cts with cobalt in an aqueous solution in the presence of non-ionic surfaceactive agent, Triton X-100, to form a soluble complex. The optimum conditions for the spectrophotometric determination of cobalt and the removal of the interference from diverse ions were studied. The absorption maximum of the cobalt-TAP complex, that of the reagent blank and the isosbestic point at pH 6.7 ± 0.3 were at 560 nm, 480 nm, and 508 nm, respectively. The absorbance of the complex was constant in the pH range from 6.2 to 7.2. Beer's law was valid up to $15.0 \mu\text{g}/25 \text{ ml}$ of cobalt and the apparent molar absorption coefficient was about $5.0 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The binding ratio of cobalt and TAP in the complex was 1 : 2. The proposed procedure is as follows: To a sample solution containing $10 \mu\text{g}$ of cobalt in a 100 ml beaker, add 5 ml of sodium acetate and borate buffer (pH 7) and 1 ml of Triton X-100 (0.2 g/ml) solution. Then, control the total volume from 15 ml to 20 ml with water, and adjust to pH 6.7 ± 0.3 with 0.1 M sodium hydroxide or 0.1 M hydrochloric acid. Add 0.8 ml of 10^{-3} M TAP-dioxane

accurately, and heat the solution on a boiling water bath for about 10 min and cool. Transfer the solution into a 25 ml volumetric flask and dilute it until the mark with water. Measure the absorbance at 560 nm against the reagent blank or water. The determination gives a positive error in the presence of nickel(II), copper(II), zinc(II), palladium(II) or cadmium(II), and gives a negative error in the presence of ions, which precipitate at pH 6.7 ± 0.3 . In order to remove the interference the precipitation method, the masking method, and the solvent extraction method based on cobalt β -nitroso- α -naphthol complex were studied, and good results were obtained. Cobalt in metallic iron was determined successfully by this method.

(Received Dec. 24, 1981)

Keyword phrases

spectrophotometric determination of cobalt(II); 10-(2-benzothiazolylazo)-9-phenanthrol; non-ionic surfactant, Triton X-100; cobalt in metallic iron.

イオン会合性試薬を用いるニコチンの吸光光度定量

松岡 俊恵, 三井 利率*[Ⓐ]

(1981 年 11 月 17 日受理)

イオン会合性試薬であるトロペオリン OO 及びカルコンを用いて, ニコチンを高感度で迅速に定量する方法を検討した。

方法は, 試料水溶液に pH 4.35 の Britton-Robinson 緩衝液 2 ml, イオン会合性試薬水溶液 1 ml, ジクロロメタン 5 ml を加え, ニコチンのイオン会合体をジクロロメタン層に抽出後, トロペオリン OO は 408 nm あるいは 540 nm, カルコンは 530 nm で定量した。

この方法では Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} がニコチンに対し (3~5) 倍共存すると測定値に負の影響を与えるが, EDTA を添加することによりその影響の除去が可能であった。本方法による定量範囲はトロペオリン OO で測定波長 408 nm では $0 \sim 1.1 \times 10^{-4} \text{ M}$, 540 nm では $0 \sim 7.4 \times 10^{-5} \text{ M}$, カルコンでは $0 \sim 1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ であった。

1 緒 言

タバコ中のあるいは硫酸塩として農薬に用いられているニコチンの定量法としては, 既にガスクロマトグラフィー^{1)~3)}, あるいは吸光光度法⁴⁾が数多く報告されている。本報ではニコチンを簡単かつ迅速に定量することを目的としてイオン会合性試薬の利用を検討した。その結

果, イオン会合性試薬としてトロペオリン OO (オレンジ IV), カルコンが利用できることが明らかとなったので, これらを用いた定量条件を検討した結果を報告する。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

