

リン酸塩分析におけるF I Aの最適化:反応温度の影響

馬場 嘉信, 平野 尚伸, 与座 範政, 大橋 茂

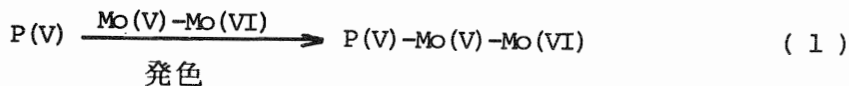
九州大学理学部化学教室

〒 8 1 2 福岡市東区箱崎 6 - 1 0 - 1

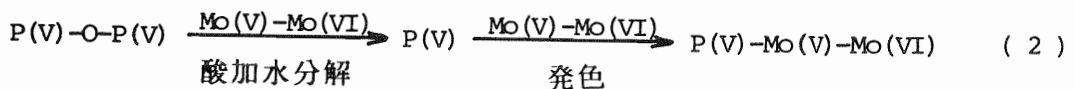
フローインジェクション分析法におけるリン酸塩分析の最適条件を決定した。滞留時間(t_r)と反応温度(T)を考察の対象とし、特に反応温度の効果について詳しく検討した。分析速度は、反応温度が上昇するに従って大きくなった。また、ポリリン酸塩の定量の場合にも反応温度が重要な役割をはたした。最も感度が高くなるのは、 $t_r = 55$ s, $T = 140$ °C(オルトリン酸), $t_r = 95$ s, $T = 140$ °C(ピロリン酸)の条件の時、分析速度はそれぞれ、112, 105 samples/hであった。

緒 言

オルトリン酸、 $P(V)$ 、は $Mo(VI)$ 試薬と反応して黄色錯体、 $P(V)-Mo(VI)$ 、を生成する。黄色錯体、黄色錯体とマラカイトグリーンの会合体、黄色錯体の $Mo(VI)$ を部分的に還元した青色錯体、 $P(V)-Mo(V)-Mo(VI)$ 、の吸光を利用したオルトリン酸のフローインジェクション分析法(F I A)が確立されている^{1,2)}。著者らは $Mo(V)-Mo(VI)$ 混合試薬を用いて、(1)式によるF I Aを開発した³⁻⁵⁾。



他方、ピロリン酸(二リン酸)、 $P(V)-O-P(V)$ 、やトリポリリン酸(三リン酸)などのポリマーは、 $Mo(VI)$ 試薬と直接には反応しないので(条件により例外はある)、(2)式のように、オルトリン酸の発色反応の前段階として加水分解の過程が必要である。



加水分解も発色も比較的遅い反応である。強酸性のMo(V)-Mo(VI)試薬を用いて、高温(140℃)・高圧(約5気圧)下で加水分解反応と発色反応を同時に達成できる”高圧(高温)フローインジェクションシステム”については既に報告した³⁻⁵⁾。

さて、FIAにおける最適条件を決定するためには、分析速度や感度に影響を及ぼす流路内での物理的過程(拡散など)と化学的過程(反応速度)についての考察が必要である。Vandersliceら^{6,7)}により基礎的な理論は確立されつつあるが、温度効果については考察されていない。上記の高温フローインジェクションシステムでは反応温度は特に重要な因子であると考えられるので、まずヨウ化カリウムや硝酸アンモニウム(紫外吸収を示す)をサンプルとして、化学反応が関与しない物理的過程を検討した。さらにオルトリン酸やピロリン酸をサンプルとして、(1)式や(2)式の化学反応過程を含む場合の温度の影響について考察した。滞留時間や反応温度を変化させた場合の分析速度や感度に及ぼす影響についてコンピューターで計算して三次元表示し、リン酸分析の最適条件を視覚的に判断できるようにした。なお、コンピューターを利用した解析法については別に報告するので¹⁷⁾、本報告では割愛した。

理 論

フローインジェクション分析法の測定条件とバンド幅の関係は、Vandersliceら^{6,7)}の研究によって以下のように表されることが知られている。

$$\Delta t_b = 4\sigma_t = \frac{35.4 a^2 f}{D \cdot 0.36} \left(\frac{L}{q} \right)^{0.64} \quad (3)$$

ここで、 Δt_b はベースラインでのバンド幅(秒単位)、 σ_t はバンドの標準偏差(秒単位)、 a はチューブの半径(cm)、 D はサンプルの拡散係数(cm^2/s)、 L はチューブの長さ(cm)、 q は流量(ml/min)、 f は補正係数である。 f の値は、チューブの内径が0.5 mmの場合は0.932、1 mmの場合は0.800である⁶⁾。

