

ポーラログラフ法によるカルシウムの定量

松島由美子

Determination of Calcium by Polarographic Method

by

Y. MATSUSHIMA

緒 言

ポーラログラフ分析は微小電極における試料溶液中の電解現象とくにその加電圧と電解電流の関係を記録し、得られた電流電圧曲線（C—E曲線）より溶液中の物質の定性と定量を行なうことを目的とする。生体組織中の無機質を定量する場合は共存物質が多く、特にほとんどの植物体にはCaとMgが同時に含有されるが、両者のC—E曲線が類似しているため、いずれか一方を定量する場合、他方による阻害作用を除去する必要がある。従来¹⁾ Caの定量に対しては共存するMgの阻害を除くため磷酸塩が添加されているが、その影響について詳細な報告がない。今回著者は磷酸塩添加のCaおよびMgに及ぼす影響を追跡するとともにCa定量の適当な条件を検索し、また本法によって植物組織中のCaの定量を実施した。

実験方法ならびに結果

1 原 理

アルカリ金属、アルカリ土金属のポーラログラフ分析は困難であるため、試料と定量的に反応し、かつ容易に定量できる間接試薬を使用しているが、Caの場合はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)と亜鉛の錯体を用いる方法²⁾が多い。すなわち溶液中のCa²⁺はZnと置換し、遊離したZn²⁺が作動電極から分離した電子によって置換され、Hgと結合してアマルガムを生成する時電解電流が生じる。電流は電解質濃度に比例するため、記録紙上の電解電流の量よりZn²⁺を定量し、その値をもって測定溶液中のCa量とするのである。

2 実験方法

i) 装置ならびに測定条件

作動電極（指示電極）は水銀滴下電極（陰極）を使用し、対極（陽極）に広表面積の水銀電極を使用して、微小作動電極における電極反応を自動記録した。

装置：柳本製ポーラログラフ分析装置P—8を用いた。

測定条件：

sensitivity	100 μ A/mm
damping	6
initial volt	0
span volt	2
scan speed	10 min
chart speed	2 cm/min

capillary No. 5 $t=5$ sec/drop

ii) 試 薬

Ca 定量の試薬は R. Pribil, Z. Roubal らの方法³⁾ に準じて次のように調製した。

基礎液：EDTA-2Na 2.4860g と ZnSO₄·7H₂O 2.043g を少量の蒸留水にとかし，濃アンモニア 534 ml を加え蒸留水で 1 ℓ とする。

$\frac{M}{100}$ —カルシウム標準液：CaCO₃ 1.0009g をできるだけ少量の塩酸にとかし，煮沸して CO₂ を除去し蒸留水で 1 ℓ とする。

0.2%ゼラチン水溶液

磷酸アンモン液：(NH₄)₂HPO₄ 30g を蒸留水にとかして 50ml とする。

$\frac{M}{100}$ —マグネシウム標準液：MgO 0.403g をできるだけ少量の塩酸にとかして，蒸留水で 1 ℓ とする。

iii) 測定法

電解瓶に調整した電解液を入れ，水素ガスを約 5 分間通じて酸素を除き，液中に白金電極と水銀滴下電極を設置し，白金電極端子は陽極に滴下電極端子は陰極に接続する。ポーラログラフ分析装置は上記(i)の測定条件に調製し分析を行ない，得られた C—E 曲線より次の方法⁴⁾ で還元波の高さを求めた。

