

1,10-フェナントロリンによる植物試料の 硝酸-過塩素酸分解液中の鉄の吸光光度定量

星 川 玄 児

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON IN NITRIC-PERCHLORIC ACID DIGEST OF PLANT MATERIAL WITH 1,10-PHENANTHROLINE

Genji HOSHIKAWA

When 2 ml of 0.12% L-ascorbic acid solution was used as reducing agent in place of hydroquinone solution in AOAC method for determination of iron in plants, the color of iron (II) • phenanthroline complex was fully developed within 1 minute. Even in the case of addition of citrate solution to prevent turbidity of aluminum phosphate, there was no delay in the maximum color development.

In the presence of perchloric acid, the duration of the full color intensity shortened extremely, as a result of the formation of iron (II) • phenanthroline • perchlorate. This phenomenon was prevented by addition of 4 ml of acetic acid (above 99%).

By above method, iron was determined successfully in the nitric-perchloric acid digest of plant material, which contained 3 ml of perchloric acid per 250 ml.

1,10-フェナントロリン (OPT) による鉄の吸光光度定量において、還元剤及び pH 調整剤の選択並びに共存過塩素酸の影響について検討し、次の結果を得た。

アスコルビン酸で鉄を還元し、酢酸ナトリウムで pH を調整して発色させると、放置時間1分間で最高発色を示した。リン酸アルミニウムの沈殿を防止する必要があるれば、1%クエン酸ナトリウム2mlを添加後酢酸ナトリウムで pH を調整するのがよく、この場合も1分間で完全に発色した。

過塩素酸が共存すると、 $\text{Fe}(\text{OPT}) \cdot (\text{ClO}_4)_2$ 生成のため、呈色安定時間が著しく短縮され、その傾向は鉄及び過塩素酸が多いほど大であった。過塩素酸共存の影響は酢酸4mlを添加することによって著しく軽減され、鉄及び過塩素酸が多量の場合でも、約2時間40分の呈色安定時間が得られた。

本法を植物試料の硝酸-過塩素酸分解液に適用し良好な結果が得られた。

緒 言

植物試料中の鉄の定量には1,10-フェナントロリンによる吸光光度定量法⁽¹⁻⁵⁾及び原子吸光分析法⁽⁵⁻⁹⁾が多く用いられている。1,10-フェナントロリンが鉄の吸光光度定量法に利用⁽¹⁰⁾されて以来、この方法に関する研究はきわめて多いが^(11,12)、いずれも本法が感度あるいは呈色の安定性などの点で、他の吸光光度定量法にまさることが指摘されている。本法を実施するに当たって過塩素酸イオンが共存すると、1,10-フェナントロリン-鉄(II)錯イオンと過塩素酸イオンのイオン会合によって赤色沈殿が生成する現象については、二、三の指摘があるが^(11,13,14)、いずれも

詳細な定量的検討は行われていない。一方、植物試料の無機成分定量用供試液の調製に当っては、乾式灰化法と並んで硝酸-過塩素酸分解法が多く用いられ、とくに微量金属成分については後者の方法が良法とされている⁽¹⁵⁾。従って、植物試料の硝酸-過塩素酸分解液中の鉄の定量に直接本法を適用するに当って、過塩素酸の影響を検討することはきわめて重要と考えられる。

著者は先に、上記の赤色沈殿の生成条件を検討し、発色時の試薬の混合をおだやかにすることによって、沈殿の生成がある程度防止されることを報告したが⁽¹⁶⁾、その後酢酸の添加が、さらに確実に沈殿の生成を一定時間防止することを認めたので、以下にその結果を報告する。

