

吸光度測定FIAにおけるL-アスコルビン酸の 反応試薬としてのチオシアン酸鉄(III)錯イオンの利用

赤羽麻美, 三浦恭之

〒 259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

東海大学 理学部 化学科

E-mail: ymiura1@tsc.u-tokai.ac.jp

(2012 年 9 月 21 日受付 ; 2012 年 10 月 4 日受理)

Iron (III) thiocyanate complex as a reaction reagent of L-ascorbic acid on flow-injection analysis with photometric detection

by

Mami AKABANE and Yasuyuki MIURA

Department of Chemistry

School of Science, Tokai University

Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan

E-mail: ymiura1@tsc.u-tokai.ac.jp

(Received on Sept. 21, 2012; accepted on Oct. 4, 2012)

Abstract

The difficulty of determination of L-ascorbic acid comes from its instability: it is susceptible the air-oxidation to form dihydroascorbic acid. A rapid and sensitive method has been developed for determination of L-ascorbic acid, using a reaction mixture of 0.4 mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ –1 mM KSCN–20 mM HClO_4 . The proposed FIA method is attributed to the reduction of iron (III) thiocyanate complex in an excess amount with L-ascorbic acid and then absorbance of the residual complex is measured at 460 nm. Therefore, detector response obtained for L-ascorbic acid shows negative peak, based on the decrease in an absorbance of the complex from background. Calibration graphs, plotted as the peak-height versus concentration, gave straight lines up to 1.0×10^{-4} M at 0.005 AUFS and 3.5×10^{-5} M at 0.002 AUFS. For 11 replicates for a 50- μL of 7×10^{-5} M L-ascorbic acid, this method gave a mean value of 6.98×10^{-5} M with a standard deviation of 2.10×10^{-7} M and relative standard deviation of 0.3%. Detection limit as $S/N=3$ was 1.2×10^{-6} M for

L-ascorbic acid. The proposed FIA method was successfully applied to the determination of L-ascorbic acid in soft drink samples.

1 諸言

フローインジェクション分析 (FIA) 法は, 試料の量が数 10~数 100 μl というように少量で分析が可能で, また検出反応では必ずしも完結しなくても再現性の良い測定が可能であるといった長所を有している. L-アスコルビン酸の定量法には多くの方法が報告されている [1] が, その中での FIA 法の検出は吸光度測定に基づく方法が多い. これらの方法では L-アスコルビン酸の反応試薬として鉄 (III) イオンと 1,10-フェナントロリン [2, 3], 鉄 (III) イオンと Tris(oxalate)cobaltate(III) [4], よう素とでんぷん [5], 鉄 (III) イオンと 2-Oximinocyclohexanone thiosemicarbazone [6], 鉄 (III)-cetylpyridinium chloride [7], シュウ酸塩とニクロム酸カリウム-ヨウ化カリウム/ローダミン 6G [8], 鉄 (III) イオンと *p*-Carboxyphenylflorone [9] などが報告されており, 食品 [3, 5], 医薬品 [6, 8, 9], 血清 [7] の分析に応用されてきた. 吸光度を検出する方法では一般的に試料中に濁りがある場合はその濁りを除去すること, あるいは着色している試料ではその着色成分を除去するか着色による光吸収を示さない波長を選択する必要がある. 著者の一人 (三浦) らは懸濁および有色の清涼飲料水に対して濁りや着色による影響の補正方法を見出し, よう素との反応を利用する L-アスコルビン酸の吸光度測定 FIA 法を報告した [10]. ここで使用した反応液のよう素溶液 (1×10^{-3} M) には多量 (0.1 M) のよう化物イオンが共存しているため, 調製後長時間使用するとよう化物イオンが空気酸化されてよう素を生成し吸光度が変化するという問題があった. 他方, L-アスコルビン酸は鉄 (III) イオンを鉄 (II) イオンにまで容易に還元することから, チオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの赤色が退色すると考えられる. また, この錯イオンは酸性溶液中で褐色の容器中で保存すればかなり安定な錯イオンである. このことから, L-アスコルビン酸の反応液にチオシアン酸鉄 (III) 錯イオンを使用してその赤色の吸光度をモニターすれば, 吸光度の減少から L-アスコルビン酸を分析することが可能であると期待できる. 本研究では, チオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの過塩素酸溶液を使用する L-アスコルビン酸の FIA 法を検討した. ここで使用した反応液の 0.4 mM 硝酸鉄 (III)-1 mM チオシアン酸カリウム-20 mM 過塩素酸混合液は調製して褐色の試薬ビンに保存したとき, 調製後 3 日間までは使用できることが分かった. このことからチオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの過塩素酸溶液は吸光度測定に基づく L-アスコルビン酸の FIA 法において良好な検出試薬であることが分かった.

2 実験

2.1 試薬

水は水道水を 2 回蒸留し, さらに日本ミリポア社製の MilliQ-Labo 純水製造装置のイオン交換カラムを通してから使用した. 試薬は市販の特級品を精製せずにそのまま使用した.

よう素酸カリウム標準溶液: よう素酸カリウム (和光純薬工業株式会社製特級試薬 KIO_3 : MW 214.001, 純度 99.97 %) を 105~110°C で 2 時間乾燥してシリカゲルが入っているデシケータ中で室温まで放冷した. そのよう素酸カリウム 3.5748 g (計算量 3.5677 g) を秤とって水に溶かし, 水で 1001.99 mL (計算量 1000 mL) に希釈して 0.1 N ($f = 1.000$) よう素酸カリウム標準溶液を調製した.

