

An extraction-spectrophotometric method for the determination of cobalt(II) using 2-hydroxy-1-naphthaldoxime(HNA) was studied. Cobalt(II) reacts with HNA to form a water insoluble complex in aqueous solution in the pH range of 8.3~9.2, which can be extracted quantitatively into ethylacetate and has an absorption maximum at 387 nm. The cobalt complex in ethylacetate was stable and showed molar absorption coefficient of  $1.17 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Under the optimum conditions, the colored system obeyed Beer's law over the range of 0~50  $\mu\text{g}$  of cobalt(II) in 10 ml of ethylacetate. The sensitivity was  $5.1 \times 10^{-3} \mu\text{g Co(II)}/\text{cm}^2$  for 0.001 absorbance, and the coefficient of variation was 0.93% in six determinations. The recommended procedure is as follows: take an aliquot of sample solution containing up to 50  $\mu\text{g}$  of cobalt(II) to a 50 ml separatory funnel. Add 10 ml of borax buffer solution (pH 8.8), and dilute with water to about 30 ml. Then add 10 ml of 0.01 M HNA ethylacetate solution and shake vigorously for 10 min. Filter the organic phase through a dry filter paper and measure the absorbance at 387 nm against reagent blank. Copper(II), iron(III), and nickel(II) seriously interfere with the determination of cobalt(II).

(Received July 6, 1983)

### Keyword phrases

spectrophotometry of cobalt(II) with 2-hydroxy-1-naphthaldoxime; solvent extraction of cobalt(II).

## モリブデン酸によるローダミン 6 G の 消蛍光を利用するリンの連続流れ定量法

本水 昌二<sup>Ⓢ</sup>, 三笠 博司,

大島 光子, 桐栄 恭二\*

(1983 年 9 月 16 日受理)

### 1 緒 言

近年陸水, 海水の窒素, リンによる富栄養化が進行し, 様々な被害も生じている. 1982 年 12 月には湖沼の窒素及びリンに係る環境基準が告示された. これによると自然環境保全の観点からはリンは 5 ppb 以下が望ましいとされている. リンの吸光光度定量法には酸性溶液中でオルトリン酸塩とモリブデン酸とが反応して生じるヘテロポリ酸あるいはこの還元生成物のヘテロポリブルー

がもっぱら利用されてきた. 又, 最近では迅速化, 高感度化及び簡易化を目指して, ヘテロポリ酸生成を利用する連続流れ定量法も多数開発されている<sup>1)~12)</sup>. 著者らも酸性溶液中でのヘテロポリ酸とマラカイトグリーンによる発色を利用するリンの連続流れ定量法を既に報告した<sup>13)</sup>. しかし著者らの報告も含めて現在までに報告されている定量法は定量範囲が広い反面, 自然環境保全上好ましいとされている 5 ppb 以下のリンの定量は不可能であった. 本研究は, 陽イオン染料とヘテロポリ酸との相互作用の研究の過程で新たに見いだされたローダミン 6 G の消蛍光を利用する極微量リンの定量法について検討したものであり, 低濃度領域におけるリンの定量を目的としている.

## 2 実 験

### 2.1 装 置

連続流れ分析装置の流路系を Fig. 1 に示す. ポンプはサマキ工業製ダブルプランジャー型を用い, 両ポンプによる送液は流速 0.98 ml/min で行った. 反応チューブは内径 1 mm, 長さ 20 cm のテフロン製チューブを用いた. 蛍光検出には 18  $\mu\text{l}$  フローセル付き日立 650-10 形分光光度計を用いた.

