

水溶性高感度有機試薬と F I A

中川 元吉・和田 弘子

名古屋工業大学 応用化学科
〒466 名古屋市昭和区御器所町

Highly Sensitive Chromogenic Reagents for the use in FIA

Genkichi NAKAGAWA and Hiroko WADA
Laboratory of Analytical Chemistry
Nagoya Institute of Technology
Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466

F I Aの検出法には種々の方法が用いられているが、吸光光度法は最も簡単に適用範囲も広い。従って、従来吸光光度法として一般に利用されてきた定量法の多くが、多少条件を変えてフローインジェクション分析 (F I A) に応用されている。例えば、 α -フェナントロリンを用いる鉄の定量¹⁾、 α -クレゾールフタレインコンプレクソンを用いるカルシウムの定量²⁾、ランタン-アリザリンコンプレクソン (La-ALC) を用いるフッ化物イオンの定量³⁾などがある。

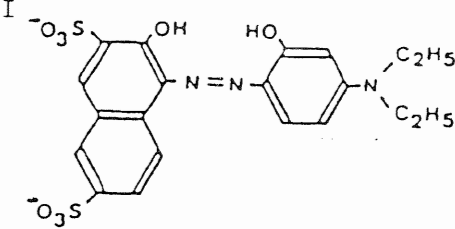
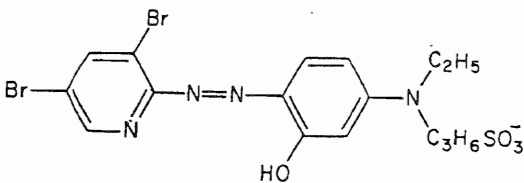
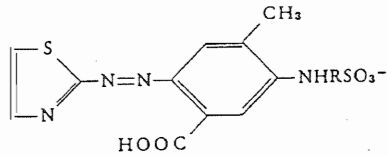
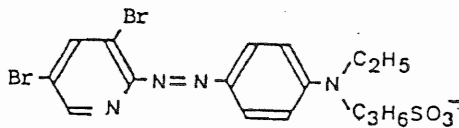
F I A法が従来のバッチ法に比べて優れている点として、自動的に、短時間に多数の検体を分析することができること以外に、(1) 反応時間、反応温度などの制御が容易である、(2) 外部からの汚染が少ない、(3) 高い試薬ブランクを持つ試薬や比較的不安定な試薬も用いることができる、(4) 試薬の消費量が少ない、(5) 目的成分の分離や濃縮および妨害イオンの除去をシステム内で行うこともできる、などがあげられることはいうまでもない。このようなF I A法の特徴をうまく利用するうえで、単に従来用いられてきた発色試薬を適用するだけでなく、F I A法に適した有機試薬の開発が望まれる。

F I A法に適した有機試薬を設計する場合に、その望ましい性質として次のようなことが考えられる。(a) 試薬と錯体の水溶性、(b) 高感度、(c) 高選択性、

(d) 反応速度が大きい。F I A法では溶媒抽出などをシステム内で行う方法もあるが、ポンプチューブの材質など問題もあり水溶液を用いる方が簡単である。また、上のF I Aの特長としてあげてあるようにシステム内に樹脂カラムなどを組入れて、他のイオンの妨害を除くこともできるが、装置が複雑になるのでなるべくさげたい。そのためは、用いる有機試薬は高選択性であることが望まれるが、種々のマスキング剤との組み合わせによりシステム内で妨害イオンをマスクすることにより選択性を向上させることもできる。さらに、F I A法ではよほど速い反応でない限りバッチ法のように平衡に達した後での吸光度測定はまれであるから、反応速度が大きい方が感度が高くなる。