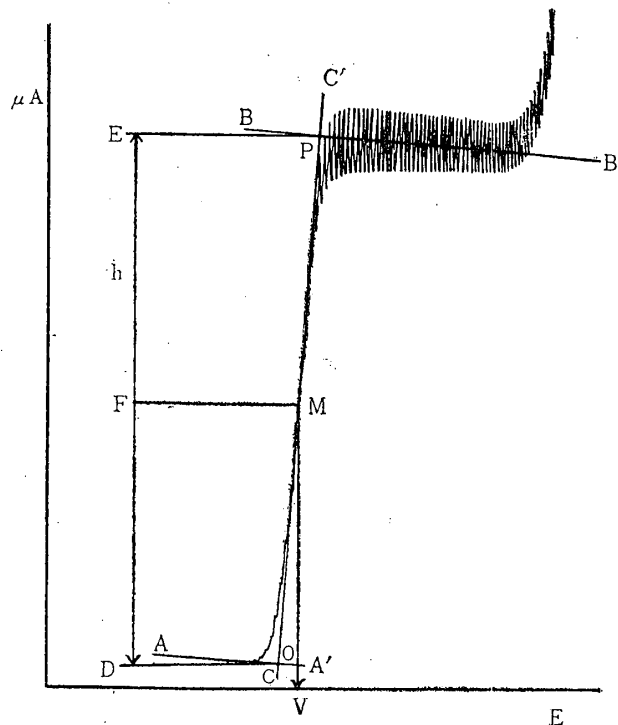


図1 波高及び半波電位の測定法

即ち残余電流部，限界電流部および半波電位付近の直線部ののこぎり歯の中点を結んだ直線 AA', BB', CC' をひき，その交点より水平線 PE, OD をひき，その二直線の距離 h を波高とした。また h の中点 F より水平線をひき，CC' との交点 M より垂直に下した点の電圧 V を半波電位とした。

3 Ca 定量時の Mg の影響と磷酸塩添加の効果

i) Ca の濃度と波高の関係

測定液組成 $\left\{ \begin{array}{l} \text{基礎液: } 5.0\text{ml} \\ 0.2\% \text{ゼラチン水溶液: } 1.0\text{ml} \\ \frac{M}{100} \text{-カルシウム標準液: } 0.05, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5\text{ml} \end{array} \right.$
 全量を蒸溜水で10 mlとする。

上記測定液を、上記(2)の方法によりポーログラフ分析を行ない、得られたC-E曲線(図2に示す)より拡散電流(波高)を求め、Ca濃度と波高の関係を図3の直線aに示した。次に上記の測定液に磷酸アンモン液0.5 ml添加し、0.2%ゼラチン水溶液を0.5 mlとして同様に実験を行った場合のCa濃度と波高の関係を図3の直線bに示した。

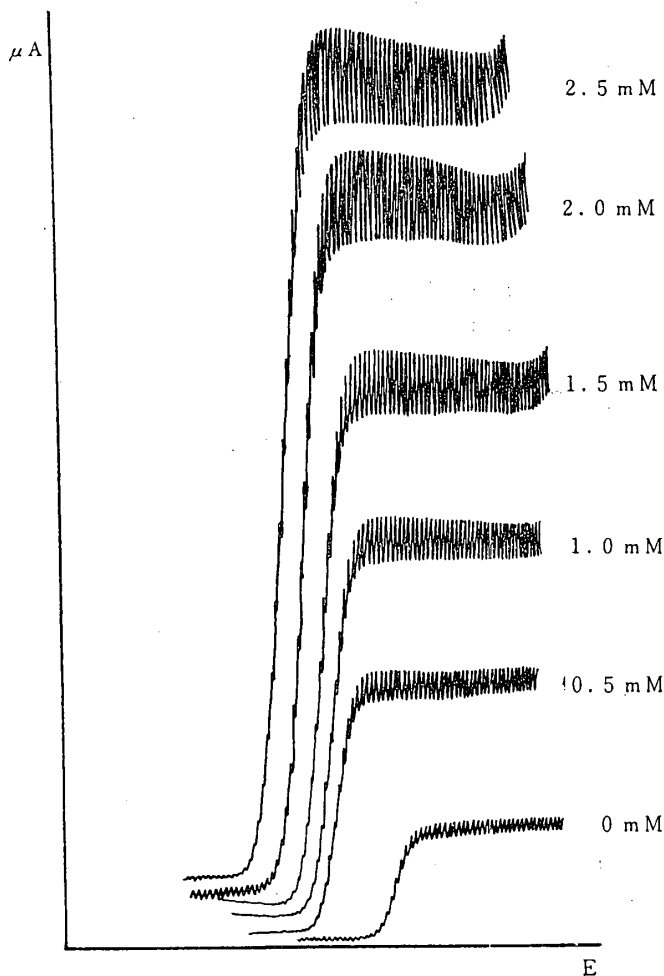


図2 Ca標準液のポーログラム

以上の実験結果よりCa濃度と波高は直線的比例関係を示すが、磷酸塩の添加によりCaの波高は減少の傾向を示し、またCa濃度の増加とともに波高の減少度も増大することを認めた。

ii) Mg濃度と波高の関係

Mgをポーログラフ法で定量した文献はほとんど見当たらないが、Mgの濃度と波高がどのような関係を示すかをみるため上記(2)の方法により両者の関係をしらべた。測定液の組成は下記のとおりであり、Mg濃度と波高の関係は図4のaに示した。