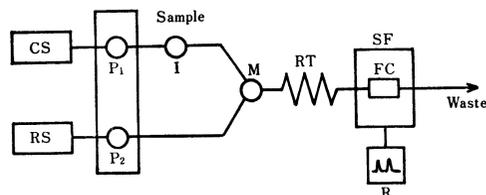


Fig. 1 Schematic diagram of flow system

CS: Carrier solution (distilled water), RS: Reagent solution (molybdate and Rhodamine 6G hydrochloric acid solution), P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub>: Pump (flow rate 0.98 ml/min), I: Sample injection valve (160  $\mu\text{l}$ ), M: Mixing joint, RT: Reaction tubing (1 mm i.d.  $\times$  20 cm Teflon tubing), SF: Spectrofluorophotometer (Hitachi 650-10), FC: Flow cell (18  $\mu\text{l}$ ), R: Recorder

### 2.2 試 薬

反応試薬液: 諸条件を検討の結果, 次のように調製した. ローダミン 6 G 水溶液 (0.05 g/100 ml) 5 ml, モリブデン酸アンモニウム水溶液 (32 g/l) 100 ml を水 355 ml と混合し, 更に濃塩酸 40 ml を加えて 1 時間放置後, 0.45  $\mu\text{m}$  メンブランフィルターでろ過して用いる. 500 ml 中のローダミン 6 G 濃度は  $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ , モリブデン濃度は 0.035 M となる.

リン標準液: 市販特級リン酸二水素カリウムを減圧下 (5 mmHg) 50  $^{\circ}\text{C}$  で恒量になるまで乾燥し, 正確にひ

\* 岡山大学理学部: 700 岡山県岡山市津島中 3-1-1

よう量して水に溶解し  $10^{-2}$  M とする。使用前に適宜正確に希釈して用いた。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 励起, 蛍光波長

本法はローダミン 6 G の消蛍光を利用するため, 蛍光強度がフルスケールの約 90% 程度となるように, 励起波長, 蛍光波長, スリット幅, 感度を調整した。本法で用いた蛍光測定装置の使用条件の一例を示すと, 励起波長 350 nm (スリット幅 10 nm), 蛍光波長 580 nm (スリット幅 10 nm) を用いた。

#### 3.2 試薬濃度

試薬溶液中の塩酸濃度を (0.5~1.7) M の範囲で検討したところ, 約 0.9 M まではピーク高さは最高一定であるが, これ以上の高濃度では急激にピーク高さは低下する。以後の実験では 0.8 M を使用した。

試薬溶液中のモリブデン酸塩の濃度の影響について, (0.05~0.11) M の範囲で検討した。その結果を Fig. 2 に示す。モリブデン酸塩の濃度を増すと定量感度は増大するが定量範囲が狭くなるので, リン (P) 量 45 ppb 程度まで定量可能なように, 0.005 M モリブデン酸塩 (モリブデンとしては 0.035 M) を使用することとした。

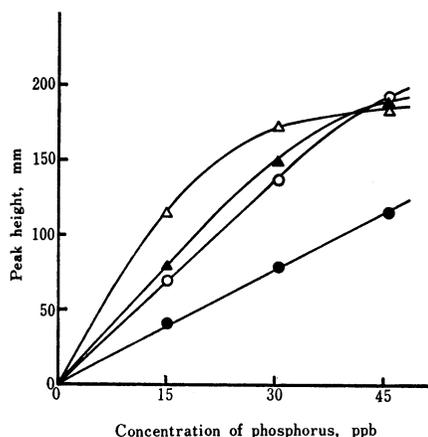


Fig. 2 Effect of molybdenum concentration  
Mo: ● 0.026 M, ○ 0.035 M, ▲ 0.044 M, △ 0.053 M

又ローダミン 6 G の濃度を  $(0.5\sim 1.5) \times 10^{-6}$  M の範囲で変えて検討した。ローダミン 6 G の濃度を減少すると感度は増大するが, 定量範囲は狭くなる。本法では  $1 \times 10^{-6}$  M を用いることとした。

#### 3.3 試料の酸濃度

試料中のリンの微生物による消失を防ぎ, 又ポリリン酸を加水分解するために, 試料水を酸性に保っておく必要がある。そこで試料に加える硫酸濃度の影響について検討したところ, 0.05 M 程度までは妨害とはならないことが分かったので, 試料採水時硫酸を加えて 0.05 M 溶液とした。

#### 3.4 反応チューブ長さ及び流速の影響

反応チューブ長さを (10~100) cm の範囲で変えて検討した。長くなるに従って拡散が大きくなりピーク幅が増大するので, 分析速度を考慮して 20 cm (内径 1 mm) を使用した。又流速を (0.5~0.98) ml/min まで変えて検討したところ, ピーク高さはほとんど変わらなかったため, 分析速度を考慮して 0.98 ml/min を用いることとした。これらの条件下では 1 時間当たり 20 試料の分析が可能であった。