チオ硫酸ナトリウム標準溶液: チオ硫酸ナトリウム五水和物 (和光純薬工業株式会社製特級試薬 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: MW 248.18, 純度 99.0 %) 250 g を沸騰冷却水 (水道水を 2 回蒸留し, その後 20 分間沸騰して室温まで冷却して溶存酸素を除去した水) に溶かし, 10 L に希釈して約 0.1 M チオ硫酸ナトリウム溶液

吸光度測定 FIA における L-アスコルビン酸の反応試薬としてのチオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの利用を調製した (これには安定剤として炭酸ナトリウム 1 g を溶かした)。この溶液は調製後 1 週間以上放置したのちによろ素滴定法により標定し [11], よろ素滴定による L-アスコルビン酸溶液の標定にも用いた。

L-アスコルビン酸溶液: L-アスコルビン酸 (和光純薬工業株式会社製特級試薬 $C_6H_8O_6$: MW 176.13, 純度 99.0%) 1.78 g を 200 mL に沸騰冷却水に希釈して 0.05 M 溶液を調製した。この溶液は実験を行うときによろ素滴定法で標定し [11], 沸騰冷却水で適宜希釈した。 5×10^{-4} M L-アスコルビン酸溶液の調製には, L-アスコルビン酸の安定化のために酢酸を加え, その濃度が 0.01 M になるように調節した。0.01 M 酢酸媒質の L-アスコルビン酸溶液は調製後少なくとも 2 時間は安定であった。

酢酸: 酢酸 (和光純薬工業株式会社製特級試薬 CH_3COOH : MW 60.05, 純度 99.7%, 密度 1.049) 28.71 mL を水で 500 mL に希釈して 1.0 M 酢酸を調製した。

チオシアン酸カリウム溶液: チオシアン酸カリウム (和光純薬工業株式会社製特級試薬 KSCN: MW 97.18, 純度 99.5%) 9.77 g を水で 1 L に希釈し, 0.1 M 溶液を調製した。実験にはこの溶液を水で適宜希釈して使用した。

過塩素酸溶液: 過塩素酸 (和光純薬工業株式会社 $HClO_4$: MW 100.46, 純度 60%, 密度 1.539) 5.44 mL を水で 500 mL に希釈し 0.1 M 過塩素酸溶液を調製した。

硝酸鉄 (III) - 過塩素酸溶液: 硝酸鉄 (III)・九水和物 (和光純薬工業株式会社製特級試薬 $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$: MW 404.00, 純度 99.0%) 306.06 g を過塩素酸 214.03 mL を含む水に溶かし, 水で 500 mL に希釈することによって 1.5 M 硝酸鉄 (III) - 4 M 過塩素酸混合溶液を調製した。この溶液 2.33 mL をとり, 0.1 M 過塩素酸 6.80 mL を加えて水で 500 mL に希釈して 7 mM 硝酸鉄 (III) - 20 mM 過塩素酸溶液を調製した。0.4 mM 硝酸鉄 (III) - 1 mM チオシアン酸カリウム - 20 mM 過塩素酸の混合液の反応液は 7 mM 硝酸鉄 (III) - 20 mM 過塩素酸溶液 14.29 mL, 0.1 M 過塩素酸 47.14 mL および 1×10^{-2} M チオシアン酸カリウム溶液 25 mL を混合して水で全量を 250 mL にした。

2.2 装置

本実験には, サヌキ工業株式会社製の DMX-2000 型送液ポンプと日立製作所製の LIC-10-U1 型吸光光度検出器 (波長 460 nm) を使用した。測定した吸光度の記録には Pantos 製の U-228 型レコーダーを使用した。チオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの吸収曲線は島津製作所製の UV3200 型自記分光光度計を使用し, 光路長 1.00 cm の石英セルを用いて測定した。

2.3 操作

本実験では, 一つのポンプによって溶液を 2 系統に流すことのできる FIA 分析装置を使用した。その略図と分析条件を Fig. 1 に示す。一方の流路には 0.01 M 酢酸をキャリアーとして使用して毎分 0.3 mL の流量で流し, 試料溶液 50 μ L はインジェクションバルブから注入し, キャリアーの酢酸によってミキシング T に送る。他方の流路には 0.4 mM 硝酸鉄 (III), 1 mM チオシアン酸イオンと 20 mM 過塩素酸の混合溶液を L-アスコルビン酸の反応液に用い, 毎分 0.3 mL の流量でミキシング T に流す。ここでは, L-アスコルビン酸はチオシアン酸鉄 (III) 錯イオン溶液 (反応液) と混合して反応チューブを通して検出器に流した。このとき鉄 (III) イオンが L-アスコルビン酸によって鉄 (II) イオンに還元され, チオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの赤色が退色する。検出器では, この錯イオンの赤色 (極大波長 460 nm) の吸光度を測定するため, L-アスコルビン酸に相当する吸光度の減少が測定されてその応答をレコーダーに記録する。

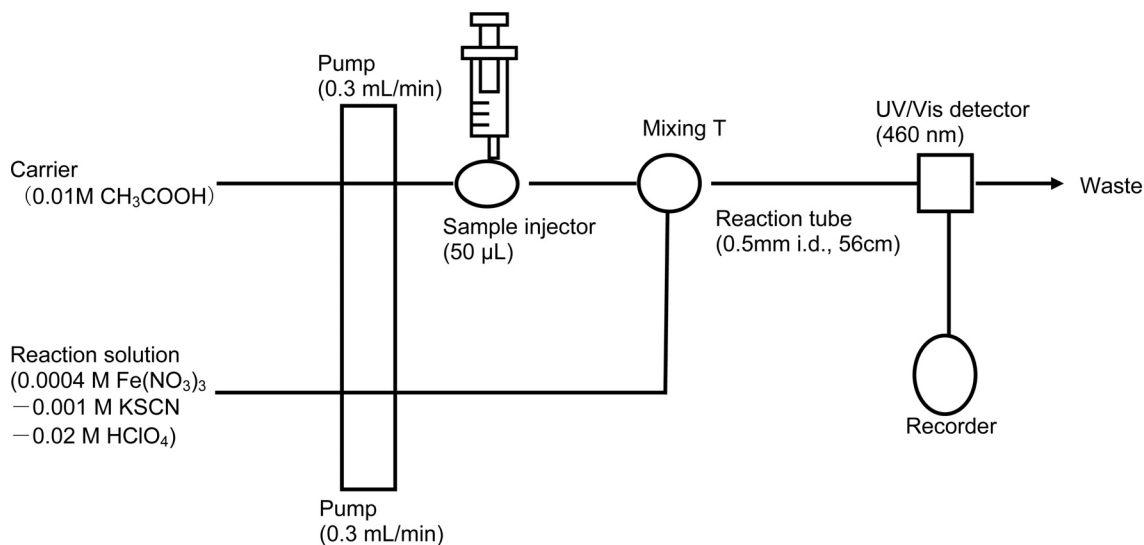


Fig. 1 Schematic diagram of the FIA system and analytical conditions.