測定液組成 $\left\{ \begin{array}{l} \text{基礎液: } 5.0\text{ml} \\ 0.2\% \text{ゼラチン水溶液: } 1.0\text{ml} \\ \frac{M}{100} \text{-マグネシウム標準液: } 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5\text{ml} \end{array} \right.$
 全量を蒸溜水で10 mlとする。

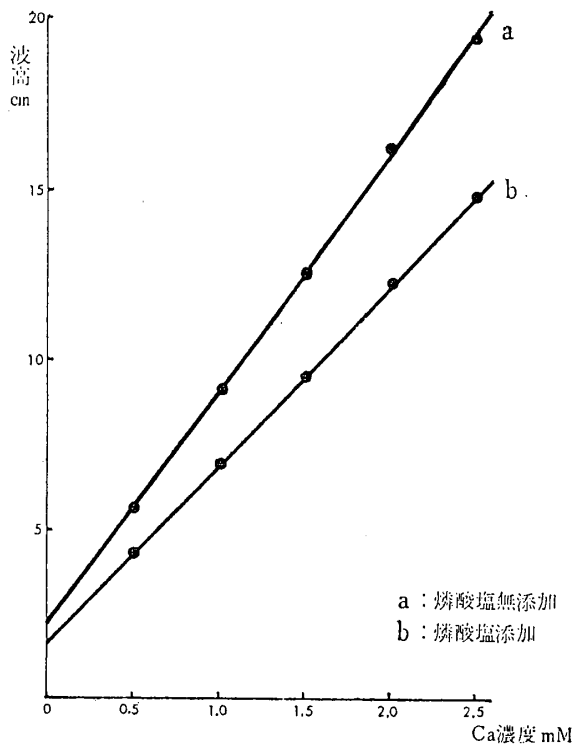


図3 Ca濃度と波高の関係

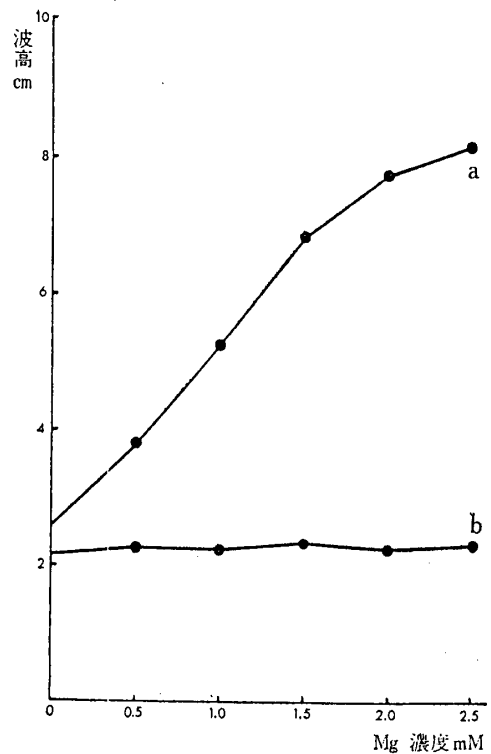


図4 Mg濃度と波高の関係

次に上記測定液に磷酸アンモン液0.5 ml添加し、0.2%ゼラチン水溶液を0.5 mlとして同様に実験を行なった場合のMg濃度と波高の関係は図4のbに示した。

以上の実験結果より、Mg濃度と波高は直線的比例関係を示さず、特にMg濃度1.5 mM以上の場合には波高の増加度が著しく減少することを認めた。また磷酸塩添加によりMgの影響は完全に除去される。

iii) CaとMgが共存する場合の濃度と波高の関係

CaとMgが共存する場合、両者は同様な電解電圧を示して(図5 半波電位-1.23V)定量困難なため、磷酸塩を添加してMgの阻害を除去する方法が従来採用されているが、磷酸塩の有無によってCaとMgの同時定量が可能にならないものか否かを検討するため次の実験を行なった。