実験及び結果

1. 試薬及び装置

試薬はすべて特級品を使用した。

1, 10-フェナントロリン溶液：1, 10-フェナントロリンの1水塩を温水に溶かし、0.25%溶液を調製した。暗所に貯蔵し、着色した時は新たに調製した。

ハイドロキノン溶液：ハイドロキノンを水に溶かして1%溶液を調製した。冷暗所に貯蔵し、着色したものは更新した。

アスコルビン酸溶液：使用時にアスコルビン酸を水に溶かして0.12%溶液を調製した。

酢酸ナトリウム溶液：酢酸ナトリウム500gを水1Lに溶解した。

クエン酸ナトリウム溶液：クエン酸ナトリウム250gを水1Lに溶解した。別に1%溶液を調製した。

鉄標準溶液：硫酸第一鉄アンモニウム7.0199gに水200mlと硫酸(1+15)10mlを加えて溶かし、水で1L定容とした(Fe 1,000ppm)。使用に際しては適当に水で希釈した。

分光光度計：日立139型分光光度計を使用した。

植物試料分解装置：柴田製電熱式セミマイクロ窒素分解装置を使用した。

2. 標準操作

(1) 植物試料の硝酸-過塩素酸分解法

通風乾燥後粉碎した植物試料1~3gを既報の方法⁽¹⁷⁾に従って分解し、100あるいは250ml定容とする。

(2) 鉄定量法

Feとして0.01~0.2mgを含む酸性溶液25mlを50ml容メスフラスコにとり、アスコルビン酸溶液2ml及び1, 10-フェナントロリン溶液2mlを加え、さらに溶液のpHを3.5にするに必要な酢酸ナトリウム溶液を加える。水で定容後510nmで吸光度を測定する。

3. 還元剤及びpH調整剤の選択

従来法の多くは鉄(III)の還元にはイドロキノンを使用しているが、松原⁽¹⁸⁾は種々の還元剤の優劣を比較し、アスコルビン酸を推奨している。そこで、Feとして0.05, 0.1, 0.15及び0.2mgを含む0.12N硫酸酸性溶液25mlについて、上記定量法に従ってアスコルビン酸の効果を検討した。

経時的に吸光度を測定したところ、従来最高発色を得るのに1時間の放置時間が必要とされていたのに対して、僅か1分間の放置で十分であった。

また、発色をpH3.5で行った場合、試料によっては定量操作中にリン酸アルミニウムが形成されて、溶液に沈殿もしくは濁りを生じる場合があり、その防止のために、pH3.5の調整の際に上記の酢酸ナトリウムの代りにクエン酸ナトリウムを使用する方法が広く行われている。クエン酸ナトリウムの共存がアスコルビン酸の鉄(III)の還元に及ぼす影響を検討するために、Feとして0.1mgを含む0.12N硫酸酸性溶液25mlについて、上記定量法のうちpH調整剤をクエン酸ナトリウムに代えた方法によって発色させ経時的に吸光度の変化を測定した。pHの調整に要したクエン酸ナトリウム量は250g/L溶液で6.5mlであった。発色時の液温は10, 20及び30°Cとした。なお、参考のために1%ハイドロキノン溶液3mlを還元剤として使用した場合も併せて実施した。得られた結果をFig. 1, 2に示す。

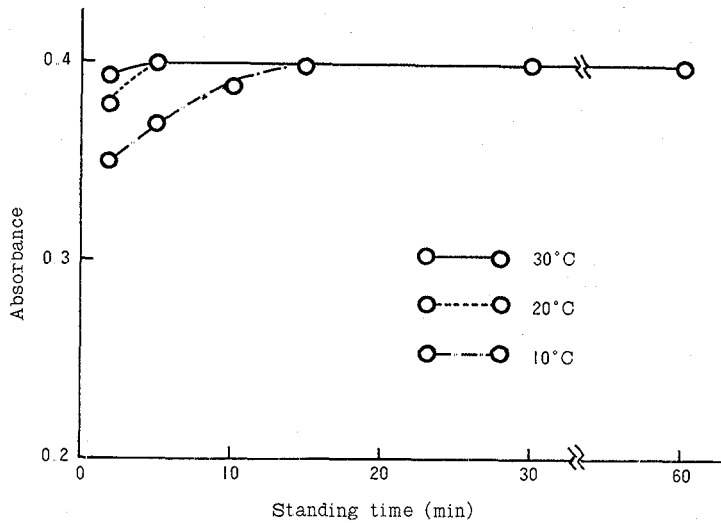


Fig. 1. Effect of citrate on the formation of iron (II) · phenanthroline complex (reducing agent: L-ascorbic acid)

Iron taken : 0.1mg.