イオン会合性試薬: トロペオリン OO 水溶液は, 市販試薬 (和光純薬製) 0.161 g を 100 ml のビーカーとと

* 愛知県犯罪科学研究所: 愛知県名古屋市中区三の丸 2-1-1

もにひょう量し、蒸留水約 80 ml を加えた後 3 時間静置する。次いでデカンテーションにより水溶液を 100 ml のメスフラスコに移し蒸留水で全量を 100 ml とした。溶液の濃度は不溶のトロペオリン OO をビーカーとともに乾燥した後ひょう量し、最初の値との差から求めた。濃度は 1.09 mg/ml (2.91 μ mol/ml) である。カルコン水溶液は市販特級試薬 (東京化成製) 0.456 g を採り蒸留水で全量を 100 ml とした。濃度は 4.56 mg/ml (10.96 μ mol/ml) である。その他のイオン会合性試薬は市販品 (エリオクロムブラック T, クロムアズロール S は同仁化学製, その外は東京化成製) をそのまま蒸留水に溶かし使用した (濃度はすべて約 10 μ mol/ml とした)。

ニコチン: 市販特級試薬 (東京化成製) を減圧蒸留し使用した。

その他の試薬は市販特級試薬をそのまま使用した。

2.2 装置

分光光度計: 624 型デジタル分光光度計 (日立製) を使い, 1 cm のガラスセルを使用した。吸光度はこの機器の測定可能な範囲 0~2.0 の間でを行った。

pH メーター: 日立-堀場 F-7 形 pH メーターを使用した。

振とう機: イワキ V-D 式振とう機を使用した。

3 定量方法

ニコチンの希塩酸 (約 0.05 N) 溶液 (0.1~1) ml に 1.09 mg/ml のトロペオリン OO 水溶液あるいは 4.56 mg/ml のカルコン水溶液の 1 ml, Britton-Robinson 緩衝液 2 ml, ジクロロメタン 5 ml を加え 2 分間振とうする。15 分間静置後, トロペオリン OO はジクロロメタン層の 408 nm, カルコンは 530 nm の吸光度を求める。なおトロペオリン OO についてはジクロロメタン層の 2 ml を採り, 塩酸のメタノール溶液 (濃塩酸 10 ml をメタノールで全量 100 ml としたもの) の 0.5 ml を加え 540 nm の吸光度についても求める。

ここでジクロロメタン層に抽出されたイオン会合体の組成はイオン会合性試薬, ニコチンともに 1 価のイオンであることからモル比 1:1 で抽出されているものと考えられる。

4 実験結果及び考察

4.1 イオン会合性試薬及び抽出溶媒の検討

ニコチンとイオン会合体を形成し有機溶媒に抽出されるイオン会合性試薬としては, トロペオリン OO, カルコン, エリオクロムブラック T, ジンコン, クロムアズロール S などがある。しかしトロペオリン OO, カルコン以外は感度が悪く使用不可能であった。次いでやや感度の悪いイオン会合性試薬も含め抽出溶媒の検討を試みたところ, Table 1 に示すような結果が得られた。この

Table 1 Effect of extractable solvent and molar absorptivity

Solvent	Reagent			
	Tropacoline OO	Calcon	Chromazol S	Zincon
Chloroform	10000	8000	1700	1800
Dichloromethane	18000	12000	1000	3700
	25000 (+HCl)			
1, 2-Dichloroethane	6000	6000	—	—

Ion association complexes did not extract by carbontetrachloride and benzene, and 4-methyl-2-pentane extracts did not determined for the strong absorbance of blank.

ことからイオン会合性試薬はトロペオリン OO, カルコンが, 抽出溶媒はジクロロメタンが最適と考えられた。この組み合わせで 3 の定量操作における最大吸収波長はトロペオリン OO で 408 nm, カルコンで 530 nm, トロペオリン OO で塩酸を添加したものの最大吸収波長は 540 nm であった (Fig. 1)。なお抽出溶媒の検討で MIBK についてはトロペオリン OO, カルコンともに空試験の吸光度が大きくこの抽出溶媒を用いての定量は不可能であった。

Fig. 1 Absorption spectra of the reagent-nicotine in dichloromethane

—: Tropacoline OO; ----: Tropacoline OO+HCl;: Calcon

4.2 抽出 pH の検討

イオン会合体をジクロロメタンに抽出するときの最適 pH 域について検討した。結果を Fig. 2 に示す。pH の調節には Britton-Robinson の混酸広域緩衝液を用いた。トロペオリン OO, カルコンともに pH 4.1 から 4.8 の間で最大吸光度を示した。本実験では条件に適合する pH 域のはほぼ中間である pH 4.35 を用いることとした。

Fig. 2 Effect of pH on extraction

—○—: Tropaeoline OO (nicotine 8.6×10^{-5} M, 408 nm); —●—: Calcon (nicotine 1.5×10^{-4} M, 530 nm)

4.3 試薬添加量の検討

トロペオリン OO 及びカルコンの最適添加量について検討したところ Fig. 3 に示したようにトロペオリン OO はモル比で 17.3 倍, カルコンは 6.5 倍以上の添加量で一定の最大吸光度を示した. 本実験では試薬添加量を最低 26 倍以上添加することとした.