正確なFIAの測定には温度の制御が重要なことが既に報告されている⁸⁾。(3)式より明らかなように、温度の影響を最も大きく受けるのは、サンプルの拡散係数である。つまり、温度が上昇すると拡散係数が大きくなり、結果としてバンド幅が減少するのである。拡散係数は、一般的にWilke-Changの式として以下のように表される⁹⁾。

$$D = \frac{7.4 \times 10^{-8} (\psi_2 M_2)^{0.5} T}{\eta V_1^{0.6}} \quad (4)$$

ここで、 ψ_2 は溶媒の“会合因子”(水の時、2.6)、 M_2 は溶媒の分子量、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度(cP)、 V_1 はサンプル成分のモル体積である。

(4)式のパラメータの中で、溶媒の粘度は、温度が上昇すると減少する。今回の実験で、キャリアー溶液として使用した溶媒は、水と希硫酸(約7%)であるので、粘度の温度変化は、水の粘度と温度の関係式を用いて表すことにした¹⁰⁾。

$$\eta = A \exp\left(\frac{1 + BT}{CT + DT^2}\right) \quad (5)$$

ここで、 $A = 0.1257187 \times 10^{-1}$ 、 $B = -0.5806436 \times 10^{-2}$ 、 $C = 0.1130911 \times 10^{-2}$ 、 $D = -0.5723952 \times 10^{-5}$ である。

実 験

試薬と試料

試薬(片山、大阪)は、特にことわらないかぎり特級のをそのまま用いた。リン酸塩定量のためのモリブデン(V)-モリブデン(VI)混合試薬は、文献¹¹⁾に準じて調製した。

オルトリン酸標準溶液($10^{-4}M$)は、 KH_2PO_4 ($110^\circ C$, 1 h乾燥)を、またピロリン酸標準溶液($10^{-4}M$ as P)は、 $Na_4P_2O_7$ を蒸留水中に溶解して調製した。

装置

今回の実験で用いた装置は、Fig. 1に示す通りである。Fig. 1Aが、バンド幅の温度変化を調べる時に用いたもので、Fig. 1Bがリン酸の発色速度を決定するための装置である。

ポンプは、ピストン式ポンプ(Seishin, PSU-3.5W)を用い、チューブは、テフロン製で内径0.5 mmのものを用いた。Fig. 1Bでキャリアー溶液にモリブデン混合試薬を用いているのは、サンプルとのマトリックスの差をなくして低濃度領域での微分ピークの発生を防ぐためである。検出にはそれぞれ紫外(A)、可視(B)吸光光度計を用いた。

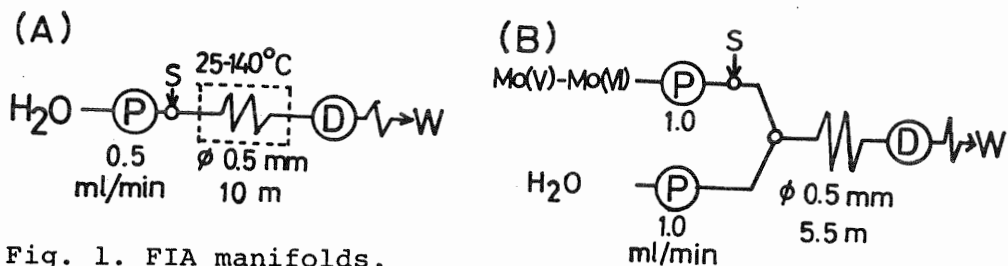


Fig. 1. FIA manifolds.

リン酸の発色速度決定

(1)式及び(2)式の発色速度をバッチ法で測定した。リン酸標準溶液 5 mlを活栓付三角フラスコに入れ、Mo(V)-Mo(VI)混合試薬を 2 ml加え、さらに蒸留水 18 mlを加え全体を 25 mlとした。この溶液を恒温槽につけ一定温度に保った(± 0.1 °C)。一定時間毎に 100 μ lとり出し、Fig. 1Bの装置に注入し 830 nmで検出した。ピーク面積よりその時のモリブドリン酸濃度を決定した。

計算

計算は、マイクロコンピュータ-PC-9801(NEC)で行った。最適条件を求めるためのプログラムは、BASIC言語で記述している。プログラムについては化学PC研究会の会報に投稿予定¹⁷⁾である。

