mixing and reaction chamber; IV : Flow-electrolysis cell; (a) Silicone rubber tube, 10 mm ϕ ×150 mm; (b) Glass, 1 mm ϕ ×50 mm; (c) Phosphate sample; (d) Carrier solution; (e) Glass tube, 10 mm ϕ ×20 mm; (f) Silicone rubber tube, 2 mm×400 mm; (g) Counter electrode; (h) Reference electrode; (i) Working electrode; (j) To waste

は、一定流速でポンプに吸い上げられ、脈流を消去するためのシリコンゴム製のダンパーを経て試料注入口に導かれる。ここで、マイクロシリンジで注入されるリン酸試料と合流し、混合室及び反応管中での滞留時間で錯体を生成し、フロー電解セルに導かれて電解される。生成した青色錯体は、キャリア溶液とともに流速計を経て廃液そうに入るが、電解に要した電流値はポテンシオスタットに接続したレコーダーに記録され、リン酸の分析値を与える。

上述のフロー系の主要部分の詳細を Fig. 7 に示す。各部品間は、適当な長さを有する内径 2 mm のシリコンゴム管で接続した。Fig. 7 の右下に示す混合室は、内径 7 mm、長さ 20 mm のガラス製で、約 0.77 cm³ の容積となるように設定されている。つまり、100 μ l のリン酸試料が注入付加された場合でも、キャリア溶液組成、特にモリブデン酸濃度が 0.04 M 以上に保たれ、試料注入混合後 20 秒以内で錯体が定量的に生成するのである。又、これに直結する反応管は、内径 2 mm、長さ 400 mm のシリコンゴム製（容積は約 1.26 cm³）で、混合試料はキャリア流速 5 ml/min のとき、少なくとも 15 秒間この中を通過滞留する。Fig. 7 右上は、フロー電解セルの構造である。この型式のセルの機能については、既に詳細な研究がなされているが⁸⁾⁹⁾、本研究では作用電極材料として、Fig. 7 中黒く塗りつぶしてある部分に繊維状グラッシカーボンを使用している。なお、このとき、セルの空容積 (dead volume) は 1.2 cm³ と

実測された。このフローセルを作動するに際して特殊な電極処理は必要ないが、セルに所定電位 (+0.25 V) を印加し始動した後、安定したバックグラウンド電流を得るために (20~30) 分の放置時間が必要である。なお又この電極は、この使用状態で極めて耐久性が良く、繰り返し使用が可能である。万一、劣化した場合には、0.1 M シュウ酸ナトリウム-0.1 M 水酸化ナトリウム混合液で洗浄すると再生される。

本フロー電解系に 1×10^{-4} M リン酸標準溶液 100 μ l 注入し、キャリア流速を 5 ml/min に保って電解電流値を記録すると、Fig. 8 (a) に示すピークが描かれる。試料を注入して 20 秒後に電流値が増加しはじめ 27 秒で極大となり、120 秒で電解が終了する。このときのピーク面積は還元に要した電気量を与え、従って、Faraday の法則によって注入試料中のリン酸量を絶対量として与えることになる。

Fig. 8 Profiles of current-time recordings observed at injections of (a) 100 μ l aliquot of 1×10^{-4} M phosphate standard solution, (b) no injection of sample, (c) 100 μ l of pure water, and (d) a 100 μ l aliquot of 5×10^{-6} M phosphate standard solution

Flow rate of carrier solution : 5 ml/min; Applied potential : +0.25 V vs. Ag-AgCl

3.4 電解効率とピーク電流に及ぼす流速の影響

Fig. 9 は、電解効率とピーク電流値をキャリア流速に対してプロットしたものである。 1×10^{-4} M リン酸標準溶液 100 μ l を注入する場合、曲線 1 に示すように (1~5.4) ml/min の流速の範囲で定量的な電解が起こることが分かるが、曲線 2 より流速が大きくなるほどピーク電流が大きくなることが明らかである。そのため 5 ml/min の流速を採用した。

Fig. 9 Effect of flow rate of carrier solution on electrolysis efficiency (curve 1) and peak current (curve 2) at the reduction of phosphomolybdate