測定液の組成は下記のとおりであるが、実験I、II、IIIにおいて $\frac{M}{100}$ マグネシウム標準液をそれぞれ0.5、1.0、1.5 ml添加し、それらのCa濃度と波高の測定結果を図6のa₁、a₂、a₃に示した。

測定液組成

実験I (図6のa₁)

{	基礎液:	5.0 ml
	0.2%ゼラチン水溶液:	1.0 ml
	$\frac{M}{100}$ -カルシウム標準液:	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml
	$\frac{M}{100}$ -マグネシウム標準液:	0.5 ml
	全量を蒸留水で10 mlとする。	

実験Ⅱ (図6の a₂)

{	基礎液:	5.0ml
	0.2%ゼラチン水溶液:	1.0ml
	$\frac{M}{100}$ -カルシウム標準液:	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5ml
	$\frac{M}{100}$ -マグネシウム標準液:	1.0ml
	全量を蒸留水で10mlとする。	

実験Ⅲ (図6の a₃)

{	基礎液:	5.0ml
	0.2%ゼラチン水溶液:	1.0ml
	$\frac{M}{100}$ -カルシウム標準液:	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5ml
	$\frac{M}{100}$ -マグネシウム標準液:	1.5ml
	全量を蒸留水で10mlとする。	

次に上記の実験Ⅰ, Ⅱ, Ⅲにおいて, それぞれに磷酸アンモン液0.5ml添加し, 0.2%ゼラチン水溶液は0.5mlとして電解液を調整し, ポーログラフ法を行ってCa濃度と波高の関係を測定し磷酸塩添加の影響を調べた。その結果を図6の b₁, b₂, b₃ に示す。尚図6の a₀, b₀は図3の a および b である。