3 結果と考察

3.1 検出器応答と検量線

4×10^{-4} M 硝酸鉄 (III), 1×10^{-3} M チオシアン酸イオンと 0.02 M 過塩素酸の混合液中で生成した赤色のチオシアン酸鉄 (III) 錯イオンは波長 460 nm に極大吸収を示すことが知られているため, 2.3 の操作では検出器の波長を 460 nm に設定して検出器応答を測定した. 10^{-5} M レベルの L-アスコルビン酸の試料溶液を使用して検出器応答曲線を測定した. その結果を Fig. 2 に示す. L-アスコルビン酸の濃度が高くなるにしたがって応答曲線は吸光度の減少を示す負方向のシャープなピークを示した. このピークの高さを L-アスコルビン酸の濃度に対してプロットした検量線を Fig. 3 に示す. 検出器の感度を 0.005AUFS (吸光度フルスケール) にして得られた検量線を Fig. 3A に, また 0.002AUFS にして得られた検量線を Fig. 3B に示す. 各検量線はそれぞれ 1.0×10^{-4} M と 3.5×10^{-5} M までの濃度範囲で原点を通る直線を示した. 検出器の感度を 0.005AUFS において, $S/N = 3$ として求めた検出下限値は 1.2×10^{-6} M 程度であった. また検出器の感度を 0.002AUFS にすると応答曲線のピーク高さは高くなるが, ベースラインのノイズも同様に拡大されるため検出下限値の濃度を低くすることはできなかった. また, 0.005AUFS で 7×10^{-5} M L-アスコルビン酸試料溶液を用いて 11 回繰り返しインジェクトしたとき, 得られた L-アスコルビン酸溶液の濃度の平均値は 6.98×10^{-5} M で標準偏差 (SD) は 2.10×10^{-7} M, 相対標準偏差 (RSD) は 0.3% であった. 0.002AUFS で 2×10^{-5} M 濃度を 11 回繰り返し戻したとき, 平均値は 2.01×10^{-5} M で SD = 1.67×10^{-7} M, RSD=0.8 % であった.

3.2 L-アスコルビン酸溶液の安定性

L-アスコルビン酸は濃度が低い水溶液中では容易に空気酸化を受けてディヒドロアスコルビン酸に変るが, 媒質を酸性にすると安定化することを見出した. そこで, 種々の濃度の酢酸媒質 (酸性の媒質) 中での 8×10^{-5} M L-アスコルビン酸の安定性を検討した. その結果, L-アスコルビン酸溶液は酢酸を含まない水媒質中では調製後 30 分間までは安定であったが, 45 分間からはピークの高さに有意の差を生じて分解した. 酢酸媒質中では安定になり, 酢酸の濃度が 0.005 M では 1.5 時間, 0.01 及び 0.05 M 酢

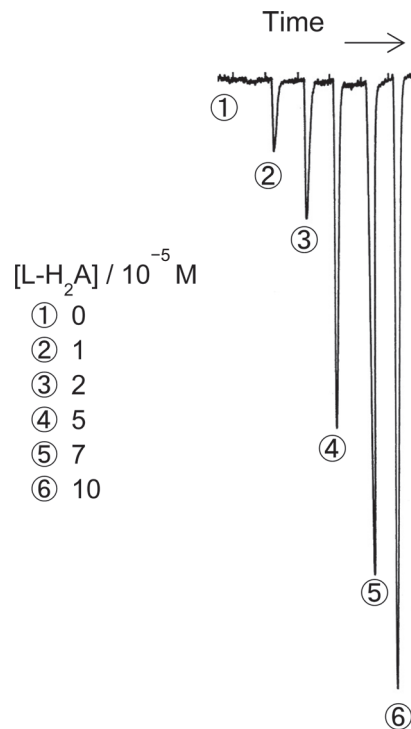


Fig. 2 Detector response for L-ascorbic acid obtained at 0.005AUFS.

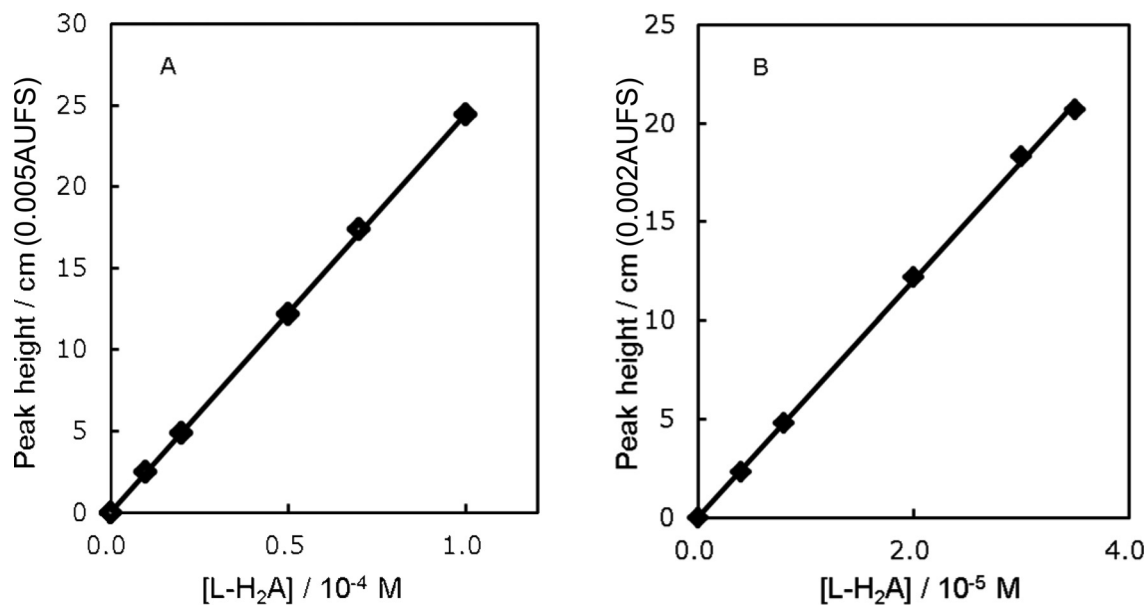


Fig. 3 Calibration plots for L-ascorbic acid.