Composition of carrier solution: 0.05 M molybdate + 1.2 N sulfuric acid + 20 % ethanol; Applied potential: +0.25 V vs. Ag-AgCl; A 100 μ l aliquot of 1×10^{-4} M phosphate standard solution was injected at each run

3.5 本法の感度と精度

本電解系を上述のような標準操作で作動させると、定常状態において 400 μ A 程度のバックグラウンド電流が記録される。しかし、この電流は極めて安定したもので、Fig. 8, (b) に示すように、電気計測器のノイズも含めてその変動幅は $\pm 0.1 \mu$ A にすぎない。従って理論的には、1 μ A のピーク電流を十分な精度で検出して、 1×10^{-6} M 程度のリン酸を定量することができるのである (Fig. 9 の曲線 2 より、 1×10^{-4} M リン酸溶液 100 μ l は、125 μ A 程度のピーク電流を示すとして算定した)。しかし実際には、Fig. 8, (c) のように、試料の注入によるバックグラウンド電流の変動が $\pm 1 \mu$ A の幅で現れ、実質上その変動幅の 10 倍、つまり、10 μ A のピーク電流値を測定してはじめてリン酸の定量が可能となる。この濃度をもって本法の定量限界とすると、それは 1×10^{-5} M 程度と見積もられる。又、検出限界濃度として 2 μ A のピーク電流を示す 2×10^{-6} M リン酸濃度を見積もった。5 $\times 10^{-6}$ M リン酸に対して検出されるピークを Fig. 8, (d) に示す。

一方、 1×10^{-4} M リン酸標準溶液 100 μ l を 10 回注入する繰り返し実験の結果、ピーク面積 (電気量) 及びピーク電流値の変動に対する相対標準偏差はそれぞれ 0.7 % と 1.8 % と求められ本法の精度を示すものである。リン酸の定量には通常ピーク面積を用いるが、簡略化してピーク電流値による検量線法を実行してもよい。ピーク電流に対する上記偏差はこの際の精度となるものである。

以上のように、本フロークロメトリーでは ($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$) M のリン酸が定量されることが確かめられたが、その分析所要時間は 1 試料当たり 2 分であって、極めて簡便かつ迅速なリン酸の定量法ということになる。天然水試料に対して、本法の感度は幾分不足するが、農薬、医薬、肥料、洗剤、並びに着色して吸光光度法が実行できない試料などに対しては有効な定量法となりうるものである。本法を種々リ化合物中の正リン酸の分別定量に適用し、その効用を確かめたが、詳細は続報する予定である。

なお、本研究は文部省科学研究費の助成を受けて行ったものである。

(1978 年 10 月、本会第 27 年会において一部発表)

文 献

- 1) D. F. Boltz, T. DeVries, M. G. Mellon: *Anal. Chem.*, **21**, 563 (1949).
- 2) P. Souchay, R. Massart, G. Hervé: *Rev. Polarogr.* (Kyoto), **14**, 270 (1967).
- 3) J. M. Fruchart, P. Souchay: *C. R. Acad. Sci., Paris, Ser.*, **C266**, 1571 (1968).
- 4) 高田芳矩, 武藤義一: 分化, **28**, 15 (1979).
- 5) D. N. Bernhart, A. R. Wreath: *Anal. Chem.*, **27**, 440 (1955).
- 6) R. A. Chalmers, A. G. Sinclair: *Anal. Chim. Acta*, **33**, 384 (1965).
- 7) T. Fujinaga, M. Koyama, T. Hori: *Talanta*, **18**, 960 (1971).
- 8) T. Fujinaga, S. Okazaki, T. Yamada: *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.*, **53**, 452 (1975).
- 9) T. Fujinaga, S. Kihara: *CRC Rev. Anal. Chem.*, **6**, 223 (1977).

