

カルセインを指示薬とするキレート滴定による カルシウム定量法の検討— I .

飲料水・海水を試料とする定量法

石原 忠・保田 正人

Determination of Calcium by Chelatometry Using Calcein— I .

Determination of Calcium in Drinking Water and Sea Water

Tadashi ISHIHARA and Masato YASUDA

The method of determining calcium in drinking water by chelatometry (Calcein as an indicator) could not obtained reliable results under the hitherto employed condition, pH at the titration or the concentration of indicator etc., because of the improvement of reagent-purity.

It is necessary to adjust the pH of sample to more than 12.5 and to dilute the concentration of indicator as far as ten to fifty times of it. For the adjustment of pH in the sample, a solution of potassium hydroxide was more suitable than sodium hydroxide solution used.

近年カルシウムの定量にキレート滴定法が数多く利用され、指示薬としても DOTITE -BT, -PC, -TPC, -MX, -NN, -Calcein, -Calcon 等多種類のもものが逐次研究市販されている。これらの指示薬にはそれぞれ一長一短があり、既に歴史的存在として利用価値の低いものも少なくない。著者等は飲料水、海水等のカルシウム含量を多数の検体について調査を行なう必要上、簡便な定量法としてキレート滴定を採用、数種の指示薬を比較した結果、種々の点でカルセインに利点を認めたのでこれを利用している。しかしカルセインを使用する場合、既往文献の方法では予期した結果が得られなかったので、定量条件の検討を行ない、試料の種類、試薬濃度、pH 等多くの点で従来の方法がそのまま定量に使用出来ないことを確認した。すなわち試料の色調、含有金属イオンによる妨害作用、試薬純度の向上による最適濃度と反応 pH の移動等を認めた。

本報においてはとりあえず飲料水および海水のような透明溶液を対象とする最適定量条件について報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬

(1) カルシウム標準液：比色用標準試薬 (1mg Ca/ml, 第一化学薬品製) を再蒸溜水

をもって希釈しマクロ分析では 1.0mg/ml, ミクロ分析では 0.1mg/ml とした。

(2) 滴定液：DOTITE 硬度滴定液 B (0.01M 2Na・EDTA 同仁薬化学研究所製) を希釈し、マクロ分析では 0.01M, ミクロ分析では 0.0025M 溶液とした。

(3) 指示薬：製造年月日の異なるカルセイン 3, 3'-Bis [N, N'-di (Carboxymethyl)-aminomethyl]-fluorescein) 二種の一定量を 1N KOH 25ml に溶解し、蒸留水で 100 ml に希釈し、液体指示薬として使用した。

指示薬 A (新製品) は 1963 年 1 月 10 日製造、指示薬 B (旧製品) は 1957 年 7 月 19 日製造のもので、入手時期はほとんど同時期であり、溶液の色調にはかなりの相違が認められた。また指示薬 B は、明らかに純度不良のため滴定終点の蛍光完全消失は見られず、Calcein の指示薬としての特徴が認められなかった。

2. 定量方法

カルシウム標準液 1ml を 50ml 容ビーカーにとり、1N KOH にて所定の pH に調製した液 19ml を加え、Calcein 指示薬 0.1ml を滴下、2Na・EDTA で滴定定量を行なった。滴定終点の判定は、指示薬 A では黄緑蛍光の消失により、指示薬 B では黄緑色から赤褐色の変色で行なった。

実 験 成 績

1. 指示薬濃度の検討

カルセイン指示薬の調製法は、固体粉末状および液状に分けられ、種々の方法がある¹⁾ 2)。液状指示薬としては、DIEHL²⁾, YALMAN³⁾ らは、2% Calcein の NaOH 溶液を、BELCHER⁴⁾ らは 1% 溶液として使用している。著者らは当初この濃度範囲で実験を行なったところ、ミクロ分析では定量値の分散および理論値よりの偏差が著しく大となり、使用に耐えないことを知ったので、マクロおよび、ミクロ分析において指示薬濃度を変えて滴定値の分散および定量精度について検討した。

(1) ミクロ分析法

上述の方法で定量すると滴定理論量は 1.0ml となる。指示薬濃度は 1, 0.2, 0.1, 0.02% の 4 種とし、滴定時の被験液 pH は 12.8 とした。

