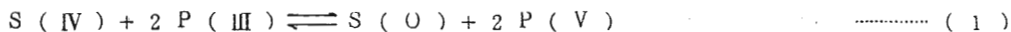


佐賀医科大学 地域保健科学教室
〒840-01 佐賀市鍋島町鍋島三本杉

亜硫酸が酸性加熱条件下で、ホスホン酸を酸化し、オルトリン酸を生成する反応を利用する亜硫酸のフローインジェクション分析法を試みた。亜硫酸試料溶液 ($1 \times 10^{-4} \text{M} - 1 \times 10^{-2} \text{M}$) をホスホン酸試薬溶液 ($1 \times 10^{-2} \text{M}$) および強酸性のモリブデン(V) - モリブデン(IV) 混合試薬溶液 ($1.6 \times 10^{-2} \text{M} [\text{Mo}]$, $3.8 \text{M} [\text{H}^+]$) と混合し、 140°C で約1分加熱する。酸化反応によって生じるオルトリン酸と、モリブデン酸とが反応して生成する青色のヘテロポリ酸錯体を 800nm にてモニターする。検出限界は $2 \times 10^{-5} \text{M}$ 、分析速度は毎時60検体、 $4 \times 10^{-3} \text{M}$ の試料についての10回繰り返し分析精度は、相対標準偏差で2%であった。加熱温度あるいはホスホン酸試薬溶液濃度を上げることにより、さらに感度を高めることが可能である。

結 言

酸性条件下で、亜硫酸とホスホン酸(亜リン酸)を反応させると、硫黄の沈澱を生じ、上澄にオルトリン酸が生成する。¹⁾この反応より次の反応式(1式)が想定される。



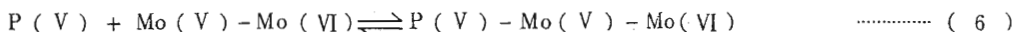
この反応が右側へ進む可能性は、ホスホン酸および亜硫酸の酸化還元電位の式(2式および3式)から求められる(1)式の酸化還元平衡定数 K (4式)が(5式)のように大きいことから示唆される。

$$E_P = 0.29 + 0.0591 / 2 \log \{ \text{P(V)} \} / \{ \text{P(III)} \} \quad \text{..... (2)}$$

$$E_S = 0.45 + 0.0591 / 4 \log \{ \text{S(IV)} \} / \{ \text{S(O)} \} \quad \text{..... (3)}$$

$$K = \{ \text{P(V)} \}^2 \{ \text{S(O)} \} / \{ \text{P(III)} \}^2 \{ \text{S(IV)} \} \quad \text{..... (4)}$$

(1)式によって生じるオルトリン酸と、強酸性のモリブデン(V) - モリブデン(VI) 混合試薬との反応(6式)によって生成するヘテロポリ酸を測定することによるホスホン酸の定量は、すでに確立され実用されている。²⁾ この方法は、反応を酸性条件下で加熱して(沸騰水中1時間)行うため、試験管のような開放系の器具を用いる場合、亜硫酸試薬が一部気体となって失われるが、過剰に加えるので、酸化反応は定量的に進行する。



これに対し、同様の反応系によって亜硫酸を間接的に定量する方法は、気体の生成を伴うため、開放系で反応を行う通常のマニュアル法による分析は難しい。フローインジェクション分析法(FIA)では、反応を閉鎖系で行うので、酸化に伴う亜硫酸の損失を防ぐことができる。³⁾そこで著者は、FIAのこの特徴を活かした亜硫酸の間接定量法を検討した。

装置、試薬および試料

装置

Fig. 1に装置図を示す。装置および操作の概要は、ホスホン酸定量用に使用した高圧型FIAシステム³⁾とはほぼ等しい。試料ををループバルブインジェクターを用いて導入し、M点でモリブデン(V) - モリブデン(VI) 試薬 ($1.6 \times 10^{-2} M [Mo]$, $3.8 M [H^+]$) およびホ