以下では、我々の研究室で合成した水溶性高感度有機試薬を中心に、その2、3の金属イオンのF I A法への応用について述べる。

TABLE 1. Highly sensitive chromogenic reagents synthesized

		λ_{\max} (nm)	ϵ ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	
I		Mg	560	47000
		Ca	550	39000
(DPR)				
II		Fe(II)	568	88000
			748	39000
(3,5-diBr-PAESPAP)				
III		Cu(II)	586	50000
			602	55000
			610	58000
	R = CH ₂ (TAM SMB)			
	R = C ₂ H ₄ (TAM SEB)			
	R = C ₃ H ₆ (TAM SPB)			
IV		Cu(II)	638	124000
		Ag	590	80000
(in 0.1% SDS)				
(3,5-diBr-PAESA)				

1) 水溶性高感度試薬の合成

アゾ系試薬では、アゾのp-位にジアルキルアミノ基を導入することによって非常に感度を向上させることができる。また、このN-アルキル基の末端にスルホン基を導入すると、その試薬の高感度性を保ったまま、水溶性が高められる。この高感度性と水溶性をかね備えた多数の試薬を合成してきたが、Table 1 に示すものが、合成、精製ともに簡単で、FIA法に対して優れた性質を有していると思われる。

これらの試薬のFIA法への応用例について述べる。

2) カルシウムとマグネシウムの定量

o,o'-ジヒドロキシアゾ化合物は、古くからカルシウムやマグネシウムの比色試薬として、あるいはキレート滴定の指示薬として用いられてきた。しかし、それらの多くは、感度があまり高くなく、またアルカリ性で不安定である。合成したDPRは従来の試薬の2倍以上の高感度で、非常に安定であるが、カルシウムやマグネシウムキレートの λ_{max} で試薬自身の吸収が大きいことや、吸光度のpH依存性が大きいなどの点で従来のバッチ法に使用するには問題がある。FIA法ではこれらの欠点は殆ど問題にならない。

用いたマニホールドを、Fig. 1 に示す⁴⁾。

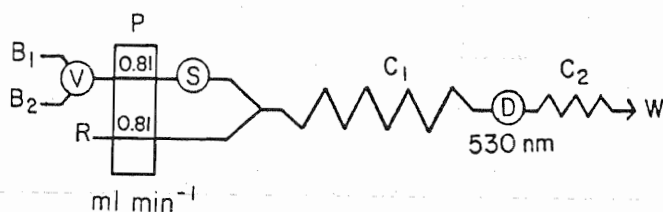


Fig. 1. Flow diagram: P, peristaltic pump with indication of flow rate(ml min^{-1}); S, sample injector with loop($40\mu\text{l}$); V, three-way valve for buffer solution(B_1 and B_2); C_1 , mixing coil(0.5mm i.d. , 300cm long); C_2 , back-pressure coil(0.25mm i.d. , 50cm long); D, spectrophotometer equipped with flow cell(volume $20\mu\text{l}$, light path 10mm); R, color-forming reagent($5 \times 10^{-5}\text{M}$); B_1 , ammonia-ammonium chloride buffer(0.1M , $\text{pH}10.5$)containing DMP(10^{-2}M) and TEA(10^{-2}M); B_2 , ammonia-ammonium chloride buffer(0.1M , $\text{pH}10.5$) containing DMP(10^{-2}M), TEA(10^{-2}M), Ba(II)($1.04 \times 10^{-3}\text{M}$) and EGTA($1.00 \times 10^{-3}\text{M}$).

DPRはpH 10 (アンモニア-塩化アンモニウム緩衝液)でカルシウム及びマグネシウムと錯体を生成し赤紫色を呈する。従って、Fig. 1 に示すように、 B_1 緩衝液を流して、カルシウムとマグネシウムの含量に対するピークを測定する。

一方、カルシウムはEGTAキレートの生成定数 ($K_{\text{CaY}} = 10^{11.0}$) がマグネシウム-EGTAキレート ($K_{\text{MgY}} = 10^{5.2}$) に比べて非常に大きい。従って、EGTAに小

過剰のバリウムイオンを加えた配位子緩衝液 (B₂) をキャリアとして流すことによって、カルシウムを選択的にマスクして、マグネシウムのみのピークを測定することができる。ストロンチウムとバリウムのEGTA錯体の生成定数はそれぞれ $K_{SrY} = 10^{8.5}$ 、 $K_{BaY} = 10^{8.4}$ であるが、ストロンチウムはDPRと多少呈色するので、バリウムを用いる方が良い。