#### 3.5 検量線

本法で用いた条件下ではリン (P) 0~45 ppb の範囲で検量線は良好な直線性を示し, ピーク高さ 1 mm は 0.35 ppb のリン (P) 量に相当した。Fig. 3 に検量線用シグナルの一例を示す。リン (P) 35 ppb を含む試

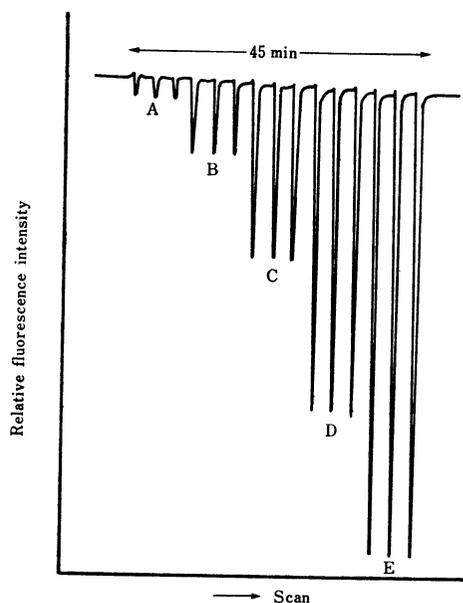


Fig. 3 Flow signals for phosphorus  
Phosphorus: A 0, B 6.2 ppb, C 15.5 ppb, D 31 ppb, E 46.5 ppb; Sample volume: 160  $\mu$ l

料を 10 回繰り返し注入したときの相対標準偏差は 0.95 % であった。

### 3.6 共存イオンの影響

河川水、海水中に普通含まれていると思われるイオンの影響について調べた結果を Table 1 に示す。ほとんどのイオンは妨害しないがヒ素(V) は  $10^{-7}$  M 共存しても正の誤差となった。しかしチオ硫酸ナトリウムをあらかじめ加えておけばヒ素(V) の共存は  $10^{-6}$  M 程度まで許容できる。

Table 1 Effect of diverse ions

Ion	Tolerable concentration (M)
Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	0.5
Ca <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10 <sup>-2</sup>
Mg <sup>2+</sup>	5 × 10 <sup>-3</sup>
K <sup>+</sup> , Al <sup>3+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10 <sup>-3</sup>
Cr <sup>3+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , SiO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , VO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10 <sup>-4</sup>
Fe <sup>2+</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup>	10 <sup>-5</sup>
As(V)†, W(VI)	10 <sup>-6</sup>
As(V)	10 <sup>-7</sup>

Phosphorus: 46.5 ppb; † Sodium thiosulfate was added to be 10<sup>-4</sup> M.

### 3.7 実試料への応用

Table 1 から分かるように本法の特徴の一つは塩化ナトリウムが 0.5 M 共存しても妨害とならないことである。これは海水にそのまま応用できることを示唆しており、Table 2 に実際に海水中のリンを定量した結果を示す。本法により得た結果はマラカイトグリーンを用いる抽出-吸光度法<sup>14)</sup>の結果とよく一致している。

Table 2 Determinations of phosphorus in sea waters

Sea water sample†	Phosphorus (ppb)	
	Present method††	Malachite green method†††
Ushimado	24.4 ± 0.1	23.8 ± 0.3
Hoden	36.5 ± 0.1	35.2 ± 0.3

† These were sampled in Okayama Prefecture on July 14, 1983, and were acidified to 0.05 M with sulfuric acid. Before injection, the samples were heated at 95 °C for 30 min in order to decompose the condensed phosphate. †† Mean of three determinations. ††† Obtained by the solvent extraction-spectrophotometry with molybdate and malachite green (ref. 14).