滴定終点の判定は、指示薬 A については、蛍光が完全に消失する時と、被験液の背面に白色板を置いた場合の蛍光消失時とし、この場合白色板をのぞくと僅かに蛍光が認められる。指示薬 B では蛍光を無視し、液色が黄緑色から赤色に変化する点で行なった。いずれの場合にも、直射光および蛍光灯下での測定は判定が困難となる欠点がある。

上記の方法による各指示薬の濃度別の測定滴定量の分布を求めると Fig. 1 のようになった。

(2) マクロ分析法

上述の方法で定量を行うと滴定理論量は 2.5ml となる。指示薬濃度および滴定時被験液の pH はミクロ分析の場合と同様にして行なった。結果を Fig. 2 に示す。以上の結果から、高純度の指示薬 A では従来使用されている 1% 濃度では、ミクロ、マクロ両法共に誤差が大きく、前者では滴定終点の方法をどのように変えても、理論量より遙かに低い不定値となり、とうてい使用に耐えず、後者でも蛍光の完全消失を判定すると常に理論値

より 2.5～5% 低い値となり、測定値の分散も大きくなった。指示薬濃度を低下させるにしたがってマイクロ法では測定値の分散の中もせばまり、同時に理論量に近ずき、0.1, 0.02%濃度では0.5%以内の誤差で良く一致した、白色板を背面に置いた状態では、0.1濃度ではなお2%以内の低値となったが、0.02%では白色板の有無に全く影響されずに終点を見ることが出来た。一方マクロ法では0.2, 0.1%濃度では理論値に対し±0.8%程度の誤差に止まった。

低純度の指示薬Bのマイクロ法では指示薬濃度1%で、その測定値の分散は1%以内の高値となり分散も少ないのに対し、濃度を低くするにしたがって理論値との偏差がやや高値に向い、かつ分散が大となる傾向を認めた。またマクロ法でも同様の傾向が見られた。このような結果を総括すると、指示薬純度が低い当時

に発売されたものでは、従来用いられている濃度は適当なものであったが、近年合成法の改良によって著しく純度の向上がみられ、Calcein 本来の蛍光消失判定法を適用するためには、遙かに低濃度のものを使用する必要があることを知った。これは pH 12以上では遊離のカルセインは赤褐色、Ca-カルセインキレートが黄緑色蛍光を呈する^{2,5)}とされていることから、高純度のものでは低純度と同一量の添加によって、遊離のカルセインが多くなり、特にマイクロ法ではCa-カルセイン結合に比較して遊離のカルセインが多いため赤褐色が強く現われ、滴定終点を理論滴定量よりも低い点で認める結果になったものと考えられる。

2. 滴定時の pH の検討

従来のカルセインを使用する場合、滴定時の pH は 12.0 以上を必要とするとされているが^{2,5)} この条件では必ずしも満足する結果が常時得られなかったので、最適 pH について検討を行なった。

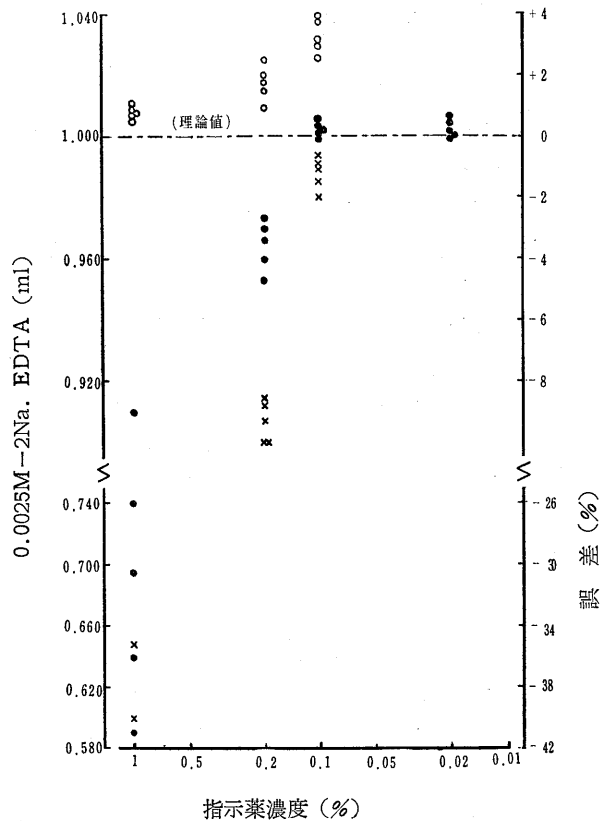


Fig. 1. ミクロ分析における指示薬濃度の影響
 ●：指示薬 A を使用し蛍光が完全に消失する時の滴定量
 ×：指示薬 A を使用し被験液の背面に白色板を置いた場合の蛍光消失時の滴定量
 ○：指示薬 B を使用した時の滴定量