To 50-ml volumetric flask was added 6.5ml of 250g/L sodium citrate solution.

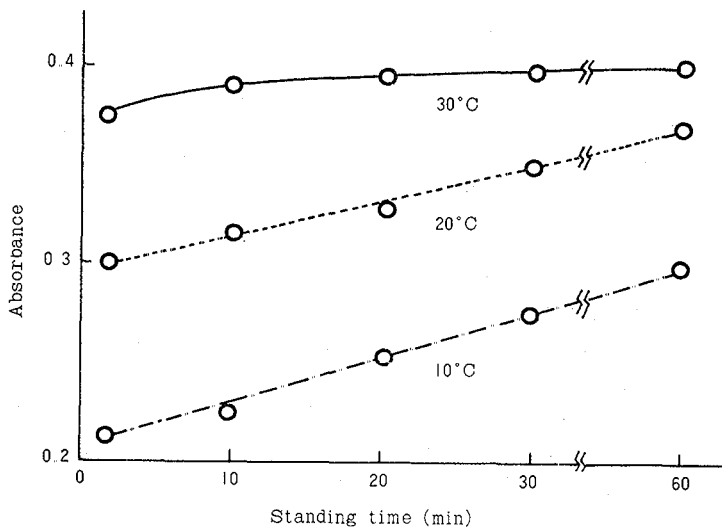


Fig. 2. Effect of citrate on the formation of iron(II) · phenanthroline complex (reducing agent: hydroquinone)

Iron taken: 0.1mg.

To 50-ml volumetric flask was added 6.5ml of 250g/L sodium citrate solution.

還元剤としてアスコルビン酸を使用した場合、クエン酸ナトリウムの添加で最高発色に要する放置時間が長くなり、液温10°Cでは15分間、20及び30°Cでは5分間を要した。ハイドロキノンを使用した場合の発色はきわめて遅く、30°C、60分間の放置で初めて最高発色を示した。

リン酸アルミニウムの沈殿もしくは濁りの防止のみを目的とする場合は、上記のような多量のクエン酸ナトリウムは必要でなく、AOAC法では1%クエン酸ナトリウム溶液2mlを添加後、pH 3.5の調整は酢酸ナトリウムで行っている⁽⁴⁾。この程度のクエン酸ナトリウムの共存が発色に及ぼす影響を検討するために、上記の方法に準じて経時的に吸光度の変化を測定した。クエン酸ナトリウムの添加量及び酢酸ナトリウムによるpH調整以外は、すべて上記と同一条件で行った。得られた結果をFig. 3に示す。

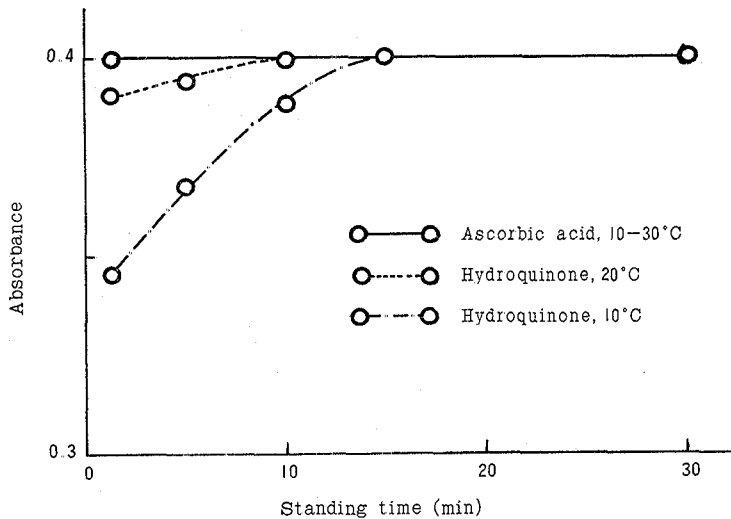


Fig. 3. Effect of citrate on the formation of iron(II)·phenanthroline complex (reducing agent: L-ascorbic acid or hydroquinone)