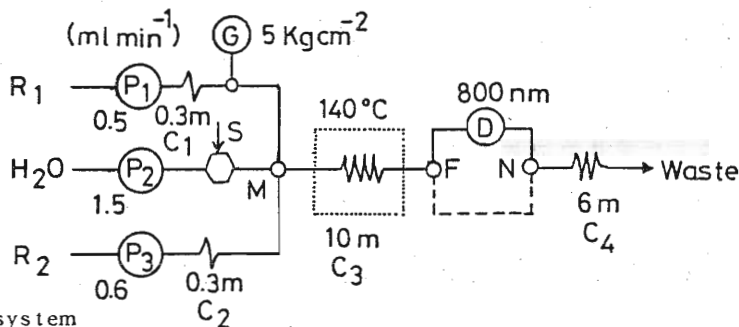


Fig. 1 Flow system

R_1 : Phosphonate reagent solution; R_2 : Molybdenum reagent solution; P_1, P_2, P_3 : Reciprocating pumps (P_1, P_3 : Kyowa KHU-W-52, P_2 : Kyowa KWU 90H); C_1, C_2 : Damper coil (Technicon No. 065-116-0536-13); S: loop-value sample injector (Seishin VMU-6, sample loop: PTFE, 0.5 mm i. d., 8 cm, 80 μ l); G: Pressure gauge (Kyowa KPG 50N); C_3 : Reaction coil (PTFE, 0.5 mm i. d.); F: Four-way valve (Kyowa KMM-4V); D: Spectrophotometric detector (Hitachi 200-10); N: Three-way joint; C_4 : Back-pressure coil (PTFE 0.3mm i. d.)

スホン酸試薬 ($1 \times 10^{-2} M$) と合流させる。反応コイルを通る間 (約 1 分) に生成するヘテロポリ酸の 800 nm における吸光度をフローセル (光路長 8 mm, 容積 8 μ l) 付分光光度計でモニターする。F は検出ピークの頂点で、流路を凶の破線方向へ切り換え、試料を検出器内に停留させて反応の進行度を観察する (ストップフロー法) ための切り換えバルブである。本バルブは四方切換えバルブを一方盲栓し三方として用いている。分岐した流路は、検出器直後の N 点において三方ジョイントを用いて連結する。こうすることにより、背圧をかけながら試料を検出器内に停留させることができる。

試薬および試料

特に断らない限り試薬はすべて特級品、また水は脱イオン蒸留水を用いた。

貯蔵用モリブデン試薬; 文献²⁾に準じて調製した。モリブデン酸アンモニウム ($(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4 H_2 O$) 粉末 35 g を 6 M 塩酸 400 ml に溶かす。以下の操作は、水冷しながら行う。約 3 g の砂状金属亜鉛をゆっくり加える。亜鉛が完全に溶解後、この溶液に濃塩酸 200 ml、引き続き濃硫酸 400 ml をゆっくり加える。冷却後水を加えて 1 L とする。

F I A 用モリブデン試薬; 緑色の貯蔵用モリブデン試薬 200 ml を水で 1 L に希釈する。

ホスホン酸試薬; ホスホン酸ナトリウム ($Na_2 P H O_3 \cdot 5 H_2 O$) を水に溶解する。

亜硫酸試料; 亜硫酸水素ナトリウム ($Na H S O_3$) を水または水酸化カリウム溶液に溶解して用いる。酸化分解され易いので、調製後すみやかに分析に供する。

オルトリン酸試料; オルトリン酸 1 カリウム塩 ($K H_2 P O_4$) を水または水酸化カリウム溶液に溶解して用いる。

結果および考察

検出感度

反応 (1 式) が定量的に進行すれば、亜硫酸 1 分子に対して、オルトリン酸 2 分子が生成するので、ヘテロポリブルー生成によるオルトリン酸の検出感度の 2 倍、すなわちモル吸光係数にして約 5 万が期待される。F I A では、反応が完結する場合でも、試薬流による希釈や、試料ゾーンの分散効果によってマニュアル法より感度が低下する。Fig. 1 に示す装置での、オルトリン酸のみかけのモル吸光係数 (試料濃度、ピーク高吸光度、セル長より求める) は約 1800 であった。そこで、亜硫酸については、みかけのモル吸光係数約 3600 が達成できるという期待のもとに検討を行った。