被験液 Ca 含量 0.1mg, 滴定液濃度 0.0025M の条件下で指示薬 A の 0.1% 溶液を用い, 被験液の pH を変えて測定を行なった. 滴定終点の判定は前記 1 に示す二つの方法と同様である. その結果は Fig. 3 に示す.

すなわち pH 12.0 ~ 12.3 では, 蛍光の消失が不完全で鋭敏な終末点を得られず, 定量操作が未熟な場合には, 図示の測定量より更に多量に滴定する可能性が強い. pH 12.4 では平均値としては理論量に近づくが, なお分散の巾がやや広く, 更に pH を 12.6 以上に上げると $\pm 0.5\%$ 以内の精度で良く理論値と一致することを知った. 一方白色板を使用した場合, 測定値の分散の巾は前者とほぼ一致した傾向を示すが, pH の如何によらず常に 1 ~ 2% 程度低い値が得られた.

3. 共存 Na, K イオンの影響

キレート滴定によるカルシウム定量では指示薬の種類によっては共存する金属イオンによる妨害がしばしば生ずるため, 各指示薬について妨害イオンの種類が検討されている. このうち滴定操作として避け得ないものとしてカルセインの場合に pH を調節する

ため KOH または NaOH が使用されるが, DIEHL²⁾ GREENBLATT⁶⁾ や YALMAN ら³⁾ は NaOH の使用をすすめ, 上野⁵⁾ は KOH の使用を指示している. 一方海水を試料とする場合には Na, K 塩は必然的に含有されており, 特に Na 塩の量が著しく多いので,

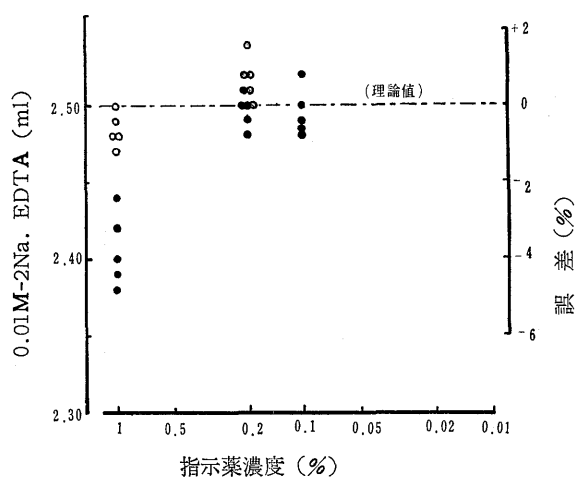


Fig. 2. マクロ分析における指示薬濃度の影響 (符号は Fig. 1 に同じ)

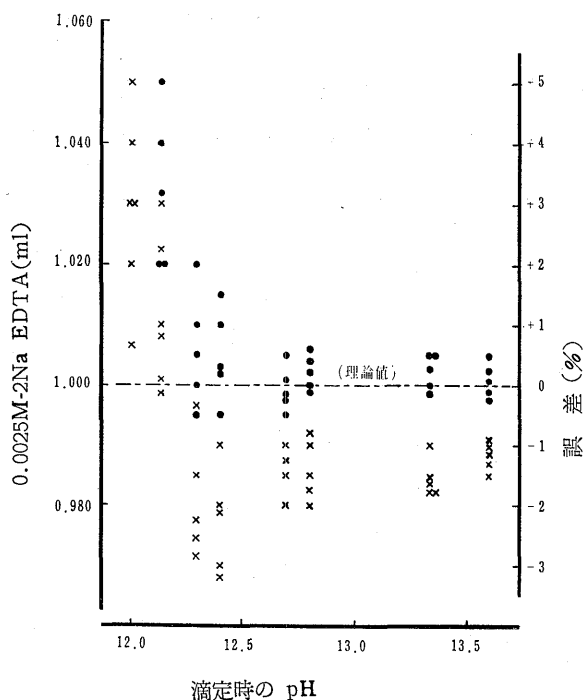


Fig. 3. 滴定時の pH の影響 (符号は Fig. 1. に同じ)