Fig. 2 に標準溶液によるチャートを示す。

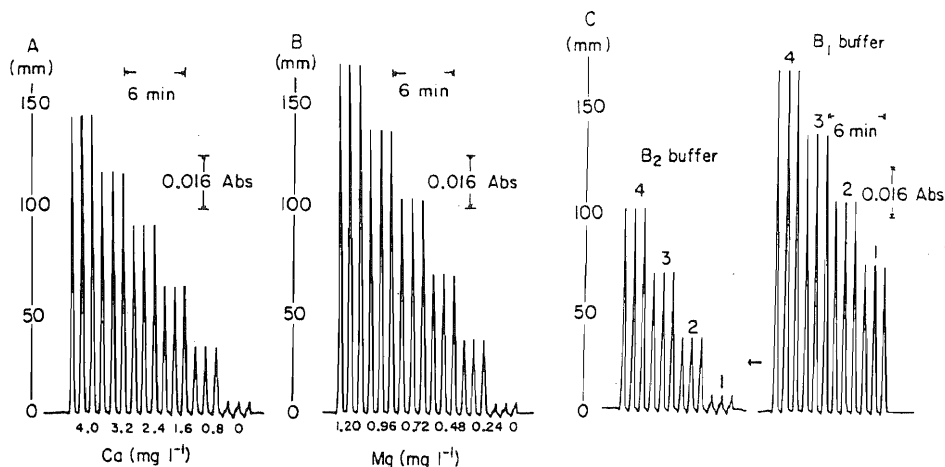


Fig. 2. (A) Calibration output for calcium. (B) Calibration output for magnesium. (C) Determination of calcium and magnesium in synthetic samples in buffer B₁ and B₂: (1) 2.0ppm Ca only; (2) 2.0ppm Ca + 0.24ppm Mg; (3) 2.0ppm Ca + 0.48ppm Mg; (4) 2.0ppm Ca + 0.72ppm Mg.

マスク剤として、2, 3-ジメルカプト-1-プロパノール (DMP)、トリエタノールアミン (TEA) を用いることによって、鉄 (III) 1.5 ppm、アルミニウム 2.5 ppm、銅 (II) 30 ppm、亜鉛 70 ppm、カドミウム 110 ppm、マンガン (II) 1.0 ppm まで共存しても妨害しない。

TABLE 2
Determination of Mg and Ca in potable waters and in a serum (all results are given as mg l⁻¹)

	F.i.a. ^a		A.a.s.		EDTA titration	
	Mg	Ca	Mg	Ca	Mg	Ca
Tap water 1	0.75	5.62	0.70	5.66	0.7	5.9
2	0.66	5.24	0.67	5.21	0.7	5.3
3	0.93	5.25	0.87	5.36	0.9	5.6
4	0.75	5.62	0.70	5.51	0.7	5.6
Serum ^b	19	92	—	—	—	—

^aProposed method. ^bCertified values are 21 ± 3 and 91 ± 5, respectively.

水道水及び血清中のカルシウムとマグネシウムの定量結果をTable 2 に示した。水道水は 2-4 倍、血清は 50 倍に希釈して注入した。

さらに、Fig. 3 に示すように、FIA のシステム内にキレート樹脂のマイクロカラムを組込むことにより、塩濃度が極めて高くカルシウムとマグネシウムの量が ppb オーダーの試料の分析も可能になる⁵⁾。Fig. 3 の装置は、2つのペリスタ型ポンプを装備しているTECATOR FIA 5020 を用いている。分析の標準的な操作をTable 3 に示す。