Fig. 3 Effect of amount of the tropaeoline OO or calcon on absorbance

—○—: Tropaeoline OO (nicotine 7.4×10^{-5} M, 408 nm); —●—: Calcon (nicotine 1.2×10^{-4} M, 530 nm)

4.4 振とう時間及び静置時間の検討

トロペオリン OO 及びカルコンについて 3 の定量操作における最適振とう時間を検討したところ Fig. 4 に示すような結果が得られた. トロペオリン OO は検討

Fig. 4 Effect of shaking time on absorbance

—○—: Tropaeoline OO (nicotine 5.4×10^{-5} M, 408 nm); —●—: Calcon (nicotine 1.4×10^{-4} M, 530 nm)

時間内では全く変化は認められなかったが, カルコンについては 5 分以上で吸光度が減少した. この原因は不明である. 静置時間についてはトロペオリン OO, カルコンともに検討した (1~120) 分間の間では吸光度に全く変化は認められなかった.

4.5 検量線

3 の定量操作に従って作成したトロペオリン OO の 408 nm, 540 nm, カルコンの 530 nm における検量線はいずれも原点を通る直線を与えた. 定量範囲はトロペオリン OO 408 nm で $0 \sim 1.1 \times 10^{-4}$ M, 540 nm で $0 \sim 7.4 \times 10^{-5}$ M, カルコン 530 nm で $0 \sim 1.7 \times 10^{-4}$ M であった. 再現性をトロペオリン OO についてはニコチン $34.1 \mu\text{g}$ (2.1×10^{-4} M), カルコンについては $68.1 \mu\text{g}$ (4.2×10^{-4} M) を用いて各々 15 回行い検討したところ, それぞれ 408 nm で標準偏差 $0.54 \mu\text{g}$, 変動係数 1.6 %, 540 nm で標準偏差 $0.58 \mu\text{g}$, 変動係数 1.7 %, 530 nm で標準偏差 $1.57 \mu\text{g}$, 変動係数 2.3 % の結果が得られ十分満足できるものであった.

4.6 共存物質の影響

トロペオリン OO はニコチン $34.1 \mu\text{g}$, カルコンはニコチン $68.2 \mu\text{g}$ を用いて 3 の定量操作を行い, タバコあるいは農薬 (散布したものも含む) 中に共存の考えられる物質の影響について検討したところ, Table 2 に示したような結果が得られた. ここで影響を示した Fe^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} は試料溶液に EDTA 2 ナトリウム塩の $58 \mu\text{mol/ml}$ 溶液 1 ml を加え 3 の操作を行

Table 2 Effect of diverse metal ions and organic compounds

Metal ions or organic compounds	Compounds/nicotine (mol/mol)		Recovery (%)	
	Tropaeoline OO	Calcon	Tropaeoline OO	Calcon
K ⁺	5.9	3.0	100	101
Ca ²⁺	4.9	2.5	88	102
Ca ²⁺ +EDTA	4.9	2.5	98	100
Mg ²⁺	7.7	3.8	73	108
Mg ²⁺ +EDTA	7.7	3.8	100	100
Fe ³⁺	3.2	1.6	90	65
Fe ³⁺ +EDTA	3.2	1.6	98	100
Ni ²⁺	4.6	2.3	88	15
Ni ²⁺ +EDTA	4.6	2.3	96	108
Co ²⁺	3.4	1.7	85	57
Co ²⁺ +EDTA	3.4	1.7	100	99
Cu ²⁺	3.1	1.6	95	24
Cu ²⁺ +EDTA	3.1	1.6	98	101
Al ³⁺	4.1	2.0	100	95
SO ₄ ²⁻	4.0	2.0	101	96
Glucose	15.8	7.9	103	94
Glycine	69.3	34.7	100	100
Glycerol	72.6	36.3	100	98

Nicotine was used 4.2×10^{-5} M (Tropaeoline OO) or 8.4×10^{-5} M (Calcon). Metal ions were added as nitrate. EDTA Na_2 was added of 5.8×10^{-2} M.