Iron taken: 0.1mg.

To 50-ml volumetric flask was added 2ml of 1% sodium citrate solution.

クエン酸ナトリウム量の減少によって、発色速度は著しく大となり、還元剤としてアスコルビン酸を使用した場合は、温度にかかわらず、クエン酸ナトリウムの共存しない場合と同様、1分間で最高発色を示した。還元剤としてヒドロキノンを使用した場合も、10°Cで15分間、20°Cで5分間、さらに30°Cではアスコルビン酸と同様に1分間で最高発色を示した。

以上から、リン酸アルミニウムの沈殿もしくは濁りの防止には1%クエン酸ナトリウム溶液2mlを添加するのが良く、この場合でも還元剤として0.12%アスコルビン酸溶液2mlを加え、pH 3.5の調整に酢酸ナトリウム溶液を使用すれば、温度にかかわらず、1分間で最高発色を示すことを確認した。

4. 過塩素酸の影響

植物試料を硝酸-過塩素酸で分解し、残存液量が3mlになるまで濃縮した後、100あるいは250ml定容とするのを供試液調製の常法とした。この程度の残存過塩素酸量が、供試液について各種無機成分を定量するのに好適であったためである。分解後250ml定容とした場合、この溶液の過塩素酸濃度は約0.12Nであった。この実験では、0, 0.06, 0.12, 0.18及び0.24Nの過塩素酸25mlが添加された場合の影響を標準定量法に従って検討した。

なお、鉄の採取量はFeとして0.05, 0.1, 0.15及び0.2mgの4段階とした。得られた結果をFig. 4に示す。

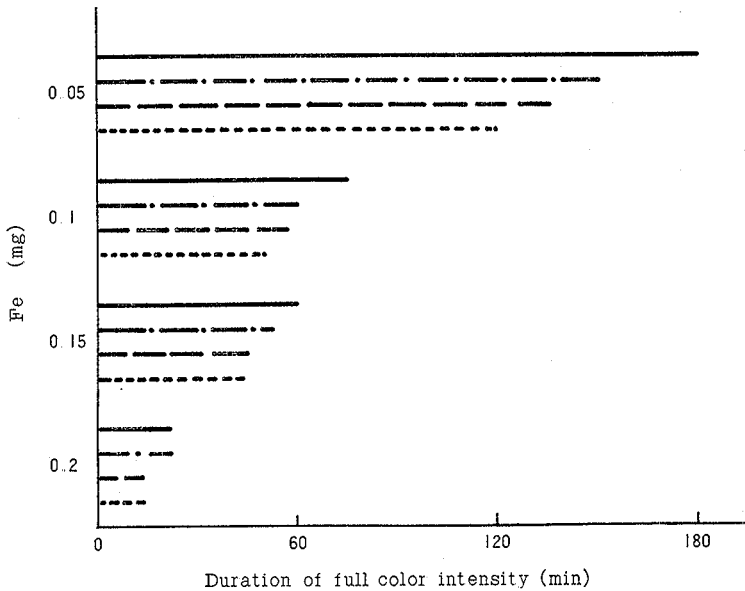


Fig. 4. Effect of perchlorate on the stability of coloration
 HClO_4 concentration of sample solutions:
 — 0.06N, - - - 0.12N, - · - 0.18N,
 ····· 0.24N