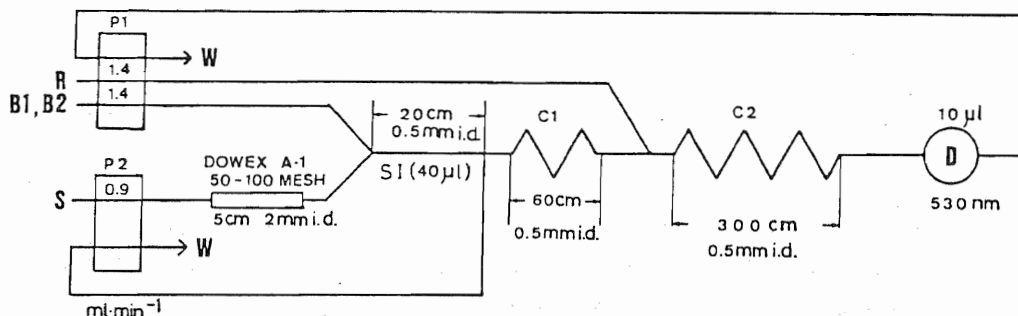


Fig. 3 Flow diagram

P1,P2:peristaltic pump; C1:mixing coil; C2:reaction coil; D:spectrophotometer; S:sample containing ammonia-ammonium chloride buffer ($5 \times 10^{-2} \text{ M}$, pH 10.5); SI:sample injection; B1:ammonia-ammonium chloride buffer (1M, pH 10.5); B2:ammonia-ammonium chloride buffer (1M, pH 10.5) containing Ba(II) ($1.04 \times 10^{-3} \text{ M}$) and EGTA ($1.00 \times 10^{-3} \text{ M}$); R:DPR ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$); W:waste

TABLE 3 Scheme

	Pump 1	Pump 2
1N HCl 1.8ml (2min)---Conditioning	STOP	RUN
H ₂ O 2.7ml (3min)	STOP	RUN
Sample 9.0ml (10min)--Adsorption	STOP	RUN
H ₂ O 4.5ml (5min)---Washing	STOP	RUN
0.1N HCl 1.8ml (2min)---Elution	STOP	RUN
B1 or B2 and Reagent*	RUN	STOP
0.1N HCl 0.1ml (7sec)---Injection	STOP	RUN
B1 or B2 and Reagent	RUN	STOP

*Until a steady baseline is obtained.

特級 NaCl、J I S 標準 NaCl、特級 KCl 中のカルシウムとマグネシウムを定量した結果をTable 4 に示す。この方法は、電解用食塩水中のカルシウムとマグネシウムの濃度管理に応用できるものと思われる。

TABLE 4. Determination of Ca and Mg in salts

Chemical	Ca($\mu\text{g/g}$)	Mg($\mu\text{g/g}$)
A.R.G. NaCl	2.2(2.5)	1.2(1.4)
Std. NaCl	0.15	<0.004
A.R.G. KCl	3.39(3.6)	0.05

() The results by a.a.s.

3) 全鉄の定量⁶⁾

鉄(II)-3,5-diBr-PAESPAP キレートは PAN や TAN などと同様、568 nm と 748 nm に 2 つの λ_{max} を持っている。748 nm の吸収は 568 nm より感度が低い、二価鉄キレートに特有な吸収で、この波長では他の金属との錯体は吸収を示さない。還元剤の存在下では鉄(II)-diBr-PAESPAP 錯体が生成し、pH 5 - 9.5 で最大一定の吸光度を示す。その反応速度は pH が高い程大きいので、FIA 法では pH 9 で行われている。用いたマニホールドを Fig. 4 に示す。

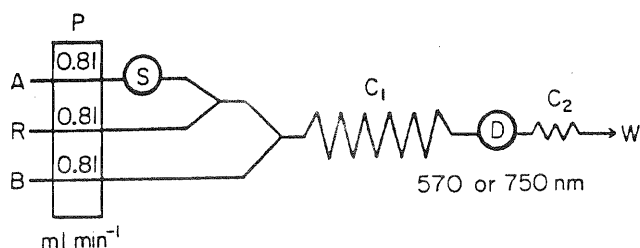


Fig. 4. Flow diagram: P, peristaltic pump with flow rates (ml min^{-1}); S, sample injector with loop(200 μl); C_1 , mixing coil(200cm); C_2 , back-pressure coil(20cm); D, flow-through cell(volume 8 μl , light path 10mm); A, ascorbic acid solution(0.1%,W/V); R, 10^{-4} M 3,5-diBr-PAESPAP solution; B, buffer solution(1 M $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$)