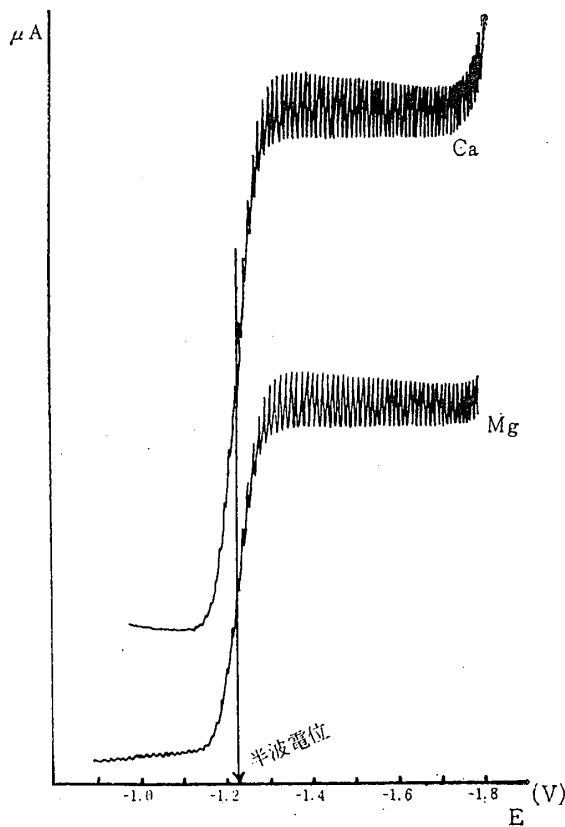


図5 Ca及びMgのポーログラム

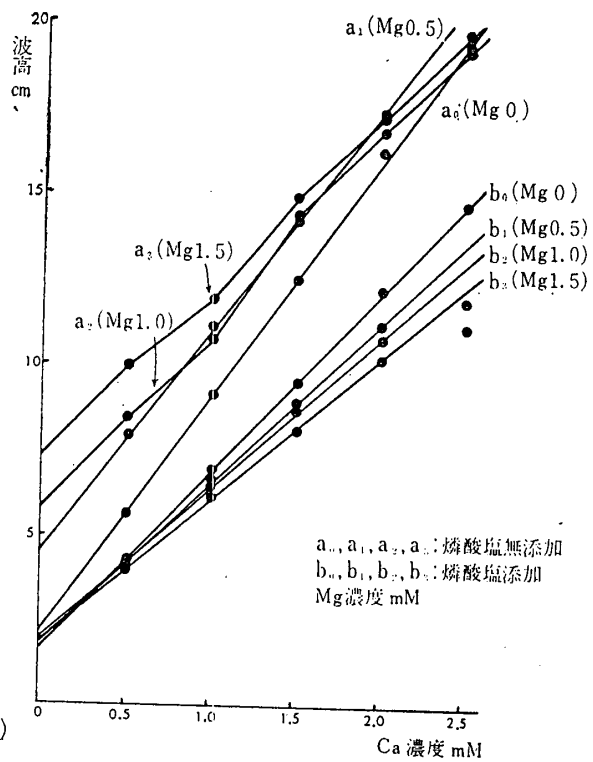


図6 Caの波高に及ぼすMgと磷酸塩の影響

以上の実験結果より, 磷酸塩無添加の場合, 0.5~2.5 mMのCaと1.0 mM以上のMgが共存するとCa濃度と波高が比例関係を示さず, またMg 0.5 mMの場合もCa濃度1.5 mM以上になると波高の増加度が減少する傾向にあることを認めた。

また磷酸塩添加によってMgは除去されるが, Mg濃度の増加とともにCaの波高も減少する。即ちMg 0.5mM, Ca 1.0mMの場合, Ca濃度の測定誤差は0.06mM (6%)であり, Mg 1.5 mM, Ca 2.5mMの場合Ca濃度の測定誤差は0.48 mM (19.2%)となることを認めた。

4 植物組織中の Ca の定量

試料としてバラ，アジサイなど14種の花弁類の花弁，葉，茎，花柄およびホウレンソウ，コンフリーなど葉菜類4種を使用した，これら植物組織は60°Cの電気定温器中で乾燥し粉末として実験に供した。(水分 6~10%)

試料の灰化は湿式法と乾式法の両者を採用して検討した結果，前者は定量値が減少する場合があります実験誤差を生じ易いため乾式法を採用した。

i) 試料の調整及び測定

花弁，葉，茎，花柄：試料1gをルツボで灰化し，少量の濃塩酸を加えて完全に溶解し(溶解しない時は加熱する)蒸留水で10mlとし，濾過してその濾液を適量(Ca濃度0.5~1.5mM)とり下記のように測定液を調整して，上記(2)の方法でポーラログラフ分析に供した。

測定液組成 { 基礎液： 5.0ml
0.2%ゼラチン水溶液：1.0ml又は0.5ml (磷酸塩添加の場合)
磷酸アンモン液：0又は0.5ml
試料溶液：0.2ml~1.0ml
全量を蒸留水で10mlとする。

葉菜類の葉および茎：上記の花弁類の場合と同様に調製し測定した。

ii) 実験結果

各試料のC-E曲線より波高を測定し，図3のaおよびbの検量線より磷酸塩無添加の場合と，添加した場合のCa含有量を算出し，表1(花弁類)および表2(葉菜類)に示した。

以上の実験結果よりショウブ，ポタン，ツツジ，キク，バラ，チューリップ，サザンカなどの花弁には風乾物中約200~450mg%のCaが含有されるが，アジサイは約900mg%，キク，ツツジ，アジサイの葉，茎には1000~1500mg%の多量のCaの存在を認めた。またバラ，チューリップの花弁は色調の相異によりCa含有量も若干変化した。

磷酸塩の添加により，一般にCaの波高は減少したが，特にショウブポタン，深紅バラ，白，赤チューリップ，アジサイの葉，キクの葉は20%以上の減少を示し，Mgの存在が推定され得る。

葉菜類のCa含量はコンフリーの葉に特に多く(約2500mg%)ついでツルナの葉，茎，コンフリーの茎，レタス(約700~1600mg%)に多く含有され，ホウレンソウは最も少なく約400mg%であった。磷酸塩添加により，おおむね算出されたCa量は10%内外の減少をみた。