酸媒質中では2時間まで安定であった。本実験では $10^{-5} M$ レベルの L-アスコルビン酸を調製する際にその媒質として 0.01 M 酢酸媒質を使用することにした。このことからキャリアにも 0.01 M 酢酸を使用することにした。

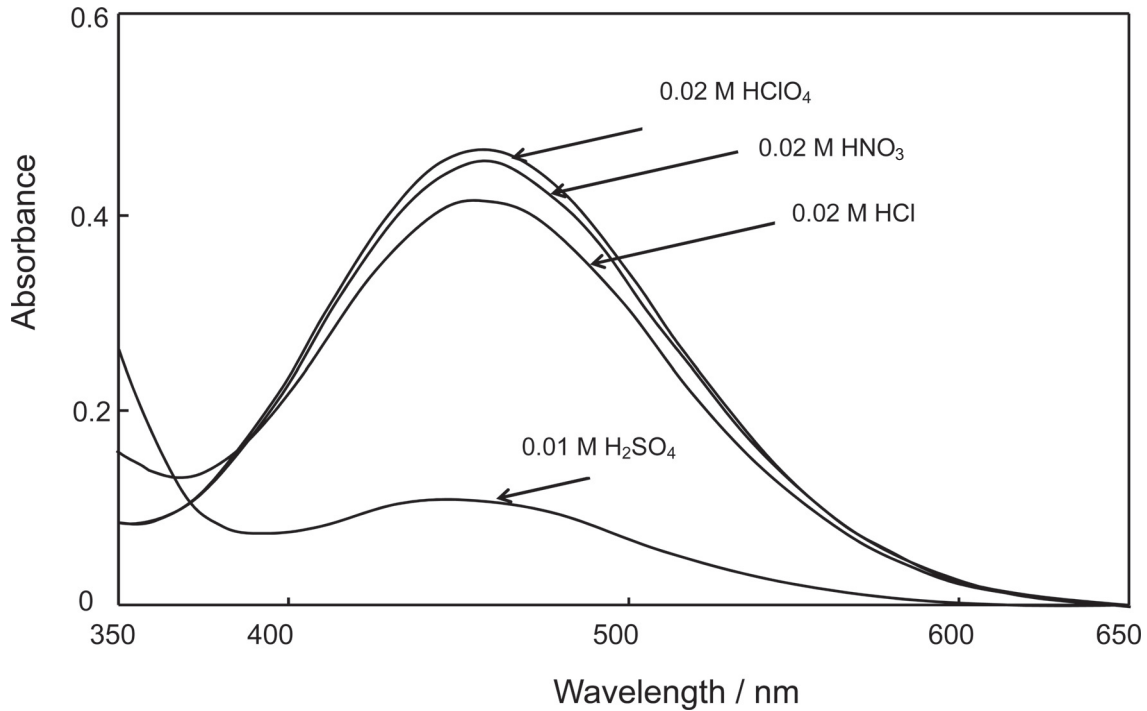


Fig. 4 Absorption spectra for iron (III) thiocyanate complex in media of H_2SO_4 , HCl , HNO_3 and HClO_4 .

3.3 反応溶液の酸の種類の効果

水溶液中の鉄(III)イオンは容易に加水分解するため、反応液は酸性に保つ必要がある。ここでは使用する酸の種類を検討する目的で塩酸、硝酸、硫酸、過塩素酸を使用して反応液を調製した。酸の濃度としては水素イオン濃度として0.02 Mに調節して実験した。その結果、 0.4×10^{-3} M Fe(III) 、 1×10^{-3} M SCN^- と0.02 M H^+ を含む反応液の吸収曲線はいずれも波長460 nmに吸収極大を示し、極大波長での吸光度は媒質として硫酸、塩酸、硝酸、過塩素酸の順に高くなった (Fig. 4)。硫酸の使用では吸光度が低くなったが、これは硫酸イオンが鉄(III)イオンに配位し、チオシアン酸鉄(III)錯イオンの生成を妨害するためと考えられる。また、これらの反応溶液を使用して得られたL-アスコルビン酸の検量線をFig. 5に示す。各検量線は原点を通る直線でL-アスコルビン酸の濃度に比例したが、過塩素酸を使用した検量線が最も高い感度を示した。このことから反応液の媒質には過塩素酸を使用することにした。

次は、反応液中の過塩素酸の濃度の効果を検討した。ここでは種々の濃度の過塩素酸を含む 0.4×10^{-3} M Fe(III) - 1×10^{-3} M SCN^- 溶液を使用し、 7×10^{-5} M L-アスコルビン酸のピーク高を測定した。その結果、過塩素酸の濃度を0.01~0.025 Mに調節したときピークの高さは最も高く、ほとんど同じピーク高さを示した。このことから、反応液中の過塩素酸の濃度を0.02 Mとすることにした。

3.4 反応液中のFe(III)イオンとチオシアン酸イオンの濃度の効果

予備実験において反応液中のFe(III)イオンの濃度を高くするとL-アスコルビン酸のピーク高さが高くなることが分かった。ここでは、 0.1×10^{-3} M~ 0.5×10^{-3} M Fe(III) イオンを含む 1×10^{-3} M チオシアン酸イオン - 0.02 M 過塩素酸の混合溶液を反応液に使用してL-アスコルビン酸のピーク高さを測定した。その結果をFig. 6に示す。Fe(III)イオンが 0.1×10^{-3} Mの反応液を使用したときはL-アスコルビン酸のピーク高さが低く、検量線は上に凸にわずかに曲がった。 0.2×10^{-3} Mでは直線の検量線が得られ、 0.3×10^{-3} M~ 0.5×10^{-3} M Fe(III) の反応液を使用した時は感度が高く直線で同一な検量線が