結果および考察

フローインジェクション分析法の最適化を行う際に、反応コイルの温度は、最も重要なパラメータの一つである。温度変化は、FIAの感度、分析速度に著しく影響を与え、最適条件を左右する。

バンド幅への温度効果(化学反応をとまなわない場合)

バンド幅の測定条件による変化は、多くのグループによって活発に研究されている(6,7,12-14)。そして、その様子は解明されつつある。しかし、それらの研究はバンド幅と、チューブ内径、コイル長、流量、コイル径などとの関係であり、温度との関係について考察したものはほとんどない。

そこで、ここでは(3),(4),(5)式をもとに、バンド幅への温度効果について検討した。フローインジェクション分析法の装置は、最も簡単なシングルチャンネルのものを用いた(Fig. 1A)。キャリアー溶液として水を用い。拡散係数がよく知られており、紫外吸収をもったヨウ化カリと硝酸アンモニウムをサンプルとして用いた。記録されたバンド幅が、反応コイル中の広がりのみを反映するように、注入量を小さくし(20 μ l)、反応コイルを 10 mとした。また、三方ジョイントなどの混合用ジョイントは用いなかった。2次流れの影響がないように反応コイルのコイル径を 20 cmとした。

温度とバンド幅の関係は、Fig. 2に示している。図から明らかなように、バンド幅は温度が上昇するにつれて減少し、室温の場合と 140 °Cの場合では約 1/2になっていることがわかる。実線は、(3)式による計算値を示している。

計算値と実測値はよい一致を示しており、バンド幅と温度の関係は、計算により予測できる。

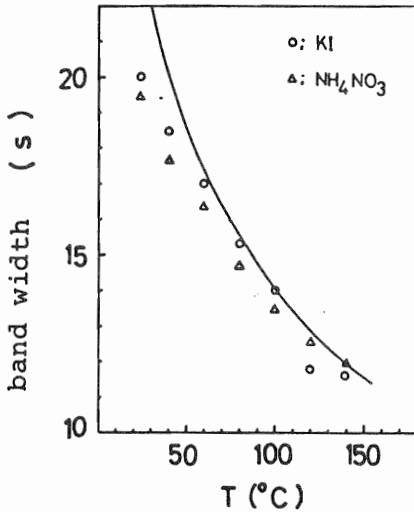


Fig. 2. Temperature dependence of band width.

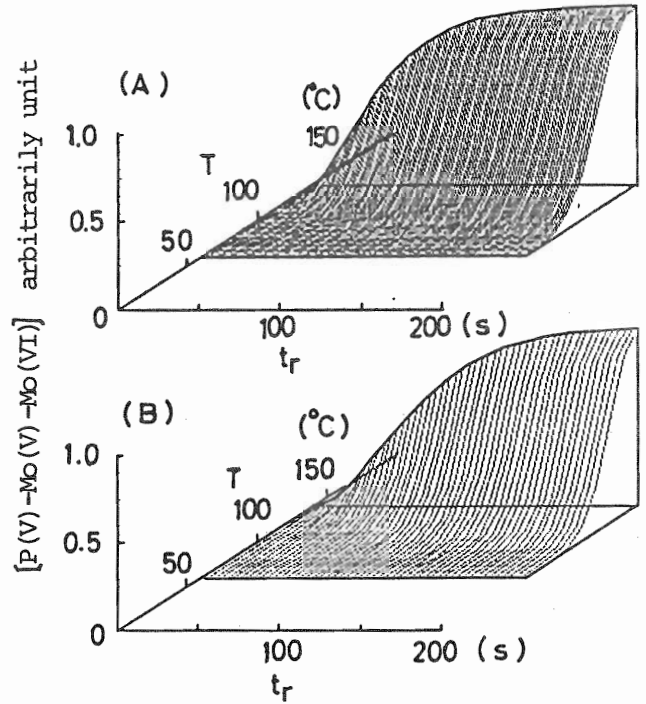


Fig. 3. Color development as a function of residence time(t_r) and temperature(T). (A); orthophosphate, (B); pyrophosphate.

