

# リン酸塩の分離と定量

原田 雅章, 藏 源一郎

## はじめに

私たちの身の回りに存在する物質はほとんど全て何種類かの物質が混じり合ってきた混合物である。例えば、空気は窒素、酸素、アルゴンなどの混合物であり、海水も水と塩化ナトリウムなどの混合物である。一方、それらの構成物質である窒素、酸素、アルゴン、水、塩化ナトリウムは単一の物質からなる純物質である。

混合物中にどんな化学物質がどのくらい含まれているかを調べるためには、まず含まれている個々の成分物質に分けてから（分離）、それぞれの化学物質がどのくらい含まれているかを調べる（定量）のが一般的である。何故なら、共存する他の物質が定量の妨げとなる場合が多いからである。分離と定量には様々な方法が考案され、物質の種類や目的に応じて使い分けられている。

ここではリン酸塩を例として、代表的な物質分離法の一つであるクロマトグラフィーによるリン酸塩の分離と、呈色反応を利用してその色の濃さからリン酸塩を定量する実験（吸光光度法）を行う。リン酸塩は動物の歯や骨、生物のエネルギー源となるATP（アデノシン三リン酸）、また遺伝に関わるDNA（デオキシリボ核酸）などに含まれており、生体内で大変重要な働きをしている物質である。

## リン酸塩の分析：モリブデンブルー法<sup>1)</sup>

酸性溶液中でリン酸塩 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) はモリブデン酸塩 ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) と反応して、リン原子1個に対し12個のモリブデン原子が結合して、モリブドリン酸 ( $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ , 黄色の錯体) を生成する。この時のモリブデン原子は6価であるが、種々の還元剤（例えば、硫酸ヒドラジン）によりこのうちのいくつかのモリブデン原子を5価に還元すると、錯体の色が黄色から青色へと変化する。この青色に見える錯体（リン-モリブデンヘテロポリブルー錯体、以下モリブデンブルー）は波長830nmの光を最も強く吸収するので、波長830nmでの光吸収を用いてその検出が可能である。

またモリブデンブルーの生成量は、モリブデン酸過剰条件下では溶存するリン酸塩濃度に比例するので、光吸収の大きさからリン酸塩の濃度を求めることができる（吸光光度法<sup>2)</sup>）。

本実験では、黄色の錯体を作らせてから6価のモリブデンの原子の一部を還元するのではなく、加えるモリブデンの一部を前もって還元し、5価と6価のモリブデンを含むようにした発色試薬 (Mo(V)-Mo(VI)試薬) を用いる<sup>3)</sup>。

Mo(V)-Mo(VI)試薬 (1 l) の作製方法は下記の通りである。強酸を扱うので作製の際には必ずゴム手袋を着用し、酸性ガスや大量の熱が発生するので全ての操作はドラフト中で溶液を十分に冷却しながら行う。

- 1) モリブデン酸アンモニウム ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 35.3gを1 l ビーカーで水200mlに溶かす。
- 2) これに濃塩酸200mlを攪拌しながら加える。
- 3) 次に亜鉛粉末3gを少しずつ加える。
- 4) さらに濃塩酸180mlを加え、冷却しながら濃硫酸400mlを加える。
- 5)十分に冷えた後、1 l メスフラスコに移し全量を1 l とする。

# 1. クロマトグラフィーによるリン酸塩の分離<sup>4)</sup>

## 【目的】

代表的な分離法の一つであるクロマトグラフィーによるポリリン酸イオン ( $P_nO_{3n+1}^{(n+2)-}$ ,  $n$  は重合度, 以下 $P_n$ と略す) の分離を行う。ここでは, 重合度が1から4までのポリリン酸塩混合物からそれぞれを分離する。

## 【クロマトグラフィー】

クロマトグラフィーは, 物質を分離, 精製, 同定, 定量する方法の一つであり, 広く一般的に用いられている。図1にクロマトグラフ装置の概略を示す。溶質混合物を適当な移動相 (例えば, 塩化カリウム (KCl) 溶液) とともにカラム (固定相, 例えばイオン交換樹脂, を詰めた管) 中を移動させると, 各成分の吸着性, 分配の差などにより移動速度に違いを生じ, これにより物質が相互に分離される。

分離されてカラムより溶出されたリン酸塩はポンプにより送られたMo(V)-Mo(VI)試薬と混合され, 加熱により発色反応が進行してモリブデンプルーに変わる。生成したモリブデンプルーを波長830nmの光吸収を利用して検出器で検出する。