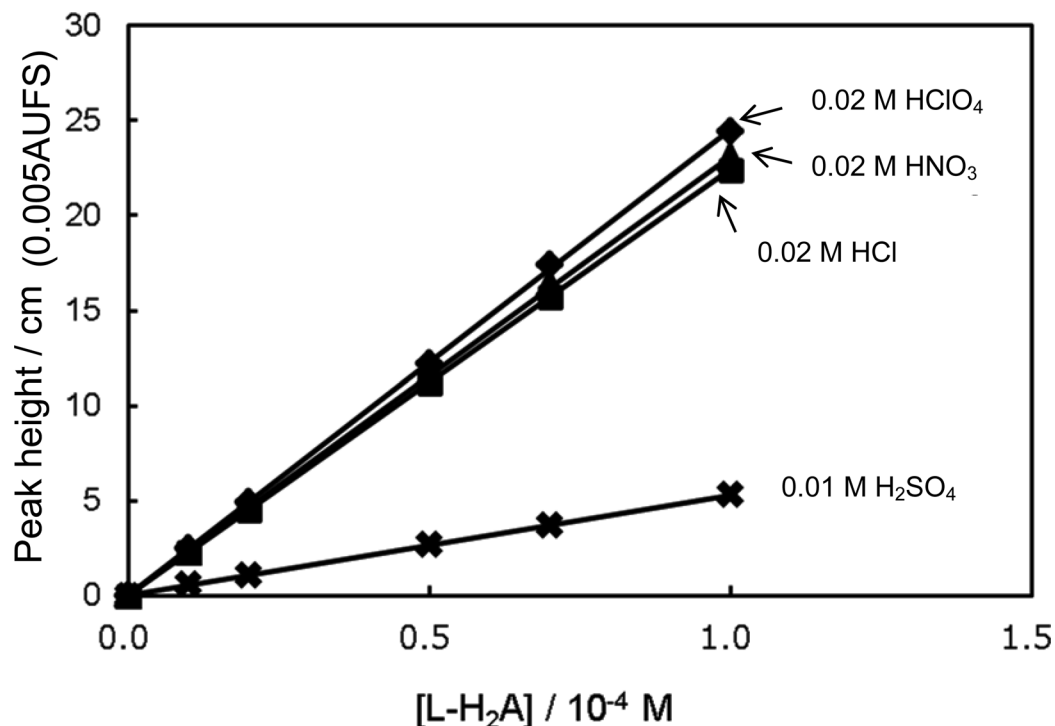


Fig. 5 Effect of H₂SO₄, HCl, HNO₃ and HClO₄ as media in reaction solution of iron (III) thiocyanate complex on peak-height for L-ascorbic acid.

[Fe(III)] and [SCN⁻] in the reaction solution were prepared to be 0.4 mM and 1.0 mM, respectively.

得られた。このことから本実験では Fe(III) イオンの濃度を 0.4×10^{-3} M に調節することにした。次は Fe(III) イオンの濃度を 0.4×10^{-3} M にしてチオシアン酸イオンの濃度の効果を検討した。チオシアン酸イオンの濃度を高くすると L-アスコルビン酸に対する検出器応答ピーク高さは当然高くなるが、同時に試薬ブランクの吸光度も高くなると考えられる。そこで、L-アスコルビン酸の検出感度は高くてベースラインのノイズができるだけ小さくなるチオシアン酸イオンの濃度を求める目的で実験した。 0.4×10^{-3} M Fe(III) - 0.02 M 過塩素酸の溶液に種々の濃度の SCN⁻ を加えた反応溶液を用いた結果を Figs. 7 と 8 に示す。チオシアン酸イオンの濃度を高くすると L-アスコルビン酸のピーク高さは高くなった (Fig. 7) が、ベースラインのノイズも増大させた (Fig. 8)。このことから、本実験では 1×10^{-3} M チオシアン酸イオンを含む 0.4×10^{-3} M Fe(III) - 0.02 M HClO₄ 溶液を反応液に使用した。また、L-アスコルビン酸の濃度が低い試料の分析には感度が高くなるように高濃度のチオシアン酸イオンを含む反応液を使用し、L-アスコルビン酸の濃度が高い試料の分析には感度が低くなるように低濃度のチオシアン酸イオンを含む反応液を使用することが可能であることも分かった。