## 4 結 語

リンの高感度、迅速分析法としてモリブドリン酸によるローダミン 6 G の消蛍光を利用する連続流れ定量法を検討した。本法は消光を利用するため定量範囲が狭いと

いう欠点があるが、非常に高感度な定量法であり、又海水への応用も可能である。

## 文 献

- 1) H. V. Belle: *Anal. Biochem.*, **33**, 132 (1970).
- 2) J. Růžička, E. H. Hansen: *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145 (1975).
- 3) J. Růžička, J. W. B. Stewart: *Anal. Chim. Acta*, **79**, 79 (1975).
- 4) J. W. B. Stewart, J. Růžička: *Anal. Chim. Acta*, **82**, 137 (1976).
- 5) E. H. Hansen, J. Růžička: *Anal. Chim. Acta*, **87**, 353 (1976).
- 6) J. Růžička, E. H. Hansen, H. Mosbaek, F. J. Krug: *Anal. Chem.*, **49**, 1858 (1977).
- 7) E. H. Hansen, F. J. Krug, A. K. Ghose, J. Růžička: *Analyst* (London), **102**, 714 (1977).
- 8) H. Bergamin F<sup>o</sup>, E. A. G. Zagatto, F. J. Krug, B. F. Reis: *Anal. Chim. Acta*, **101**, 17 (1978).
- 9) Y. Hirai, N. Yoza, S. Ohashi: *Anal. Chim. Acta*, **115**, 269 (1980).
- 10) A. G. Fogg, N. K. Bsebsu: *Analyst* (London), **106**, 1288 (1981).
- 11) 平井幸雄, 与座範政, 大橋 茂: 分化, **30**, 465 (1981).
- 12) 緒方惟治, 田口清水, 今成登志男: 分化, **31**, 641 (1982).
- 13) S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Tōei: *Talanta*, **30**, 333 (1983).
- 14) S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Tōei: *Analyst* (London), **108**, 361 (1983).

☆

**Continuous flow method for the determination of phosphorus using the fluorescence quenching of Rhodamine 6 G with molybdophosphate.** Shoji MOTOMIZU, Hiroshi MIKASA, Mitsuko OSHIMA, and Kyoji TŌEI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama-shi, Okayama, 700)

Continuous flow method was examined for the determination of phosphorus. The molybdophosphate formed between orthophosphate and molybdate in hydrochloric acid medium diminished the fluorescence of Rhodamine 6 G. Carrier solution (distilled water) and reagent solution were propelled by double plunger pump P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> (flow rate: 0.98 ml/min), and sample solution (160 μl) was injected into the carrier stream. The two streams were mixed in 20 cm long Teflon tubing (1 mm i.d.), and the mixture was flowed through a flow cell (18 μl), at which the fluorescence of Rhodamine 6 G was detected (λ<sub>ex</sub> = 350 nm, λ<sub>em</sub> = 580 nm). The reagent solution consists of 0.035 M molybdenum and 1 × 10<sup>-5</sup> M Rhodamine 6 G in 0.8 M hydrochloric acid. Co-existing ions generally existing in river and sea waters did not interfere the determination of phosphorus. The calibration curve was linear from 0 to 45 ppb of phosphorus. The method was applied to sea water. The sampling rate was 20 samples per hour.

(Received September 16, 1983)

**Keyword phrases**

continuous flow analysis of phosphorus by fluorophotometry; fluorescence quenching of Rhodamine 6 G with molybdophosphate; sea water.

## 2-ニトロソ-1-ナフトール-4-スルホン酸を用いるイオン対クロマトグラフィーによるコバルトの定量

沢谷 郁夫, 大島 光子,  
本水 昌二<sup>®</sup>, 桐柴 恭二\*

(1983年9月12日受理)