試料名		磷酸塩添加	磷酸塩無添加
花	アジサイ(愛知県産)	898	954
	アジサイ(三重県産)	850	886
	黄キク	440	400
	黄チューリップ	340	398
	ツツジ	338	388
	白サザンカ	328	388
	ショウブ	320	454
	赤サザンカ	278	324
	深紅バラ	278	376
	白チューリップ	260	389
	黄バラ	244	256
	鮮赤色バラ	230	286
	ポタン	192	264
	紫黒チューリップ	186	192
赤チューリップ	166	334	
葉	アジサイ花柄	1320	1412
	アジサイ茎	1296	1400
	アジサイ葉	1414	3226
	キク葉	1058	1432
	ツツジ葉	976	1200

表1 花弁類のCa含有量(風乾物中mg%)

考 察

1) 磷酸塩添加による波高の減少は、磷酸アンモンが基礎液の強アンモニアアルカリ性によって測定液に沈澱をつくり、一部 Ca のイオン化が阻止されるためと推定されるが、今後 Mg の阻害防止に効果を有し、かつ沈澱を生じない塩類の選択を検索する必要があると考えられる。

2) Zlotowsky, Kolthoff はヨウ化テトラメチルアンモニウムを支持塩として Mg のポーラログラフを得ているが⁵⁾ その波形は定常部をもたないもので波高の測定は不可能であるが、上述の基礎液を使用すれば定常部をもつ波形がえられる。しかし図4の a より Mg 濃度と波高の間に直線的比例関係は存在せず、本法による Mg の定量は不可能である。

3) Ca と Mg が共存する場合 Mg による波高の増加はみられるが、その増加量に規則性はなく、Ca に対する Mg の含有比が 2.5 : 1 以上となると Mg は Ca—EDTA の結合にも影響すると考えられる。

4) 上記 3) に磷酸塩を添加することにより、Mg の影響は除去されるが、Ca の波高もやや減少する。これは電解液を調整する際磷酸塩の添加により、Mg と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ の化合物 MgNH_4PO_4 を生じ、この沈澱量の増加とともに EDTA—Ca の生成が阻止され、波高が減少するものと推定される。

5) 結局 Ca と Mg が共存する未知試料において Ca 含量を求める場合は、検量線作成時にも磷酸塩を添加し、試料の電解液も同様に調整する必要がある。また電解液の Ca 濃度は 1.5mM 以下になるように試料溶液を調整することが望ましい。

6) 植物組織中の Ca 定量においては磷酸塩添加と無添加の場合、Ca 含量に差がみられるが、磷酸塩添加の場合の数値が Ca 含有量の近似値であって、磷酸塩無添加の場合の測定値は Mg 含有量をも包含する可能性がある。それ故アジサイ、黄キク、黄バラ、紫黒チューリップ、コンフリー茎、ツルナ茎、ハウレンソウ、レタスは Mg をほとんど含まないものと推定される。ツルナの磷酸塩無添加の還元波に原因不明の阻害波があらわれたが、目下その理由を検討中である。また植物体においてはその部位によって Ca 含有量に相当な相異が認められ、一般に花卉に少く、茎葉に多く含有されるが、Ca の植物生理学上の意義については今後追求する予定である。

ま と め

1) ポーラログラフ法により Ca を定量する場合、共存する Mg の影響ならびに磷酸塩添加による Ca, Mg の波高に及ぼす影響について標準溶液で検討を行ない、Ca 定量の適当な条件を検索した。

2) 上記 1) の方法によって植物組織中の Ca を定量した結果、一般に花卉より葉、茎に Ca は多く、また葉菜類ではコンフリー、ツルナはハウレンソウ、レタスより Ca 含有量が多いことを認めた。

尚本報告の一部は第14回家政学会中部支部例会で発表した。

試 料 名	磷酸塩添加	磷酸塩無添加
コンフリー葉	2447	2750
コンフリー茎	1328	1296
ツルナ葉	1384	1584
ツルナ茎	1584	1616
ハウレンソウ葉	424	386
ハウレンソウ茎	420	452
レ タ ス	686	708

表2 葉菜類のCa含有量（風乾物中mg%）

最後に本研究に際し，終始親切にご指導下さった本学青木みか教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) , 5) 品川睦明：ポーログラフ分析法（共立全書）1969
- 2) W. Blaeded, H. T. Knight ; (1954) Anal. Chem., 26, 714
- 3) , 4) 日本分析化学会近畿支部編：機器分析実験法（上），p.105, p.92