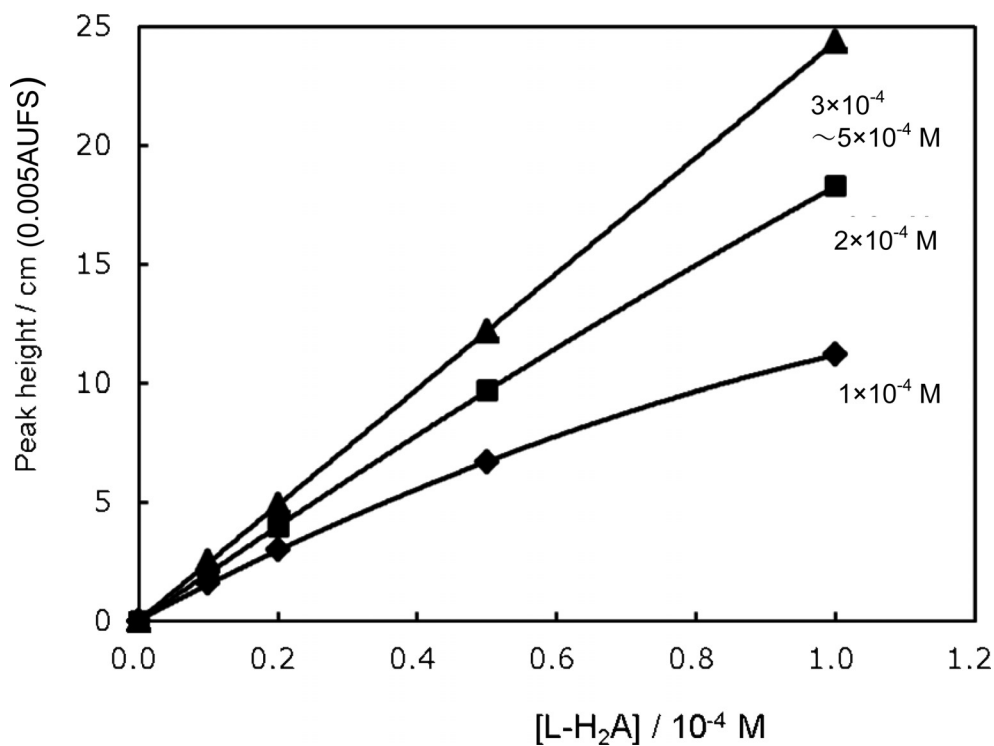


Fig. 6 Effect of concentration of iron (III) in the reaction solution on peak-height for L-ascorbic acid.

[SCN⁻] and [HClO₄] in the reaction solution were prepared to be 1.0 mM and 20 mM, respectively.

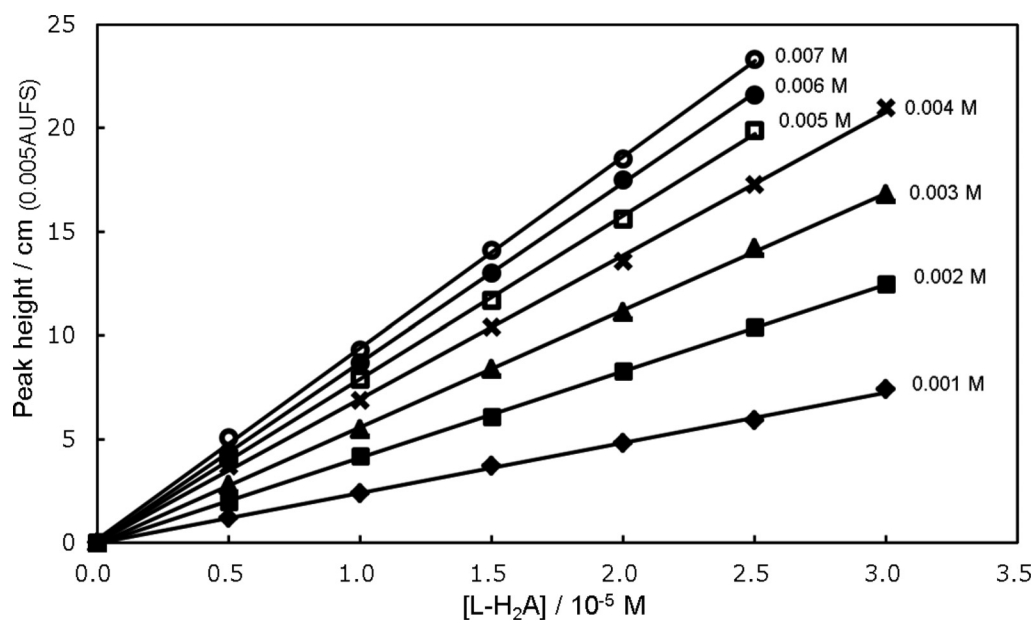


Fig. 7 Effect of concentration of thiocyanate in the reaction solution on peak-height for L-ascorbic acid.

[Fe(III)] and [HClO₄] in the reaction solution were prepared to be 0.4 mM and 20 mM, respectively.

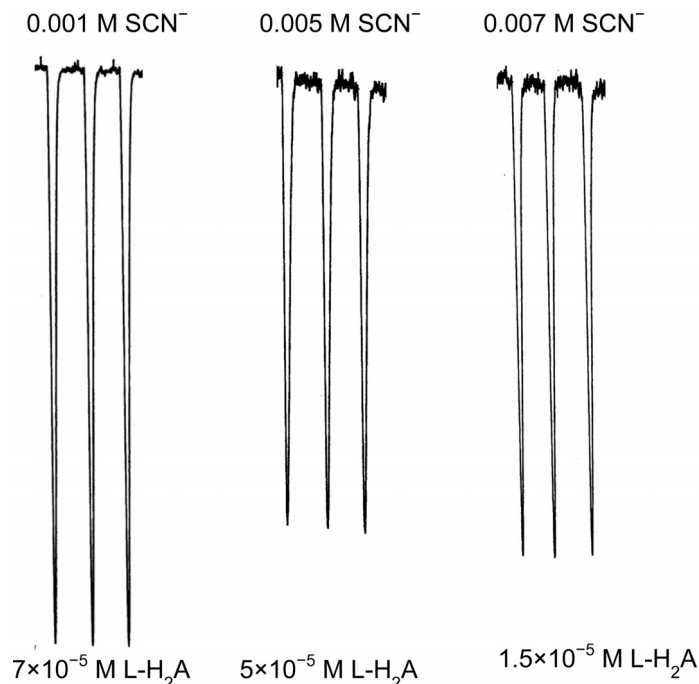


Fig. 8 Effect of concentration of thiocyanate in the reaction solution on detection limit of L-ascorbic acid.

[Fe(III)] and [HClO₄] in the reaction solution were prepared to be 0.4 mM and 20 mM, respectively.