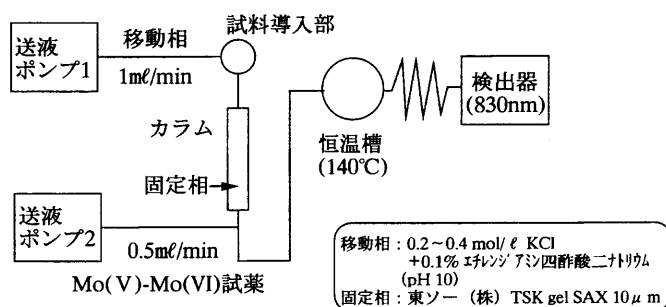


図1 クロマトグラフ装置

## 【試薬】 (図2)

- ①一リン酸三ナトリウム・12水和物,  
 $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$  : 分子量 380
- ②二リン酸四ナトリウム・10水和物,  
 $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$  : 分子量 446
- ③三リン酸五ナトリウム・6水和物,  
 $Na_5P_3O_{10} \cdot 6H_2O$  : 分子量 548
- ④四リン酸グアニジウム・1水和物,  
 $[NH=C(NH_2)_2]_6P_4O_{13} \cdot H_2O$  : 分子量 704

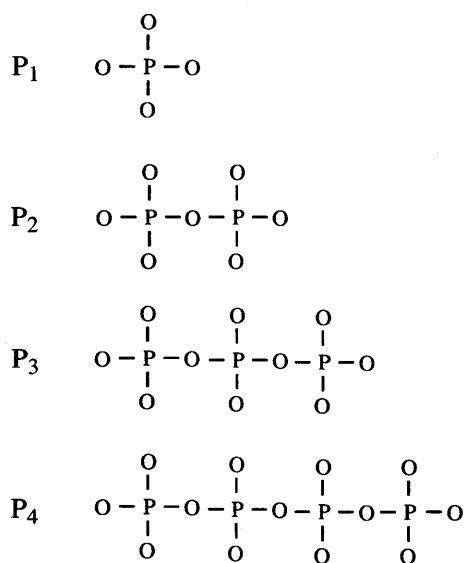


図2 重合度の異なるリン酸イオン $P_1 \sim P_4$   
(電荷と結合を省略して骨格のみ示す)

## 【器具】

- ①ビーカー (30ml×1)
- ②ホールピペット (2ml×1)
- ③メスフラスコ (20ml×1, 50ml×1)
- ④マイクロシリンジ (500 $\mu$ l×1)

## 【装置】(図1)

クロマトグラフ装置

- ・移動相：0.2~0.4 mol/l KCl + 0.1% エルンジアミン四酢酸二ナトリウム (pH 10)
- ・固定相：東ソー (株) TSK gel SAX 10 $\mu$ m
- ・カラム： $\phi$ 4mm×250mm
- ・5倍に希釈したMo(V)-Mo(VI)試薬

## 【実験】

- 1) 電子天秤を用いて、試薬①~④をそれぞれ0.0133 g, 0.0156 g, 0.0192 g, 0.0249 gずつ秤りとり、30mlビーカー中で脱イオン水に溶かす。(P<sub>1</sub>~P<sub>4</sub>の等モル混合溶液となる。)
- 2) これを50mlメスフラスコに完全に移す。(このとき、ビーカー壁面を十分に洗い、洗液もメスフラスコに加える。)
- 3) 脱イオン水を50mlメスフラスコの標線まで加え、これを原液とする。
- 4) この原液2mlをホールピペットで取り\*注、20mlメスフラスコで10倍に希釈し、これを分析液とする。
- 5) 分析液をマイクロシリンジで500 $\mu$ lとり\*注、クロマトグラフ装置に注入する。
- 6) 移動相を流し始める。(実際には分離を効率良く行うために、KCl濃度を図3に示すように徐々に増加させている。)
- 7) 分析は約30分間で終了するが、次の分析まで約20分間固定相を最初の移動相で洗浄する。

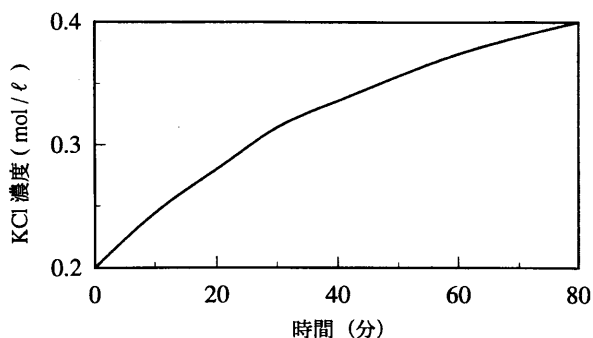


図3 移動相濃度の時間変化

< \*注 >

4) 原液をホールピペットで取るとき、5) 分析液をマイクロシリンジで取るとき、はその溶液で2～3回器具を洗浄する。これは器具内に残留している水などにより溶液の濃度が変化してしまうのを防ぐためである。