反応槽温度と検出感度

Fig. 2 に検出感度への反応槽 (silicone oil-bath, Thomas T-201) 温度の影響を示した。実線は $5 \times 10^{-3} M$ の試料のピーク高の変化を示し、破線はベースラインの吸光度の変

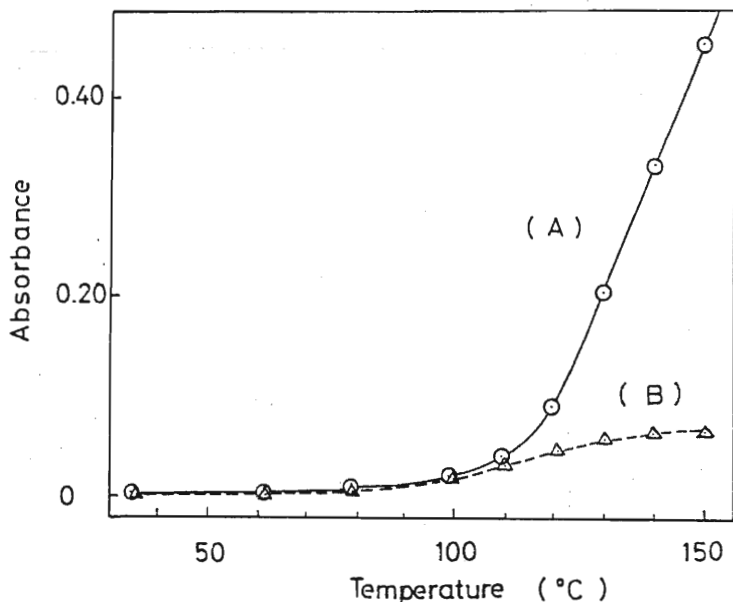


Fig. 2. Effect of the temperature of the heating bath on the peak height absorbance of sulfite sample ($5 \times 10^{-3} M$) and base-line absorbance.

(A) peak height, (B) base-line. $1 \times 10^{-2} M$ of phosphonate reagent was used.

化を示す。ベースラインの吸収は、ホスホン酸試薬中に約 0.05% 程度含まれるオルトリン酸に起因する。ベースラインの吸光度、すなわちオルトリン酸の発色は $140^{\circ}C$ 付近ではほぼ一定になる。⁴⁾ 一方、亜硫酸の検出ピーク高は $110^{\circ}C$ 付近から急激に上昇を開始し、 $120^{\circ}C$ から $150^{\circ}C$ へは、ほぼ直線的に感度が上昇してゆく。 $150^{\circ}C$ における亜硫酸のみかけのモル吸光係数は約 130 で、予定の感度の 28 分の 1 であった。温度をさらに上げることにより、感度を高めることが可能と考えられるが、残念ながら、現在の装置では $150^{\circ}C \sim 160^{\circ}C$ が耐熱性の限度である。さらに耐熱および耐圧性に優れた反応管および検出器の開発が望まれる。

ホスホン酸試薬濃度と検出感度

もう一つの感度上昇の手段として、ホスホン酸試薬濃度を上げることを試みた。結果を Fig. 3 に示す。前述したようにホスホン酸試薬中にオルトリン酸が不純物として含まれているために、ホスホン酸試薬濃度上昇に比例して、ベースラインの吸光度が増大する。亜硫酸 $5 \times 10^{-4} M$ の検出ピーク高もホスホン酸試薬濃度上昇に比例して高くなっている。ホスホン酸濃度 $5 \times 10^{-2} M$ を用いた場合の亜硫酸のみかけのモル吸光係数は約 430 で、予定感度の約 8 分の 1 を達成している。FLA では、多少ベースラインに吸収があっても精度良く測定できる利点があるが、吸光度の増大に伴い、定量域の縮小やノイズレベルの増大等の問題も生じる。ホスホン酸試薬中のオルトリン酸不純物を除くことができれば、目標の感度達成も可能と思われる。