うと共存物質が (3~5) 倍量共存していてもカルコンにおける Ni²⁺ を除きその影響の除去が可能であった。

以上のことからトロペオリン OO, カルコンを用いるニコチンの定量が可能と考えられ, 上記の結果からトロペオリン OO を用い 540 nm で測定する方法が最適と考えられる。

5 応 用

種類の異なる市販タバコに 0.5 N 塩酸 20 ml を加え 100 °C で 3 分間加熱しニコチンを抽出²⁾ 後蒸留水で全量を 100 ml としたのについて, その 1 ml を採りトロペオリン OO を用い 3 の定量操作を行い 540 nm で吸光度を測定したところ Table 3 に示すような結果が得られた。この値は 259 nm, 236 nm, 282 nm を用いる吸光光度法⁵⁾ の測定結果ともよく一致している。

農薬については, 試料を蒸留水で希釈しその 0.5 ml を用い 3 の定量操作を試みたところ Table 3 に示したような結果が得られた。この値は 259 nm を用いる吸光光度法⁵⁾ の測定結果とよく一致している。これらのことから本方法はニコチンの定量に十分利用できるものと考えられた。

6 結 語

ニコチンをイオン会合性試薬であるトロペオリン OO, カルコンを用いイオン会合体としてジクロロメタンに抽

Table 3 Determination of nicotine in tobacco or pesticides

Sample	Ion associate	Spectrophotometric method ⁵⁾
1	1.51 (w%)	1.55 (w%)
2	1.65 (")	1.60 (")
3	1.81 (")	1.83 (")
4	1.33 (")	1.40 (")
5	1.39 (")	1.41 (")
6	1.54 (")	1.49 (")
7	0.41 (g/ml)	0.41 (g/ml)
8	0.43 (")	0.42 (")
9	0.40 (")	0.40 (")
10	0.42 (")	0.41 (")

1~6 : Tobacco; 7~10 : Pesticides

出し, 吸光度から定量する方法を検討した。トロペオリン OO の吸収極大は 408 nm, 塩酸を添加することにより吸収極大は 540 nm に移動する。カルコンの吸収極大は 530 nm にある。それらの検量線はトロペオリン OO の 408 nm で $0 \sim 1.1 \times 10^{-4}$ M, 540 nm で $0 \sim 7.4 \times 10^{-5}$ M, カルコンの 530 nm で $0 \sim 1.7 \times 10^{-4}$ M の間ではよい直線性を示し, 見掛けのモル吸光係数はトロペオリン OO の 408 nm で 18000, 540 nm で 25000, カルコンの 530 nm で 12000 であった。

本方法は操作が簡単で再現性もよくニコチンの定量に十分応用できるものと考えられた。

文 献

- 1) E. Heffman: "Chromatography, A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods", p. 699 (1975), (Van Nostrand Reinhold Company, New York).
- 2) 安松範郎, 村山トメ子: 秦野たばこ試験場報告, **63**, 75 (1969).
- 3) G. D. First, G. L. Huber: *Anal. Chem.*, **52**, 1755 (1980).
- 4) M. Yamamoto, T. Uno: *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2237 (1976).
- 5) D. L. Park, W. Horwitz, A. Senzel, H. Reynolds: "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", p. 54 (1975), (Association of Official Analytical Chemists, Washington).