200 ppb の鉄を定量する場合、鉄と同量の銅(II)、コバルト(II)、ニッケル、マンガン(II)やカドミウムは妨害しない。亜鉛-3,5-PAESPAP キレートは 750 nm に吸収を持たないが、FIA 法のピークを高める。共存亜鉛 $1.2 - 8 \times 10^{-5}$ M の範囲ではピーク高が一定になるから、水試料等で微量の亜鉛を含む場合には、あらかじめ試料に 2×10^{-5} M になるように亜鉛を添加しておけばよい。もっともこの亜鉛の増感効果は、バッチ法では見られない。

Fig.5 にチャートを、 Table 5 に水道水中の鉄の定量結果を示す。

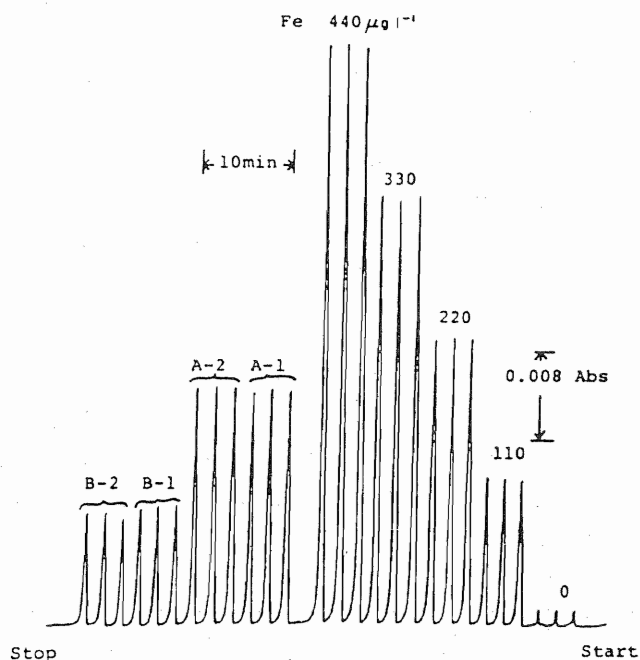


Fig. 5. Calibration graph and the determination of iron in potable water. All standards and samples are injected three times each. A-1,2: tap water(Daido Inst. Technol.) B-1,2: tap water(Nagoya city).

TABLE 5
Comparison of procedures for the determination of iron in tap waters

	Iron content ($\mu\text{g l}^{-1}$)	
	Water A (Daido Inst. Technol.)	Water B (Nagoya)
Flow-injection method ^a	89	43
Batch method ^a	90	44
TPTZ batch method	89	44

^a With 3,5-diBr-PAESPAP

4) 銅の定量

(A) Table 1 に示した試薬III とその銅キレートは水に極めてよく溶解し、またカップリング成分が安息香酸であるために、TAN や TAR に比べて反応する金属イオンが銅(II)、コバルト(III)、ニッケル、鉄(II)、パラジウムと少なく、選択性が大きい。この試薬は、コバルトの比色試薬⁷⁾として、あるいはニッケルのキレート滴定の指示薬⁸⁾

としても優れているが、銅(II)のFIA法の発色試薬に用いて、好結果を得ている^{9,10)}。TAMSPB を用いた場合のフローシステムをFig.6 に、チャートの一例をFig.7 に示す¹⁰⁾。

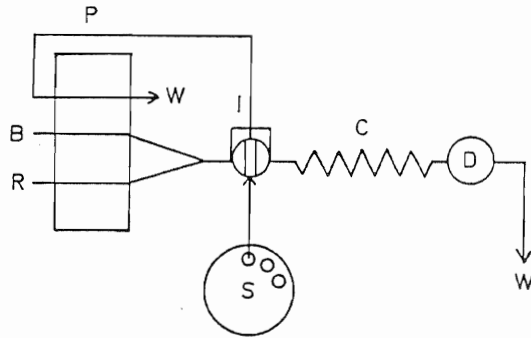


Fig. 6. Flow diagram employed with FICS analyzer. (S)Autosampler;(I)rotary sample injector;(P)peristaltic pump;(R) 1.1×10^{-5} MTAMSPB solution, flow rate:1.3ml/min;(B)0.05M acetate buffer (pH 5 - 5.5), flow rate:1.3ml/min;(C)mixing and reaction coil(1 mmi.d.,55 - 115cm length);(D)spectrophotometer with 600nm filter;(W)waste.