☆

A flow-coulometric method for the rapid determination of orthophosphate ion. Taitiro FUJINAGA, Satoshi OKAZAKI and Toshitaka HORI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto)

A flow-coulometric method at the column electrode has been developed for the determination of orthophosphate ion. The principle of the method was as follows: Into a steady flow of carrier solution composed of 0.05 M Na_2MoO_4 , 1.2 N H_2SO_4 , and 20 % ethanol, was injected an aliquot of (10~100) μ l of phosphate sample. The phosphomolybdate complex formed instantaneously (within 20 s) in the flow line was led to the column electrode kept at +0.25 V vs. Ag-AgCl. The electrolytic reduction proceeded with 2-electrons per molecule. The reduction current of the complex was recorded automatically and the amount of phosphate was determined from the net electricity consumed for the electrolysis. When an aliquot of 100 μ l of sample injected at each run to the carrier stream controlled at a rate of 5 ml/min, the sample containing phosphate ranging from $1 \times$

10^{-5} M to 1×10^{-3} M can be analyzed within 2 min.
(Received Nov. 8, 1979)

Keywords

Coulometry

Flow-coulometry

Flow-injection

Phosphate determination

Phosphomolybdate

カルバゾールの硫酸による抽出分離とけい光光度定量法

古沢 源久[®], 橘 正 樹, 小玉 洋司*

(1979 年 11 月 1 日受理)

多環芳香族化合物中の少量のカルバゾールをけい光法で定量するための分離法として、硫酸による抽出法を考案した。シクロヘキサンを溶媒として使用し、カルバゾールを抽出するのに適した硫酸濃度を検討した結果、(84~85)% が最適であった。硫酸溶液のままでは、カルバゾールのけい光を測定することが困難であるので、水で希釈した後シクロヘキサンでカルバゾールを逆抽出して分離した。この方法により、試料 (1~10)mg 中に含まれている (0.5~80) μ g のカルバゾールを 97% の回収率で再現性よく分離することができた。キノン類などを除く多くの多環芳香族化合物の除去割合は 99.8% 以上であった。

1 緒 言

カルバゾールは通常 330 nm 付近に励起の極大を、345 nm 付近にけい光の極大を示すが、比較的短波長側であるために、共存する多環芳香族化合物の影響が大きい。この影響を小さくする方法として、Sawicki¹⁾が提案した方法と著者の一人である古沢ら²⁾が提案した方法とがある。これらはカルバゾールをイオン化することにより測定波長を長波長側にシフトさせる方法であり、古沢らは更にヨウ化物イオンによる消光を併用している。これらの方法により多環芳香族化合物の影響をかなり小さくしうるが、カルバゾールに比して多環芳香族化合物の共存量が多くなると定量が困難である。

著者らはこれらの試料中のカルバゾールを定量するために、その分離法を検討した。この結果、硫酸抽出法が有効であり、試料 (1~10)mg 中に含まれている (0.5~80) μ g のカルバゾールを 97% の回収率で再現性よく分離することができたので報告する。キノン類などを除く多くの多環芳香族化合物の除去割合は 99.8% 以上であった。

2 実験及び結果

2.1 装置及び試薬

分光けい光光度計：日立製 204 型を使用した。記録計は 056 型を、光源は 150 W キセノンランプを使用した。セルは 10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 45 mm のものを使用した。

シクロヘキサン：市販特級品を硫酸で 2 回洗浄した後、水酸化ナトリウム水溶液と水で洗浄した。塩化カルシウムで乾燥した後蒸留して精製した。

硫酸：市販精密分析用を使用した。

カルバゾール：帯域溶融法により精製した。

アントラセン、フェナントレン、フルオレン、ジベンゾフラン、アセナフテン、フルオランテン、ピレン、ピフェニル、ナフタレン：いずれもシクロヘキサンに溶解し、84% 硫酸での洗浄を数回繰り返した。水洗した後溶媒を減圧下で揮発させて除去した。

アントラキノン、フェナントレンキノン、9-フルオレン：いずれも帯域溶融法により精製した。

2.2 定量操作法

試料 (1~10)mg を量り取り、シクロヘキサン 20 ml に溶解する。50 ml 分液漏斗中で (84~85)% 硫酸 10 ml とともに 2 分間振とうしてカルバゾールを抽出する。2 相に分離後はなるべく速やかに硫酸相を水約 70 ml 中

* 山梨大学工学部工学基礎教室：山梨県甲府市武田 4-3-11