いずれの場合も発色後1分間で最高の発色を示し、その吸光度は過塩素酸の共存しない場合の吸光度に等しかった。過塩素酸共存の影響はその濃度とともに増大し、鉄含有量が多くなり1, 10-フェナントロリン-鉄(II)錯イオンが増加するに従って、その影響はさらに顕著であった。鉄含有量が0.05mg、過塩素酸濃度が0.12Nの場合には、約150分間の呈色安定時間を示したが、この場合も発色液をはげしく攪拌すると、赤色沈殿の生成が認められ、上澄み液の吸光度が減少し、発色が不安定であった。

5. 酢酸添加による過塩素酸の影響の防止

鉄採取量を0.2mg、過塩素酸濃度を0.24Nとし、これに酢酸(99%以上)を0~4mlの範囲で添加し、標準定量法で発色させ、経時的に吸光度を測定したところ、酢酸を添加しない場合に比較して、酢酸添加量の増加とともに、呈色安定時間が著しく延長され、呈色安定時間内では激しく攪拌しても赤色沈殿の生成は認められなかった。そこで、鉄採取量及び過塩素酸濃度範囲を上記4の実験と同一にし、これに酢酸4mlを添加した場合について呈色の安定性を検討した。得られた結果をFig.5に示す。

酢酸を添加した場合もすべて発色後1分間で最高の発色を示した。呈色安定時間の検討は10時間の範囲で行ったが、鉄採取量0.05及び0.1mgの場合には過塩素酸濃度にかかわらず、すべて8時間後も吸光度の変化は認められなかった。鉄採取量0.15及び0.2mgの場合には、鉄採取量及び過塩素酸濃度の増加とともに呈色安定時間は減少したが、鉄採取量、過塩素酸濃度がともに最高の場合でも約2時間40分の呈色安定時間があり、発色操作後1分間で最高発色を示すことと相まって、十分実用的分析に適するものと考えられる。

6. トマト葉試料への本法の適用

通風乾燥後粉碎したトマト葉試料3gを常法に従って硝酸-過塩素酸で分解し250ml定容とした供試液25mlを50ml容メスフラスコにとり、酢酸(99%以上)4ml、0.12%アスコルビン酸溶液2ml、0.25%1, 10-フェナントロリン溶液2mlを加え、500g/L酢酸ナトリウム溶液でpH3.5に調整した後、水を加えて50ml定容とし510nmで吸光度を測

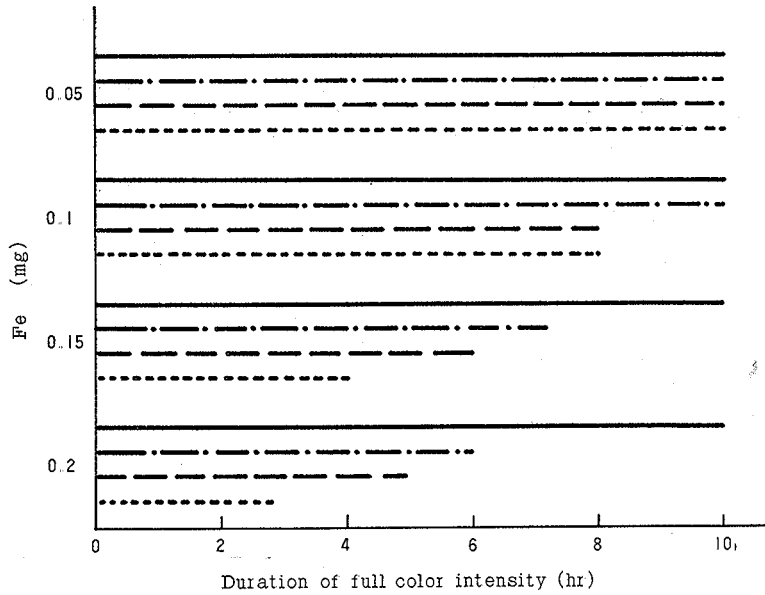


Fig. 5. Effect of acetic acid on the formation of iron(II)·phenanthroline·perchlorate