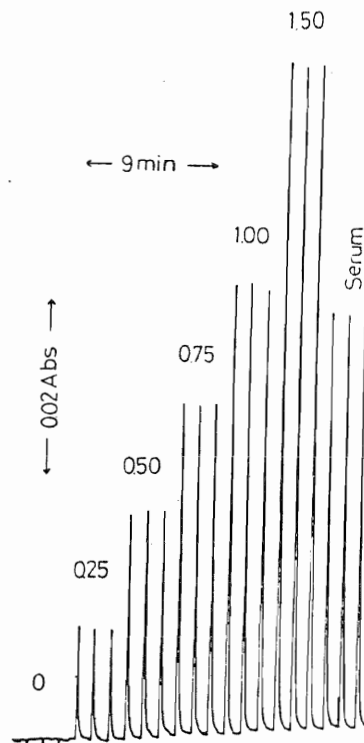


Fig. 7. Chart obtained with copper standards and serum

ここでは、装置として電気化学計器のFICS 10 を用いているが、コイルの長さやサンプル容積を適当に変えることにより 25ppb - 25ppm の銅(II)を定量することができる。

(B) 銅(II) は上で述べてきたような三座配位子の試薬とは、一般に 1:1 錯体を生成し易い。一方、アゾ系試薬のように試薬の吸収帯を利用する場合には感度は金属に配位している試薬の数にかなり正確に比例する¹¹⁾。従って、感度を向上させるためには、配位する試薬の数を増加させるのも一つの方法である。

銅(II) は種々のN, N配位の試薬とは、比較的安定な錯体を生成するので、ヘテロ環アゾ化合物のフェノールや安息香酸のOH基やCOOH基を除いた二座配位の試薬を合成した¹²⁾。このような試薬も、水溶液中では、主として 1:1 (ML) 錯体を生成するが、そこへ、陰イオン性界面活性剤あるいは非イオン性界面活性剤を共存させると、1:2 (ML₂) キレートを生ずるようになり、感度は著しく向上する。界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いると、感度は高く、界面活性剤濃度の影響も小さい。この反応は吸光度の温度依存性が大きいが、温度制御の簡単なFIA法に適用できる。Fig. 8 にマニホールドを示す。血清を10倍に希釈して注入した結果をFig.9 に示す。サンプルの塩濃度が0.3 M以下ならば、試薬とキャリアの塩濃度をマッチさせることによりピークに影響はないが、これ以上高濃度になるとSDSが沈殿し始める。

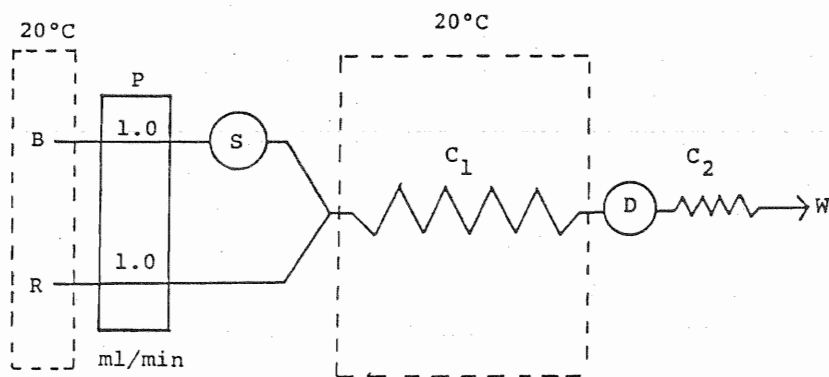


Fig. 8. Flow diagram: P, peristaltic pump; S, sample injector (60 μ l); C₁, mixing coil (200cm, 0.5mm i.d.); C₂, back-pressure coil (50cm, 0.25mm i.d.); D, spectrophotometer (640nm); B, acetic acid-sodium acetate (0.1M, pH4.5); R, 3,5-diBr-PAESA solution (4×10^{-5} M) containing acetic acid-sodium acetate buffer (0.1M, pH4.5) and 0.4% SDS.