☆

Spectrophotometric determination of nicotine with ion association reagents. Toshiyasu MATSUOKA and Toshiyuki MITSUI (Criminal Science Laboratory Aichi Prefecture, 2-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi)

Tropaeoline OO or calcon forms an ion-association complex with nicotine at pH 4.1~4.8 which can be extracted into dichloromethane. The concentration of the nicotine can be determined by measuring the absorbance of the extracts at 408 nm or 540 nm (tropaeoline OO), or 530 nm (calcon). Calibration curve obeyed Beer's law over the range of $0 \sim 1.1 \times 10^{-4}$ M

(408 nm), $0 \sim 7.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ (540 nm), and $0 \sim 1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ (530 nm), respectively. The procedures for the determination are as follows. In a 10 ml test tube, place 1 ml of the sample solution containing less than $1.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ of nicotine, 1 ml of reagent solution containing $2.9 \times 10^{-3} \text{ M}$ of tropaeoline OO or $1.1 \times 10^{-2} \text{ M}$ calcon, 2 ml of Britton-Robinson buffer solution (pH 4.35), and 5 ml of dichloromethane. Shake the solution for 2 min mechanically and allow to stand for 15 min. Measure the absorbance at 408 nm (tropaeoline OO) or 530 nm (calcon) with 1 cm glass cells. When tropaeoline OO is used, take 2 ml of the dichloromethane layer, add 0.5 ml of methanol solution of 10 % hydrochloric acid and measure the absorbance at 540 nm using 1 cm glass cells. The proposed method

is much simpler and can be done more rapidly than gas chromatography, and it is useful for the determination of trace amounts of nicotine. No detectable interference for the determination of nicotine occurred with any other compounds, such as glucose, glycine, and glycerol. Interference of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} were eliminated by adding 1 ml of $5.8 \times 10^{-2} \text{ M}$ EDTA solution.

(Received Nov. 17, 1981)

Keyword phrases

spectrophotometric determination of nicotine; ion association reagent, tropaeoline OO, calcon.

光音響法による生体高分子の微量定量

升 島 努, 今井日出夫[®], 吉田 久信,
和田 克哉, 応和 卓治, 寺尾 史子*

(1982 年 1 月 6 日受理)

フィルターアッセイ-光音響法によりたん白質, 糖たん白質, 核酸の微量定量を試みた. たん白質にはアミノブラック, 糖たん白質にはアミノブラック及びアルシアンブルー, 核酸にはトルイジンブルーの各色素を結合させ, これらの生体高分子-色素複合体を 適当な沈殿形成溶媒 (アルコール-酢酸-水混液をたん白質, 糖たん白質に, 酢酸-水混液を核酸に) を用い沈殿させた. この沈殿を 濾過によりメンブランフィルター上に捕捉し, そのまま乾燥させ光音響法で測定した結果, これら生体高分子のサブマイクログラム領域での高感度な微量定量が可能となった.

1 結 言

光音響法 (PAS) は生体関連物質に関して, 食用色素¹⁾, 発がん性色素²⁾, 金属イオンなど^{3)~5)}の微量分析に適用されており, これらの高速液体クロマトグラフィーや²⁾ 薄層クロマトグラフィー^{6)~7)}においても PAS による検出が試みられている. しかし生体成分の微量定量に応用した例は数少ない. 生体高分子成分について, 中尾らは⁸⁾⁹⁾ たん白質を色素と結合させる比色定量法を報告しており, 又フィルターへのたん白質の吸着を利用した蛍光標識たん白質の蛍光定量法も報告されている¹⁰⁾¹¹⁾. 著者らはこの色素結合法と PAS を組み合わせると, た

ん白質, 糖たん白質, 核酸の高感度分析ができることを見いだしたので報告する.

2 試料及び測定

2.1 試 料

たん白質として, アルブミン (ウシ血清, フラクシオン V), 卵白リゾチーム, ミツバチ毒液メリチン, ウシすい液インシュリン, ブタ胃ペプシン, 糖たん白質として, ウシがく下せんムチン, ヒトトランスフェリン, ヒトイムノグロブリン G, ムコ多糖として, ヒアルロン酸, 核酸として, 子牛胸せん DNA の市販品 (イムノグロブリン G はミドリ十字, その他はすべてシグマ社製) をそのまま水溶液として用いた. DNA は水を少量ずつ加え, 4 日間で溶解させた. 試料溶液は 4°C , あるいは -12°C に保存した. その他の試薬はすべて試薬特級を用いた.

* 広島大学医学部薬品分析化学教室: 広島県広島市南区霞 1-2-3