3.5 共存イオンの影響

2.3 の操作にしたがって L-アスコルビン酸を分析するときの共存イオンの影響を検討した。Table 1 に 5×10^{-5} M L-アスコルビン酸を定量する際に 3% 以下の誤差を示した共存物質の共存許容量を示す。ヨウ化物イオン、硫酸イオン、フッ化物イオン、リン酸イオン、マレイン酸イオン、リンゴ酸イオン、酒石酸イオン、マロン酸イオンなどは L-アスコルビン酸と同程度の共存でも妨害を示したが、一般的な陽イオン、硝酸イオン、塩化物イオン、シアン化物イオン、炭酸水素イオン、糖類などは妨害しなかった。

3.6 硫酸イオンの妨害除去

Table 1 に示す物質の中で妨害の程度が大きく、食品や環境中に広く存在する硫酸イオンの妨害除去を検討した。ここでは、硫酸イオンを硫酸バリウムとして沈殿させ、それをディスクフィルター（孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 、ディスクの直径 25mm）でろ過して除去することにし、まず 25 mL のメスフラスコに 3×10^{-3} M 硝酸バリウム 10 mL をとり、 1×10^{-3} M 硫酸イオンを含む試薬ブランクおよび 5×10^{-5} M L-アスコルビン酸試料溶液をそれぞれ 10 mL を加えて一定時間放置（10 分間）した。生成した硫酸バリウムの沈殿を、ディスクフィルターを通してろ過してから FIA 装置にインジェクトした。その結果を Fig. 9 に示す。試薬ブランク（硫酸イオン）のピーク高さは放置時間 5 分間からほとんどピークが出なくなり、硫酸イオンはほとんど完全に硫酸バリウムとして除去されることが分かった（Fig. 9 の▲）。また 1×10^{-3} M 硫酸イオンを含む 5×10^{-5} M L-アスコルビン酸試料溶液のピーク高さ（Fig. 9 の●）は、放置時間 5～50 分間の間で硫酸イオンを含まない 5×10^{-5} M L-アスコルビン酸試料溶液のピーク高さ（Fig. 9 の■）に一致した。このことは 5～50 分間の放置時間内で硫酸イオンはほとんど完全に除去でき、L-アスコルビン酸は安定に存在することが分かった。また、 1×10^{-3} M 硫酸イオンの除去に対して

放置時間を 10 分間としたとき, 硝酸バリウムの濃度は Table 2 に示すように硫酸バリウム溶液の濃度が 2.0×10^{-3} M $\sim$ 3.4×10^{-3} M の濃度範囲内のとき, 硫酸イオンピークがほとんどなくなり, 除去されることが分かった. また, 硫酸イオンが共存したときの L-アスコルビン酸を定量した結果を Table 3 に示す. 以上のことから, 硫酸イオンを硫酸バリウムの沈殿としてディスクフィルターでろ過することにより, 硫酸イオン共存時の L-アスコルビン酸を良好に定量できることが分かった.

Table 1 Effect of foreign substances on determination of 5×10^{-5} M L-ascorbic acid

Added ^a	Substances
1×10^{-3} M	Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , NO_3^- , galactose, sucrose, lactose, glucose, fructose, inositol, nicotinic acid
5×10^{-4} M	Mn^{2+} , Cl^- , CN^- , formic acid, propionic acid, butyrate, succinic acid
1×10^{-4} M	Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Br^- , borate(as BO_3^{3-}), HCO_3^- , HAsO_4^{2-} , lactic acid, pantothenate, glycine, caffeine
5×10^{-5} M	maleate
1×10^{-5} M	malic acid
5×10^{-6} M	I^- , SO_4^{2-} , tartaric acid, malonic acid

^a These are the concentration tolerated for determination of L-ascorbic acid (5×10^{-5} M) with an error of below 3%.

Table 2 Effect of concentration of barium ion on precipitation of barium sulfate.

$[\text{Ba}^{2+}] / \text{M}^{\text{a}}$	Peak height for 1×10^{-3} M $\text{SO}_4^{2-} / \text{cm}^{\text{b}}$
0	16.0
1.0×10^{-3} M	2.2
1.2×10^{-3} M	0.2
1.5×10^{-3} M	0.2
1.7×10^{-3} M	0.2

a, 10 mL of barium nitrate solutions in various concentration were used.

b, Peak height was obtained at 0.005 AUFS.

Table 3 Determination of L-ascorbic acid in the presence of sulfate in various amounts

[L-H ₂ A] / 10 ⁻⁵ M	[SO ₄ ²⁻] / 10 ⁻³ M	Found / 10 ⁻⁵ M	Error, %
0.00	0	0.00	—
0.00	1.00	0.02	—
2.00	0	1.99	-0.5
2.00	1.00	1.88	-0.6
5.00	0	4.99	-0.2
5.00	1.00	4.87	-2.6
7.00	0	7.01	0.2
7.00	1.00	6.79	-4.4

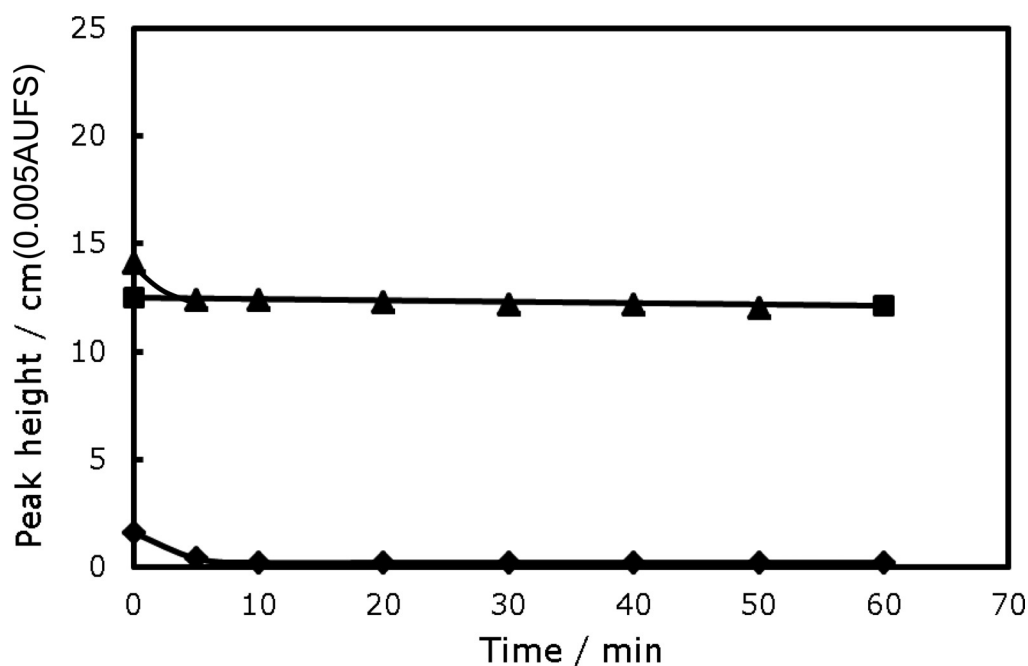


Fig. 9 Removal of sulfate ion as barium sulfate.