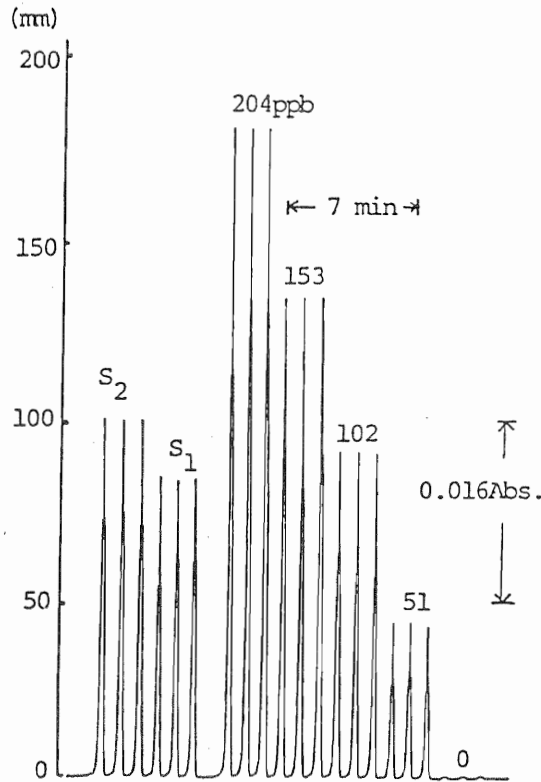


Fig. 9. Calibration graph and the determination of copper in serum. All standards and samples are injected three times each. S_1 : Normal Control Serum, S_2 : Control Serum I.

4) フッ化物イオンの定量

最後に、従来の定量法をFIAに応用した例として、La-ALC（アルフッソ）を発色試薬とするフッ素の定量について述べる³⁾。La-ALC法は、La-ALCとフッ化物イオンの反応が遅く、一検体の定量にかなりの時間を要する。また、発色試薬及び生成物が不安定であるため放置時間を厳密に一定にしなければならない。このような方法でもFIAで行うと、迅速で再現性の良い結果が得られる。この方法のマニホールドをFig.10に、チャートを示す。妨害イオンの許容量は従来法とはほぼ同じで、アルミニウムは0.1 ppmである。

以上、2、3のFIA法に適した試薬とその応用について述べた。FIA法では従来のバッチ法ではうまく使えない試薬が十分使用できる場合があることを重ねて強調したい。ここではふれなかったが、HPLC用カラムを用いると、種々の金属の同時流れ分析も可能である¹³⁾。

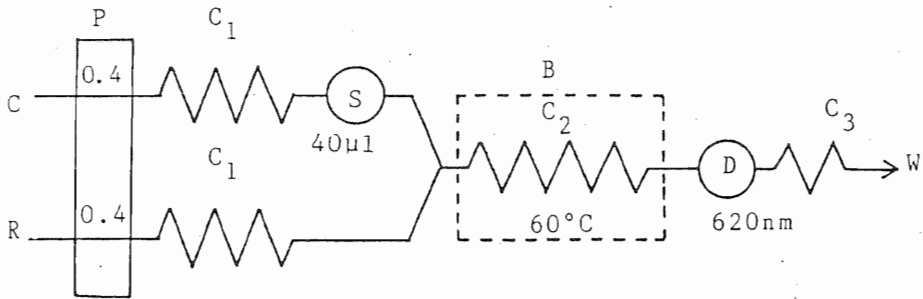


Fig. 10. Manifold for fluoride determination: P, pump with flow rate in ml min^{-1} ; S, sample injector; C_1 , damping coils (1 mm i.d., 500cm); C_2 , reaction coil (0.5mm i.d., 500cm); B, water bath; D, spectrophotometer; C_3 , back-pressure coil (0.25mm i.d., 100cm); W, waste; C, water; R, 2.5×10^{-4} M Alfosone solution in 70% acetone.