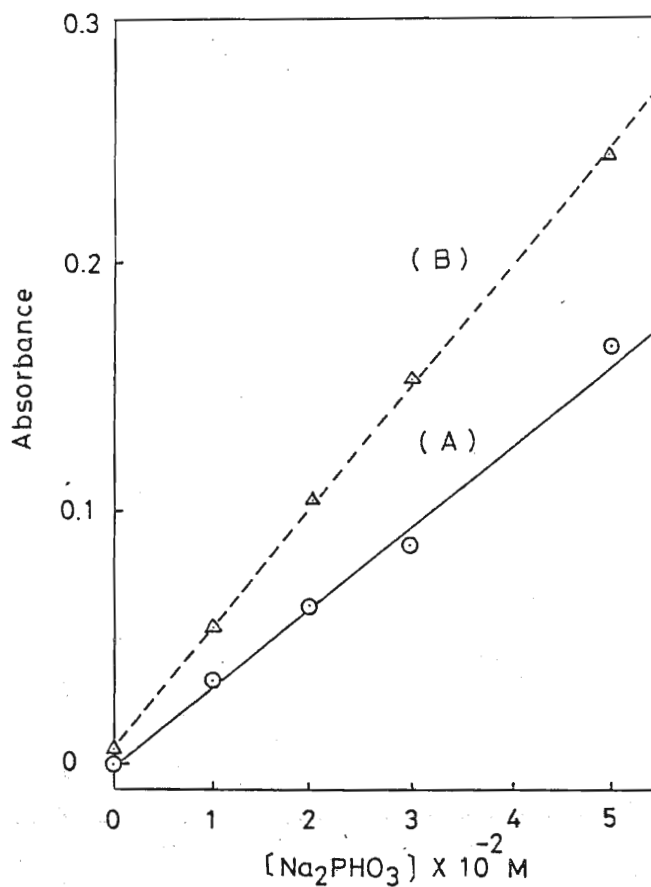


Fig. 3. Effect of phosphonate reagent concentration on the peak height absorbance of sulfite sample ($5 \times 10^{-4} M$) and base-line absorbance.

(A) peak height, (B) base-line. Temperature of the heating bath was kept at $140^{\circ} C$.

検量線および測定精度

Fig. 5 A に、 $2 \times 10^{-3} M$ から $1 \times 10^{-2} M$ の検出ピークを示す。分析速度は毎時 60 検体で、直線性は良い。最大分析速度 (6 σ 換算) は毎時 120 検体であり、検出限界 ($S/N=2$) は $2 \times 10^{-5} M$ であった。検出限界については、反応槽温度やホスホン酸試薬溶液濃度を上げることにより、また試料体積を増すことにより下げることが可能である。10 回繰り返し測定精度 (RSD) は、 $4 \times 10^{-3} M$ の試料について 2% であった。Fig. 5B は、ストップフロー法による経時変化を示す。吸光度の変化が少ないことから、反応はほぼ平衡に達していると考えられる。検出器内の試料ゾーンの吸収スペクトルは、オルトリン酸とモリブデン酸とで生成するヘテロポリブルー錯体のスペクトルと同一であった。