HClO₄ concentration of sample solutions:

———— 0.06N, - - - 0.12N, — · — 0.18N, ····· 0.24N

定した。呈色安定時間を見るために1時間毎に吸光度を測定したが5時間の範囲内で吸光度は変化しなかった。定量結果をTable 1に示す。対照として同一試料を硝酸-過塩素酸-硫酸で分解し完全に過塩素酸を追い出した硫酸酸性供試液について、酢酸4ml無添加以外上記と同様の方法で鉄を定量した。また、両方法とも試料に適当量の鉄標準溶液を加えて回収率をみた。

Table 1. Determination of iron in tomato leaves
($\mu\text{g Fe/g}$ dried material)

Digestion method	Acetic acid added ml/50ml	Fe added	Fe determined after standing		
			1 min	1 hr	5 hr
HNO ₃		0	142	—	142
+HClO ₄	0	166	308	—	306
+H ₂ SO ₄		332	475	—	477
		0	142	134	—
	0	166	308	300	—
HNO ₃		332	477	463	—
		0	145	—	142
+HClO ₄	4	166	310	—	310
		332	474	—	475

結果は3連の平均値で示した。硫酸酸性溶液の回収率はきわめて良好で、1,10-フェナントロリン法が植物試料中の

鉄の定量に好適であることを認めた。過塩素酸酸性溶液への酢酸添加の効果は明らかであり、対照法とよく一致した結果を示した。酢酸を添加しない場合は、放置1時間後の測定で既に低値を示した。還元剤としてアスコルビン酸を使用することによって、発色1分間放置後からの定量が可能となったが、従来多用されているハイドロキノンを使用した場合は、過塩素酸酸性溶液への1,10-フェナントロリン法の適用は、鉄の低含量試料について発色後一定時間経過後のきわめて限られた時間内での測定に限定されるものと思われる。

引用文献

- (1) TOOTH, S. J.: *Soil Sci.*, 66, 459 (1948).
- (2) 植物栄養学実験編集委員会: 植物栄養学実験, p. 57, 東京, 朝倉書店 (1959).
- (3) 戸苅義次他: 作物試験法, p. 295, 東京, 農業技術協会 (1960).
- (4) HORWITZ, W.: Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 11th Ed., p. 34, Washington, AOAC (1970).
- (5) 作物分析法委員会: 栄養診断のための栽培植物分析測定法, p. 96, 東京, 養賢堂 (1975).
- (6) DAVID, D. J.: *Analyst*, 83, 655 (1958).
- (7) ALLAN, J. E.: *Spectrochim. Acta*, 1959, 800.
- (8) 小菅伸郎, 伊藤滋吉, 伊藤秀文: 北陸農試報告, No. 9, 47 (1968).
- (9) 農林省園芸試験場栽培生理・土壌研究室: 原子吸光分析法による葉, 土壌中の無機成分の分析法, p. 16 (1968).
- (10) FORTUNE, W. B., MELLON, M. G.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 10, 60 (1938).
- (11) SANDELL, E. B.: *Colorimetric determination of traces of metals*, 3rd Ed., p. 537, New York, Interscience Publishers (1959).
- (12) 平野四蔵他: 無機応用比色分析 2, p. 334, 東京, 共立出版 (1974).
- (13) 松原高賢: 鉄と血色素, p. 53, 東京, 南江堂 (1963).
- (14) 高木誠司: 定性分析化学 (中巻), p. 119, 東京, 南江堂 (1964).
- (15) GORSUCH, T. T.: *Analyst*, 84, 135 (1959).
- (16) 星川玄児: 日本土壤肥料学会講演要旨集, 第14集 (Part III), 28 (1968).
- (17) 星川玄児, 柳原 勇: 本誌, 18, 63 (1977).

(1977年10月15日 受理)