Procedure of removal of sulfate ion ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) was given as follows. Ten mL of $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ and 10 mL of sample solution of L-ascorbic acid with or without sulfate ion were placed into 25 mL volumetric flask, and the mixture was allowed to stand for various time to precipitate BaSO_4 , then injected to FIA system through a disk filter (pore size $0.45 \mu\text{m}$, 25 mm D.I.). ■, peak-height for $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ L-ascorbic acid without sulfate when the procedure for removal of sulfate ion was not carried out; ▲, peak-height for $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ L-ascorbic acid with sulfate ion ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) according to the procedure for removal of sulfate ion; ◆, peak-height for reagent blank with sulfate ion ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) according to the procedure for removal of sulfate ion.

Table 4 Analysis of L-ascorbic acid in soft drink samples

Samples	The proposed method		The previous method ^a
	Found (mol/L)	Original sample (mol/L)	Original sample (mol/L)
A	9.00×10^{-5b}	2.25×10^{-2}	2.15×10^{-2}
B	6.70×10^{-5b}	1.69×10^{-3}	1.56×10^{-3}
C	4.67×10^{-5c}	2.30×10^{-2}	2.23×10^{-2}

a, The FIA method using iodine as a reaction reagent.

b, Obtained for the original samples A and B diluted 250-fold.

c, Obtained for the original sample C diluted 500-fold.

3.7 清涼飲料水中の L-アスコルビン酸の分析

本法によって 3 種の有色の清涼飲料水中の L-アスコルビン酸を分析し, 既法のような素を反応液に用いる FIA 法 [10] による分析結果と比較した. その結果を Table 4 に示す. 本法による L-アスコルビン酸の分析結果は既法による結果と実験誤差内で一致した. このことから本法は既法と同様に L-アスコルビン酸の良好な定量法であることが分かった.

4 結言

L-アスコルビン酸は反応液中の鉄 (III) イオンを鉄 (II) イオンに還元するため, チオシアン酸鉄 (III) 錯イオンの赤色が退色する. そのため L-アスコルビン酸の FIA においてチオシアン酸鉄 (III) 錯イオンを分析試薬として使用することによって良好に分析できることが分かった. 反応溶液には 0.4×10^{-3} M 硝酸鉄 (III) - 1×10^{-3} M チオシアン酸カリウム - 0.02 M 過塩素酸の混合液を使用することができ, この溶液は褐色のガラス製試薬ビンに保存した時, 調製後 3 日間までは使用できることが分かった. 本法での L-アスコルビン酸に対する検出器応答は吸光度の減少としてバックグラウンドからの負のピークとして現れた. ピークの高さ (負のピークの減少度) を濃度に対してプロットした検量線は原点を通り, 検出器の感度を 0.005 AUFS にしたとき 1.0×10^{-4} M まで, 0.002 AUFS にしたとき 3.5×10^{-5} M まで直線を示した. $S/N = 3$ として求めた検出下限値は 1.2×10^{-6} M 程度であった. 0.005 AUFS で 7×10^{-5} M L-アスコルビン酸溶液を用いて 11 回繰り返しインジェクトしたとき, 得られた L-アスコルビン酸の濃度の平均値は 6.98×10^{-5} M で標準偏差 (SD) は 2.10×10^{-7} M, 相対標準偏差 (RSD) は 0.3% であった. 0.002 AUFS で 2×10^{-5} M 濃度を 11 回繰り返ししたとき, 平均値は 2.01×10^{-5} M で $SD = 1.67 \times 10^{-7}$ M, $RSD = 0.8\%$ であった. 食品や環境中に広く存在すると思われる硫酸イオンの妨害除去を検討した結果, 硫酸イオンは硫酸バリウムとして沈殿させ, それをディスクフィルター (孔径 $0.45 \mu\text{m}$, ディスクの直径 25 mm) でろ過することで硫酸イオンを良好に除去することができた. 本法によって 3 種の有色の清涼飲料水中の L-アスコルビン酸を分析し, その結果を既法のような素を反応液に用いる FIA 法 [10] による分析結果と比較したところ, 実験誤差内で一致した.

参考文献

- [1] M. C. Yebra-Biurrun, *Talanta*, **52**, 267 (2000).

- [2] I. Onishi, T. Hara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **37**, 1314 (1964).
- [3] 山根 兵, 小川庸生, 分析化学, **36**, 625 (1987).
- [4] K. Ohashi, T. Sagawa, E. Goto, K. Yamamoto, *Anal. Chim. Acta*, **92**, 209 (1977).
- [5] J. Hernandez-Mendez, A. Alonso Mateos, M. J. Almendral Parra, C. Garcia, *Anal. Chim. Acta*, **184**, 243 (1986).
- [6] T. Salinas, T. Galeano Diaz, *Analyst* [London], **113**, 1657 (1988).
- [7] A. Alexiev, S. Rubio, M. Dyanova, A. Stoyanova, D. Sicilia, D. Perez Bendito, *Anal. Chim. Acta*, **295**, 211 (1994).
- [8] J. Fan, C. Ye, S. Feng, G. Zhang, J. Wang, *Talanta*, **50**, 893 (1999).
- [9] Y. Fujita, I. Mori, T. Yamaguchi, M. Hoshino, Y. Shigemura, M. Shimano, *Anal. Sci.*, **17**, 853 (2001).
- [10] 三浦恭之, 赤木麻衣子, 分析化学, **58**, 73 (2009).
- [11] I. M. Kolthoff, E. B. Sandell, E. J. Meehan, S. Bruckenstein, "Quantitative Chemical Analysis", 4th ed., p.849, Macmillan company, London (1969).