試料中の水酸化カリウム濃度の影響

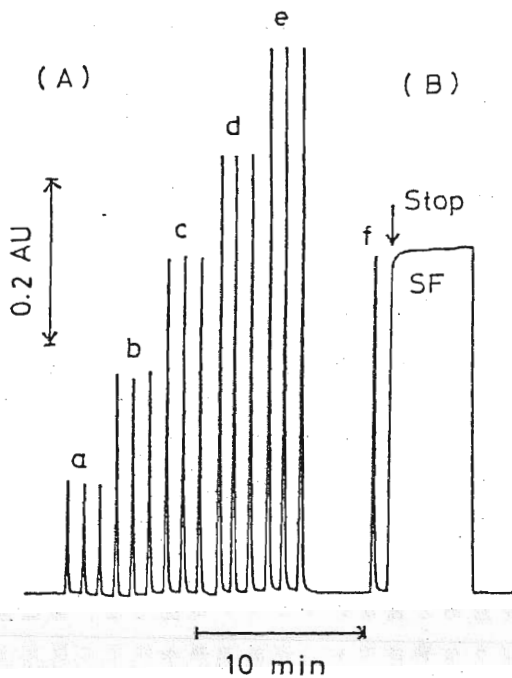


Fig. 4. FIA profiles and a stopped-flow signal for sulfite.

(A) FIA profiles for sulfite; a, 2; b, 4; c, 6; d, 8; e, $10 \times 10^{-3} \text{M}$ (NaHSO_3).

Each sample was injected in triplicate. (B) FIA profile (f) and stopped-flow signal (SF) for sulfite of $6 \times 10^{-3} \text{M}$ (NaHSO_3).

亜硫酸ガスをアルカリ溶液に吸収させて定量するケースを想定し、亜硫酸試料への水酸化カリウム添加効果を調べた。結果を Table 1 に示す。対照としてオルトリン酸試料に対

Table 1. Effect of addition of potassium hydroxide to orthophosphate or sulfite samples on the peak height.

KOH (M)	KH_2PO_4 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ (Absorbance)	NaHSO_3 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ (Absorbance)
0	0.728	0.340
1×10^{-3}	0.720	0.308
1×10^{-2}	0.717	0.326
1×10^{-1}	0.714	0.310
1	0.718	0.552

しても同様に添加して分析した。オルトリン酸については、1 M 水酸化カリウム溶液としてもほとんど検出感度は変わらない。一方、亜硫酸については、0.1 M まではほとんど影響を受けないが、1 M になると吸光度が大きくなった。この原因の一つとして、試料ゾーンの酸濃度の低下によって、ヘテロポリ酸の生成速度が増大したことが考えられる。この点については、感度上昇をもたらす別の手段となることも期待されるので詳しい検討が必要である。さしあたり試料中の水酸化カリウム濃度は0.1 M 以下に調整するのが適当であろう。

Ruzicka 等の F I A に関する最初の報文に見られる様に、F I A は、試料と試薬の混合、反応および検出を細管中で流しながら行うことにより、反応初期の時間帯（マニュアル法では測定禁止の時間帯）でも十分再現性があるデータを得ることができる、という発見によって出発している⁵⁾。それ以来、ほとんどの F I A は、確立されたマニュアル法を手本とし、その自動化の手段として用いられて来た。^{6, 7)}

これに対し、今回の試みは、マニュアル法では困難と思われる F I A の開発という点に主眼を置いている。(1) 式の反応に基づく亜硫酸の分析は、酸性加熱条件下で反応を行わせるため、開放系で反応を進める通常のマニュアル法では、亜硫酸ガス発生を抑えることは難しい。そこで、このような場合でも、高温加熱条件下に反応を進めることができる高圧型 F I A システムを用いて検討を行った。その結果、感度、直線性、再現性について良好な結果が得られ、またさらに改良される見通しを得た。なお検討すべき問題点も残されているが、新しい亜硫酸の分析法となることが期待される。

文 献

- 1) F. Wöhler : Justus Liebigs Ann. Chem., 39, 252(1841).
- 2) N. Yoza, K. Ishibashi, S. Ohashi : J. Chromatogr., 134, 497(1977).
- 3) Y. Hirai, N. Yoza, S. Ohashi : J. Chromatogr., 206, 501(1981).
- 4) Y. Hirai, N. Yoza, S. Ohashi : Anal. Chim. Acta, 115, 269(1980).
- 5) J. Růžička, E. H. Hansen : Anal. Chim. Acta, 78, 145(1975).
- 6) K. K. Stewart : Anal. Chem., 55, 931A(1983).
- 7) J. Růžička : Anal. Chem., 55, 1040A(1983).

(1984年5月31日受理)