### 【結果】

P<sub>1</sub>～P<sub>4</sub>の等モル混合物のクロマトグラムを図4に示す。P<sub>1</sub>～P<sub>4</sub>がきれいに分離されている。また、ピークの面積比はおおよそ1:2:3:4となっており、含まれているリンの量に対応していることが分かる。

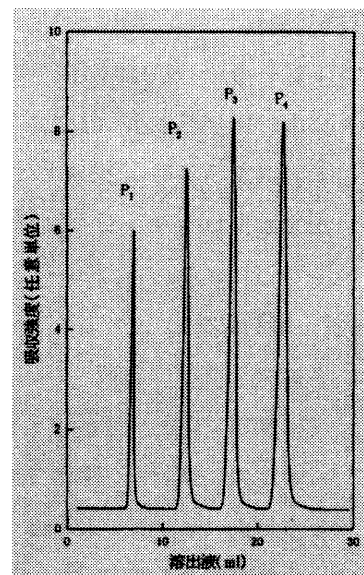


図4 P<sub>1</sub>～P<sub>4</sub>のクロマトグラム

## 2. 吸光光度法による市販炭酸飲料水中のリン酸塩の定量<sup>5)</sup>

### 【目的】

市販の炭酸飲料水中に含まれているリン酸イオンの量を、発色試薬 (Mo(V)-Mo(VI)試薬) を用いて吸光光度法により調べる。

### 【吸光光度法】<sup>6)</sup>

吸光光度法とは、試料溶液に吸収された光の割合を測定することにより、その溶液に含まれる化学物質を定量する方法である。原理は非常に簡単であるが、クロマトグラフィーの検出器として利用(実験1)されるなど応用範囲が非常に広い方法である。

入射光強度 $I_0$ の光(波長 $\lambda$ )が厚さ $b$ (cm)の溶液中を通過したとき、透過光強度を $I$ とすれば、透過度 $T$ (Transmittance)と吸光度 $A$ (Absorbance)は次のように定義される。

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2)$$

ランベルト・ベールの法則によると、 $I_0$ と $I$ の間には、

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon bc \quad (3)$$

なる関係がある。ここで、 $\epsilon$ はモル吸光係数( $\ell/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ )、 $c$ は濃度( $\text{mol}/\ell$ )である。(2)、(3)より、

$$A = \epsilon bc \quad (4)$$

となるので、濃度 $c$ は吸光度 $A$ に比例することが分かる。このことから、予め濃度既知の標準溶液を用いて濃度と吸光度の関係(検量線)を求めておけば、未知試料中の濃度を吸光度から知ることができ(図5)。

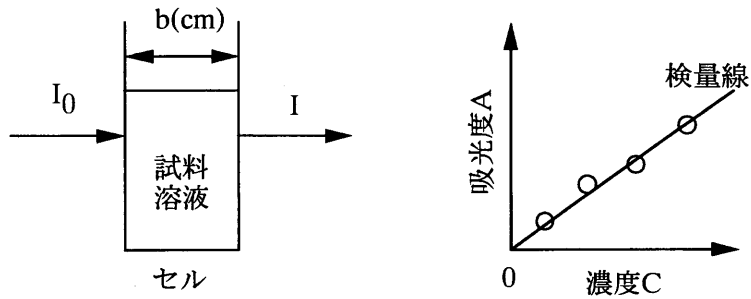


図5 光吸収の法則

可視光領域に吸収を持たない（無色透明な）溶液の場合には、調べたい化学物質と定量的に反応して発色するような試薬（発色試薬）を用いる。リン酸溶液も無色なので、ここではMo(V)-Mo(VI)試薬を用いて錯体を作り青色に発色（最大吸収波長830nm）させて定量する。

### 【試薬】

- ①リン酸二水素一カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- ②蒸留水
- ③発色試薬：Mo(V)-Mo(VI)試薬
- ④炭酸飲料水（市販品）

### 【器具】

- ①ホールピペット（1, 5, 10, 15, 20ml×1）
- ②メスフラスコ（25ml×6, 250ml×1）
- ③ビーカー（30ml×1）
- ④セラミック付金網，三脚，バーナー
- ⑤湯浴

### 【装置】

分光光度計（基本構成を図6に示す。）

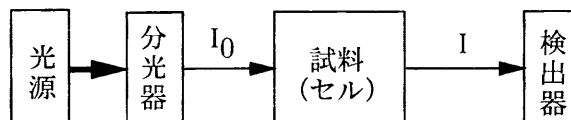


図6 分光光度計の基本構成

【実験】（受講生は④から行う）

#### 検量線用リン酸塩標準溶液の調製

- ① リン酸二水素一カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，分子量136) の439mgを正確に秤りとり，ビーカー中で適量の蒸留水に溶解させる。