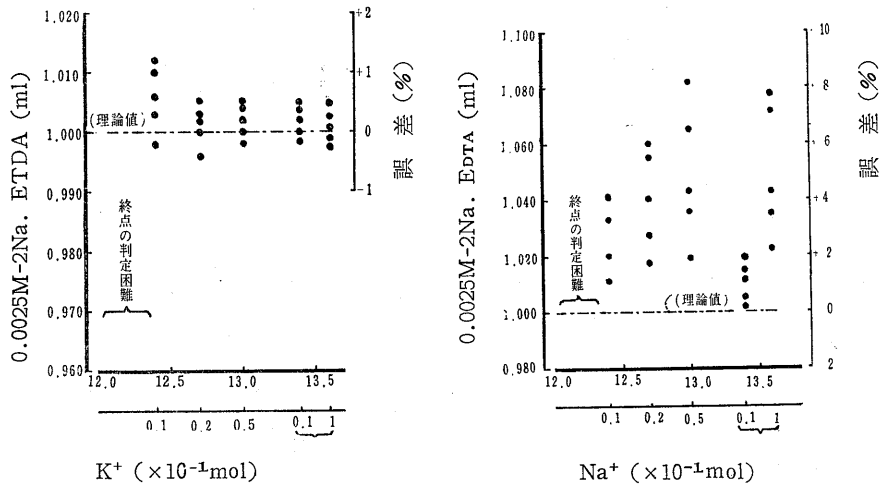


Fig. 4. Na 及び K イオンの影響

これらに対する影響を見るため、再蒸留水に一定量のカルシウムを添加し、KCl と 1N KOH, または NaCl と 1N NaOH を加えて被験液中の Na, K イオンの最終濃度を一定としたうえでその pH を測定すると共に、指示薬Aの0.1溶液と0.0025M 滴定液を用いて滴定を行い、Fig. 4 の結果を得た。この結果Kイオンの存在では理論値に±1%の

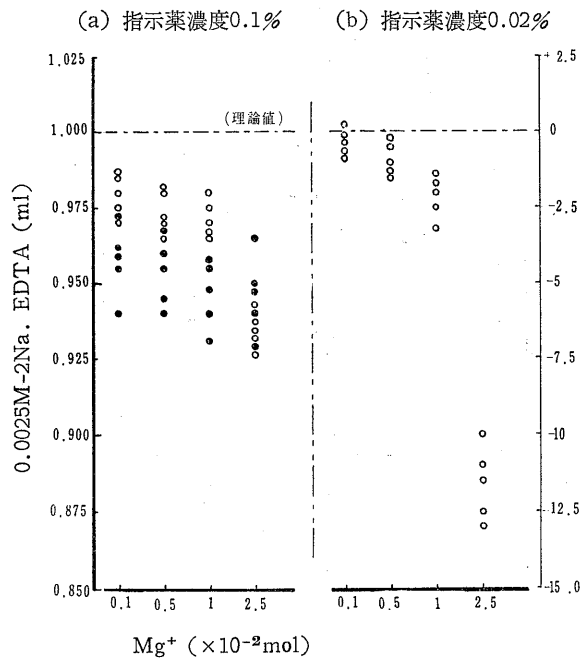


Fig. 5. Mg イオンの影響

● : 滴定時の pH 13.3
○ : 滴定時の pH 13.6

範囲で一致したが、Na イオンの存在では滴定終点において蛍光の完全消失がなく、判定が困難でややすると過滴定になる危険性を認めた。この危険性を除く為には、予め Na 塩を添加したカルシウム標準溶液について終末点の見当をつけておく必要があり、特に海水を試料とする場合には、数10倍に蒸留水で希釈してマイクロ法による定量が好都合である。

4. 共存 Mg イオンの影響
共存金属のうち、最も問題視されているものは、Mg イオンで DIEHL ら²⁾も過剰の Mg イオンの存在は低値を与えるとしている。また上野は Mg イオンの影響を避けるためには pH 12~13 の間での