### 1 緒 言

金属イオンを、まず負電荷を持つ金属キレート化合物(キレート陰イオン)に変え、これをかさ高い陽イオンによって溶媒抽出して吸光光度定量する方法が既に多数報告されている<sup>1)~3)</sup>。中でも金属に配位しないスルホン基を持つキレート陰イオンの抽出は比較的 pH の影響を受けにくく、又抽出性もよいことから広範に利用されており、平衡論的取り扱いもなされ、抽出性の予測もかなり可能となっている。著者らの 2-ニトロソ-1-ナフトール-4-スルホン酸(ニトロソ-NW 酸, H<sub>2</sub>R)を用いるコバルト<sup>4)~6)</sup>、ニッケル<sup>7)</sup>、銅<sup>8)</sup>、鉄<sup>9)</sup>イオンの抽出平衡論の結果によれば、キレート陰イオンとキレート試薬の抽出性は、キレート陰イオン>HR<sup>-</sup>>R<sup>2-</sup>の順に悪くなる。この抽出性の差を利用すればキレート陰イオンのみを選択的に抽出することも可能であり、アルミニウム<sup>10)</sup>、鉄<sup>11)</sup>、ホウ素<sup>12)13)</sup>などの抽出吸光光度法が開発された。一方高速液体クロマトグラフィーの進歩により、イオン対の分配に基づく各種イオンの分離法が考案され<sup>14)</sup>、オクタデシル化シリカゲル(ODS)を用いる簡便な逆相イオン対クロマトグラフィー(IP-HPLC)も開発された<sup>15)16)</sup>。四ツ柳らは IP-HPLC により初めてキレート陰イオンの分離、定量を行った<sup>17)</sup>。著者らもスルホン基を持つキレート陰イオンの IP-HPLC による高感度、迅速な定量を目的とし、既にクロモトローブ酸を用いるホウ素の定量法を報告した<sup>18)</sup>。これはバッチ式にお

ける抽出分離と吸光度測定を高速液体クロマトグラフに行わせることにより、迅速化、簡便化及び高感度化を達成したものである。本報も同様な観点に立ち、ニトロソ-NW 酸を用いるコバルトの定量法を検討した。

## 2 実 験

### 2.1 装 置

フローセル(8 $\mu$ l)を接続した東洋曹達製 UV-8 Model II 波長可変検出器、東洋曹達製 HLC-803D 型ポンプ、Rheodyne 社製 Model 7125 (100 $\mu$ l ループ) 注入バルブ、柳本製作所製 Yanaco System-1100 インテグレートー及び記録計から成る高速液体クロマトグラフシステムを使用した。測定波長は 368 nm でピーク高さ及びピーク面積を記録した。

### 2.2 カラム及び移動相

カラムは Brownlee Labs. 製, ODS カラム (RP-18 SPHERI-5, 4.6 mm i. d.  $\times$  100 mm) を使用し、恒温槽中で 40 $^{\circ}$ C に保った。移動相には臭化テトラブチルアンモニウム ( $1.4 \times 10^{-2}$  M) とリン酸緩衝液 (pH 8,  $5 \times 10^{-3}$  M) を含む 52% メタノールと 48% 蒸留水の混合溶液を調製し、0.45 $\mu$ m メンブランフィルターで濾過、脱気した後使用した。

### 2.3 試 薬

2-ニトロソ-1-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム: 既報<sup>9)</sup>に従い合成したものを希塩酸中で 2 回再結晶した後使用した。

クエン酸緩衝液 (2 M): 既報<sup>19)</sup>に従いクエン酸三ナトリウム水溶液中のコバルトを抽出除去した後、希硫酸で pH 5.4 に調節して用いた。

コバルト標準溶液: 硫酸コバルトを水に溶解して  $1 \times 10^{-3}$  M とした。正確な濃度は EDTA で標定した<sup>20)</sup>。

ニッケル標準溶液: 三津和化学薬品製ニッケル (99.999%) を塩酸で溶解し、水を加えて 0.10 M 溶液を調製した。

ニッケル塩試料: 半井化学薬品製、特級の硝酸、硫酸、塩化物塩、及び硫酸ニッケルアンモニウムを用いた。

その他の試薬は市販特級品をそのまま用いた。

### 2.4 定量操作

共栓付き試験管に試料 (7.5 ml ないしはそれ以下) を採り、水を加えて 7.5 ml とする。これにクエン酸緩衝液 1 ml を加え更にニトロソ-NW 酸溶液 1 ml を加えて 10 分間放置する。その後 EDTA 溶液 ( $2 \times 10^{-3}$  M) 0.5 ml を加えて混合した後高速液体クロマトグラフに注入する。

### 2.5 試料溶液の調製

市販ニッケル塩の ( $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$ ) mol を精ひょうし、

\* 岡山大学理学部: 700 岡山県岡山市津島中 3-1-1