- ② この溶液を1 l のメスフラスコに完全に移し、標線まで希釈する。
- ③ この溶液を正確に100倍に希釈し、これを標準溶液とする。この溶液は、リンとして1ppm (=  $\mu\text{g/ml}$ ) の溶液である。

#### 検量線の作成

- ④  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 標準溶液の0 (ブランク)、5、10、15、20mlをホールピペットで量りとり、それぞれ25mlのメスフラスコに入れる。
- ⑤ 各メスフラスコにMo(V)-Mo(VI)試薬1 mlを加える。
- ⑥ 標線近くまで蒸留水を入れる。
- ⑦ 100℃の湯浴上で約40分間加熱して発色させる。
- ⑧ メスフラスコを冷却後、蒸留水で標線まで希釈する。
- ⑨ 波長830nmにおける吸光度を測定する。
- ⑩ リンの濃度と吸光度との関係をグラフ用紙にプロットする。

#### 炭酸飲料水の分析

- ⑪ 30mlのビーカーに市販の炭酸飲料水20mlを取る。
- ⑫ 液量が5mlくらいになるまでセラミック付き金網上で穏やかに加熱する。
- ⑬ この液を250mlのメスフラスコに移す。この時ビーカーを蒸留水でよく洗い、洗液もメスフラスコに移し、炭酸飲料水がビーカーに残らないようにする。
- ⑭ 蒸留水でメスフラスコの標線まで希釈する。
- ⑮ この溶液1mlをホールピペットで25mlのメスフラスコに移す。
- ⑯ 上記⑤～⑨の手順を繰り返す。
- ⑰ 検量線から炭酸飲料水中に含まれているリン濃度を計算する。

#### 【結果】

検量線作成用標準溶液、および市販の炭酸飲料水について、吸光度法により測定した結果を表1にまとめて示した。作成した検量線は図7の通りであり、この検量線から炭酸飲料水中のリンの濃度を求めてやると、約 $13\mu\text{g}/25\text{ml}$ となった。

飲料水は試料調製段階で12.5倍に希釈されているので、最初の飲料水中に含まれていたリン濃度は約160ppm ( $\text{PO}_4^{3-}$ としてはその $\text{PO}_4^{3-}/\text{P}=95/31$ 倍なので、490ppm) ということになる。

表1 吸光度測定結果

リン濃度 ( $\mu\text{g}/25\text{ml}$ )	透過度	吸光度
0	0.930	0.032
5	0.620	0.208
10	0.420	0.377
15	0.285	0.545
20	0.190	0.721
? (炭酸飲料水)	0.330	0.481

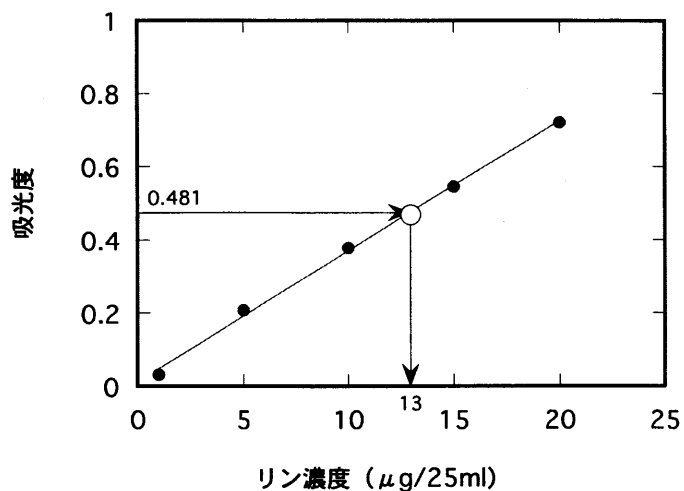


図7 リンの検量線

<注意>

・廃液はモリブデンなどの有害物質を含んでいるので、決して流しに流してはいけません。廃液は全て回収する。

文 献

- 1) “実験化学講座15分析”，鈴木信男他編，丸善（1991）。
- 2) “比色分析”，山本勇麓，共立出版（1975）。
- 3) I. Hosokawa and F. Oshima, *Water Research*, **7**, 283 (1973).
- 4) G. Kura, *J. Chromatogr.*, **447**, 91 (1988).
- 5) 松本和子，酒井健，現代化学，55（1990）。
- 6) “機器分析（基礎化学選書7）”，田中誠之，飯田芳男，裳華房（1985）。