滴定を勧めている⁵⁾。海水を試料とする場合は相当量の Mg 塩の共存がある故、この影響を見るため、Na などの影響を検討した場合と同様の方法で測定を行なった。その結果を Fig. 5 に示す。この結果から見ると Mg イオンが共存すると pH 13 以下では滴定終点の判定が困難となり、定量が不可能となる。pH 13.3 になると終点の判定はしやすくなるが、更に pH 13.6 にすると一層よい結果が得られた。しかし Mg 濃度の如何にかかわらず、測定値は、低値を示し、その傾向は指示薬 A の濃度に支配される可能性を認めた。この場合指示薬濃度を 0.02% にし、pH 13.6 で測定を行なうと、0.001M-Mg 含有で生ずる誤差は 0.8% 以内に止まり、0.01M-Mg でも 1.5% 以内の誤差であった。

Mg イオンの存在が測定値を低くする理由としては、被験液をアルカリ性とする場合に生ずる Mg(OH)₂ が Ca イオンを抱含するためではないかと思われるが、前記のように海水を大量希釈し、低濃度の指示薬を使用する場合にはほとんどその影響を無視できるものと考え得る。

考 察 お よ び 結 論

カルシウム定量にキレート滴定法を利用することは、多数試料に対する敏速定量法として好適なものであり、試料が着色物質の場合には蛍光消失でもって滴定終点を知る指示薬カルセインの使用が有利である。たまたま著者等はカルセインを従来使用されている条件で使用したとき、予想外の誤差を生ずることを知り、その原因を究明したところ、カルセイン合成法の改良による純度の向上が原因となって、定量条件の変異を生じていることを知った。すなわち純良なカルセインを使用する場合、滴定時の pH は 12.5 以上を必要とし、pH の調節には KOH が適当であった。指示薬濃度は純度によって変える必要があるが、最近の製品ではマクロ法では 0.2% 以下、マイクロ法では 0.1% 以下を適当とし、最低濃度の限界は 0.02% である。しかし市販品中には我々が経験したように現在でも、なお時折古い低純度の製品を入手する危険性もある故注意を要する。海水などのカルシウム以外の金属イオンを含有する試料については、Na, Mg, K イオンによる妨害が若干認められるが、この様な場合には試料の大量希釈によるマイクロ法の採用によって、誤差範囲を縮める事が可能であり、特に Mg イオンの存在時には、滴定時被験液の pH を 13.3~13.6 に保ち、指示薬濃度を 0.02% で行なえば、充分高精度の測定が期待出来る。なおその他の金属イオンについては検討を行っていないが、従来の文献からみて、Cu, Fe イオンの影響はアン化物の添加により容易に除くことができるとされている²⁾。その他は一応極端な含有量でない限り、妨害はないものとみなして差支えないと思われる。

要 約

カルシウムのキレート滴定において、指示薬としてカルセインを使用する場合、最近純度の向上により、従来の定量条件は適用できない。飲料水、および海水を試料とする場合には次の条件で定量を行なうと好成績が得られた。

1. 高純度のカルセインでは一般の試水に対してマクロ法では 0.2%、マイクロ法では 0.1~0.02% が適する。
2. 滴定時の pH は 12.5 以上に保ち、その調節は KOH による。

3. Na, Mg, K イオンを多量に含有する試料では試料の大量希釈を行なうと共に、滴定時の pH 13.3~13.6, 指示濃度0.02%, 滴定液濃度 0.0025M 程度のマイクロ法で行なう。
4. 滴定終点の判定には直射日光, または蛍光灯下はさけ, 間接光の下で行なう。

文 献

- 1) 同仁薬化学研究所: DOTITE 試薬解説資料 No. 101 (1960). p. 19.
- 2) HARVEY DIEHL and JOHN L. ELLINGBOE: *Anal. Chem.*, **28**, 882 (1958).
- 3) RICHARD G. YALMAN, et al.: *Anal. Chem.*, **31**, 1230 (1959).
- 4) BELCHER, R., R. A. CLOSE and T. S. WEST: *Talanta*, **1**, 238 (1958).
- 5) 上野景平: キレート滴定法, 南江堂 (1956), p.246.
- 6) GREENBLATT, I. J., and SEYMOUR HARTMAN: *Anal. Chem.*, **23**, 1708 (1951).