反応速度への温度の影響

(1)式及び(2)式における青色錯体の生成速度の温度効果をバッチ法で検討した。温度 T と反応時間(滞留時間) t_r に対する青色錯体の生成量を三次元的にプロットした(Fig. 3, 詳細な解析法については別に報告する¹⁷⁾)。Fig. 3 Aはオルトリン酸、Fig. 3 Bはピロリン酸に対応する。反応温度を 10°C 上昇させる効果は、反応時間を2-3倍長くすることに匹敵することがわかる。またオルトリン酸の方がピロリン酸より速く発色してるので、この反応の律速段階はピロリン酸の加水分解であることを示している。

実験条件の最適化

今までのデータをもとに実験条件の最適化をおこなってみる。最適化のパラメ

ータとしては、反応温度、コイル長、チューブ内径、流量、試薬とサンプルの混合比、サンプル体積などのものがあるが、ここでは反応温度と滞留時間を変化させ最適化を行った。内径、サンプル体積、混合比は一定としたので、滞留時間は $t_r = L \pi (a/2)^2 / q = \text{const.} (L/q)$ のように表され、Lとqの比によってある一定の値をとる。

まず、 $t_r = 30 - 200 \text{ s}$ 、 $T = 30 - 140 \text{ }^\circ\text{C}$ の範囲で分析速度を計算した。L/qとDの値をt とTより求め、(3)式から σ_t を計算した。その値を用い分析速度 $S_{\text{max}} = 3600 / 6 \sigma_t$ (samples/h)を計算し、三次元的にプロットした(Fig. 4)。この時、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ でのDを $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ とした。図から明らかなように、分析速度は、 t_r が小さく、かつTが高いほど大きくなる。

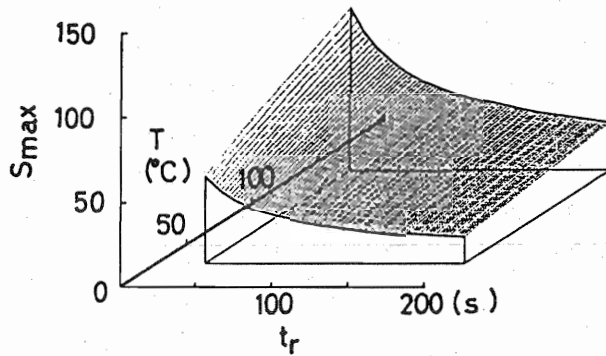


Fig. 4. Sampling rate(S_{max}) as a function of residence time (t_r) and temperature(T).

次に、感度について考えてみよう。今までみてきたように、温度が高い場合は、反応速度は速くなり、しかもバンド幅も小さくなるので感度は高くなることが期待される。一方、滞留時間が長くなると、バンド幅が広がるために感度を低下させる。しかし、反応がより進行するために感度を高める効果ははたらし、両方の効果は補償し合う。従って t_r とTを変化させて感度を計算すると、ある最適条件が決定できると予想される。

Fig. 5が t_r 、Tに対するピーク高の三次元プロットである。これは、 $140 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 160 s でのピーク高を1.0とした時の相対比をプロットしたものである(この条件は、現在当研究室で用いているリン酸のルーチン分析用FIAの測定条件である)。Fig. 5Aは、オルトリン酸に、Fig. 5Bは、ピロリン酸に対応する。

最も感度が高いのは、オルトリン酸、ピロリン酸いずれの場合も $140 \text{ }^\circ\text{C}$ の時で、滞留時間は、オルトリン酸で 50 s 、ピロリン酸で 100 s 程度の時であ

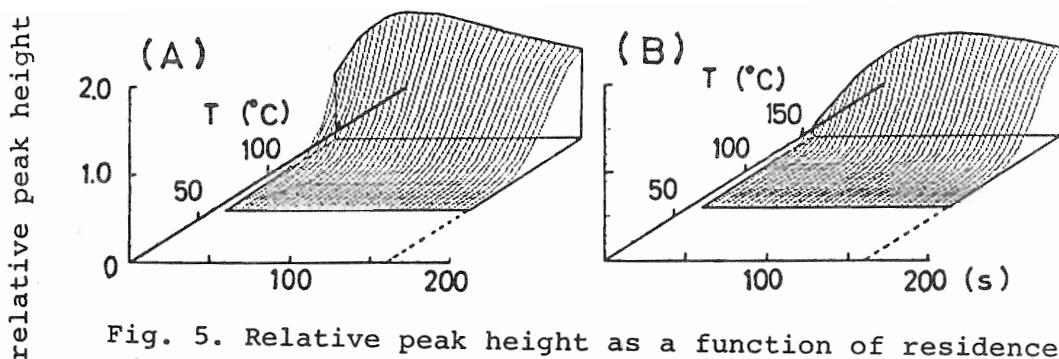


Fig. 5. Relative peak height as a function of residence time (t_r) and temperature (T). (A); orthophosphate, (B); pyrophosphate.