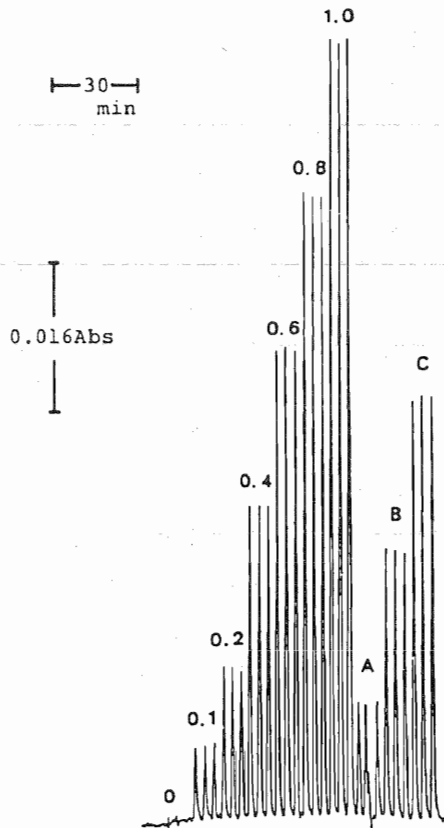


Fig. 11. Responses obtained with fluoride standards and tap water: Numbers on the peaks correspond to ppm fluoride. (A) Sample; (B) sample + 0.2 ppm fluoride; (C) sample + 0.4 mg l^{-1} fluoride.

文献

1. T. P. Lynch, N. J. Kernoghan, J. N. Wilson, *Analyst*, 109(1984)843; J. Mortatti, F. J. Krug, L. C. R. Pessenda, E. A. G. Zagatto, S. S. Jørgensen, *ibid.* 107(1982)659; R. A. Leach, J. Růžička, J. M. Harris, *Anal. Chem.*, 55(1983)1669; B.P. Bubnis, M. R. Straka, G. E. Pacey, *Talanta*, 30(1983)841.
2. H. Kagenow, A. Jensen, *Anal. Chim. Acta*, 145(1983)125.
3. H. Wada, H. Mori, G. Nakagawa, *Anal. Chim. Acta*, in press.
4. H. Wada, G. Nakagawa, K. Ohshita, *ibid.*, 159(1984)289.
5. 和田弘子, 朝倉啓介, 中川元吉, 第2回フローインジェクション分析講演会, 1984年11月(大阪).
6. H. Wada, G. Nakagawa, K. Ohshita, *Anal. Chim. Acta*, 153(1983)199.
7. H. Wada, T. Ishizuki, G. Nakagawa, *ibid.*, 135(1982)333.
8. H. Wada, T. Ishizuki, G. Nakagawa, *Bunseki Kagaku*, 12(1983)E225.
9. 立花賢治, 今村寿明, 齊藤幹彦, 喜納兼勇, *分析化学*, 32(1983)776.
10. H. Wada, T. Ishizuki, G. Nakagawa, *Mikrochim. Acta*, 1983 III, 235.
11. 和田弘子, 中川元吉, *日化*, 83(1962)1190.
12. K. Ohshita, H. Wada, G. Nakagawa, *Anal. Chim. Acta*, 投稿中
13. H. Wada, S. Nezu, T. Ozawa, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, 295(1984)413. 和田弘子, 根津伸治, 中川元吉, *分析化学*, 32(1983)600.

Abstract

Design and synthesis of new chromogenic reagents for the use in flow-injection analysis, and their application to the determination of calcium and magnesium, iron and copper in water samples and sera are described. The flow-injection analysis of fluoride ion with La-Alizarin complexone is also presented.