る。この計算値をもとに、実験により最適条件を求めると、Table 1に示すようになり、計算値と実験値はよい一致を示す。ここで、 S_{max} の実測値が大きいのは2次流れの影響である。実測値は、文献³⁻⁵⁾に従った実験により求めた。

オルトリン酸に比べてピロリン酸の滞留時間が長いのは、前に述べた通り、ピロリン酸の加水分解が律速段階のためである。このことは、ピロリン酸よりさらに重合度の大きいポリリン酸やより加水分解しにくいヌクレオチドなどを分析する場合には、より滞留時間が長くないと高い感度がえられないことを示している。

Table 1. Optimal conditions for the determination of inorganic phosphates.

		obs.				calc.			
		t_r (s)	T(°C)	S_{max}	RH ^{a)}	t_r	T	S_{max}	RH
maximum sensitivity	P ₁ ^{b)}	55	140	112	1.1	50	140	80	1.4
	P ₂ ^{c)}	95	140	105	1.1	100	140	50	1.2
color development (99%)	P ₁	160	140	90	1.0	160	140	40	1.0
	P ₂	165	140	87	1.0	180	140	38	1.0

a) RH is the relative peak height. b) P₁ is the abbreviated notation for orthophosphate. c) P₂ is the abbreviated notation for pyrophosphate.

最後に、FIAを高速液クロのポストカラム反応検出器として用いる場合について考える。この場合には、カラムから溶出されてきたそれぞれのリン酸種が、定量的に検出できるか否かが、実用上大変重要な問題である。そこで、発色反応がどの程度進行しているかを基準にして実験条件を考えると、Table 1にあるように99%以上発色している場合で、140℃、160-180s程度のところである。この条件では、重合度が10から15程度のポリリン酸でも、95%以上発色しているものと思われる。しかし、医薬品や食品添加物として利用されているより重合度の大きいポリリン酸の場合は、それらを定量的に検出するには、反応温度をより高くするか、滞留時間をより長くしなければならない。

(1984年7月 第45回分析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) 与座範政, ぶんせき, 1984, 513.
- 2) 桐栄恭二, FIA研究会会誌, 1, 2(1984).
- 3) Y. Hirai, N. Yoza and S. Ohashi, J. Chromatogr., 206, 501(1981).
- 4) 平井幸雄, 与座範政, 大橋 茂, 分析化学, 30, 465(1981).
- 5) Y. Baba, N. Yoza and S. Ohashi, J. Chromatogr., 295, 153(1984).
- 6) J.T. Vanderslice, K.K. Stewart, A.G. Rosenfeld and D.J. Higgs, Talanta, 28, 11(1981).
- 7) J.T. Vanderslice, G.R. Beecher and A.G. Rosenfeld, Anal. Chem., 56, 292(1984).
- 8) D. Betteridge, W.C. Cheng, E.L. Dagless, P. David, T.B. Goad, D.R. Deans, D.A. Newton and T.B. Pierce, Analyst(London), 108, 17(1983).
- 9) B.L. Karger, L.R. Snyder and C. Horvath, "An Introduction to Separation Science", Wiley, New York, 1973, p.78.
- 10) 日本化学会編, "化学便覧基礎編 II", (1984), (丸善).
- 11) I. Hosokawa and F. Oshima, Water Res., 7, 283(1973).

- 12) J.H.M. van der Berg, R.S. Deelder and H.G.M. Egberink, Anal. Chim. Acta, 114, 91(1980).
- 13) R. Tijssen, Anal. Chim. Acta, 114, 71(1980).
- 14) C.C. Painton and H.A. Mottola, Anal. Chim. Acta, 154, 1(1983).
- 15) C.C. Kircher and S.R. Crouch, Anal. Chem., 55, 242 (1983).
- 16) C.A. Bunton and H. Chaimovich, Inorg. Chem., 4, 1763 (1965).
- 17) 馬場嘉信, 未発表.

(1984年12月3日 受理)

OPTIMIZATION OF FLOW INJECTION ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC PHOSPHATES; EFFECT OF REACTION TEMPERATURE

Yoshinobu BABA, Hisanobu HIRANO, Norimasa YOZA and Shigeru OHASHI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812

The FIA system has been optimized for the sensitive and quantitative determination of inorganic phosphates. Two variables, residence time and reaction temperature, were taken into account. Reaction temperature was found to play an important role in improving the sensitivity and quantitation. At the maximum sensitivity the sampling rates were 112 samples/h for orthophosphate and 105 samples/h for pyrophosphate, respectively.