

分光蛍光光度計RF-5300PCを用いたクマリン簡易測定の方法紹介 Simplified Measuring Method of Coumarin by RF-5300PC

軽油には消費税（国税）のほかに軽油取引税（地方税）が課せられます。一方、灯油やA重油には軽油取引税は課せられません。このため、軽油に灯油や重油を混ぜた不正な混和軽油を販売して、税金分を不当に取得する不正行為が行われる場合があります。その対策として、当時の通商産業省の指導により平成3年3月から市販の灯油とA重油に、識別剤として濃度1 ppmのクマリンが添加されるようになりました。これを受けて、税務局では軽油の検査として、抜き取り試験を行っています。クマリン

が検出されれば、灯油又はA重油が軽油中に混入されたことになり、指導処置が取られます。

このクマリンの分析方法について、社団法人石油学会製品部会 試験分析分科会で規格化が検討されています。今回は、その規格化が検討されている簡易定量法（小容量で簡易的に定量する方法）を用い、クマリンの分析を行いましたのでご紹介します。

A. Hashimoto

■分析手順

Analytical Procedure

分析手順を下記に、分析に必要な機器および試薬をTable 1に示します。また、島津分光蛍光光度計RF-5300PC 軽油識別剤クマリン分析システムの写真をFig. 1に示します。

[分析手順]	
①	各種溶液を準備する ・アルカリ水溶液 （硝酸ナトリウム/水酸化ナトリウム=20g/10g、水溶液100 mL中） ・アルコール液（1-ブタノール/エタノール=4/3） ・検量線用クマリン標準液（クマリン濃度1.2 ppm） ・n-ドデカン
②	検量線作成用標準試料の調整
③	定量用試料の調整
④	振とう異性化（紫外線照射）
⑤	検量線の作成
⑥	未知試料の測定

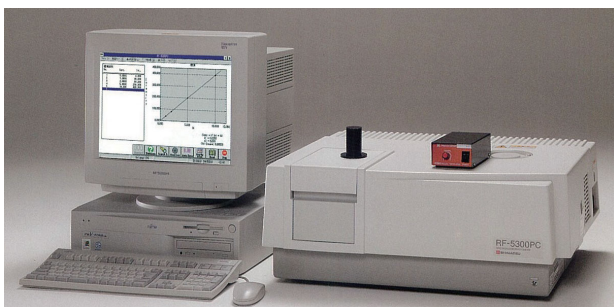


Fig. 1 島津分光蛍光光度計RF-5300PC 軽油識別剤クマリン分析システム
RF-5300PC Coumarin Analysis System

Table 1 クマリン分析に必要な機器および試薬
Instruments and Reagents Needed for Coumarin Analysis

①	分光蛍光光度計 RF-5300PC
②	クマリン分析キット（スターラー付き試験管ホルダ）
③	パソコン、モニター、プリンター、プリンターケーブル
④	試薬秤量用天秤
⑤	クマリン測定用専用試験管
⑥	ホールピペット10 mL
⑦	メスフラスコ100 mL, 1000 mL
⑧	メスシリンダー100 mL
⑨	マイクロピペット100~1000 μL用
⑩	マイクロピペット1000~5000 μL用
⑪	試験管立て23 mmφ用
⑫	デスポ手袋
⑬	クマリン標準試薬
⑭	アルカリ水溶液 水酸化ナトリウム、硝酸ナトリウム
⑮	アルコール液 1-ブタノール、エタノール
⑯	n-ドデカン
⑰	その他 試験管振とう器、紫外線照射器もそろえられると便利です。

■各溶液の調製

Preparation of Solutions

- クマリン標準原液 (12000質量/容量 ppm) (密栓冷暗所で3ヶ月保存可)
100 mLのメスフラスコにクマリン1.2 ± 0.0001 gを精秤し、トルエンでメスアップします。
- クマリン標準液 (120質量/容量 ppm)
1000 mLのメスフラスコにクマリン標準原液(a) 10 mLをホールピペットで量り取り、n-ドデカンでメスアップします。
- クマリン標準液 (1.2質量/容量 ppm)
1000 mLのメスフラスコにクマリン標準液(b) 10 mLをホールピペットで量り取り、n-ドデカンでメスアップします。
- アルカリ水溶液 (密栓冷暗所で1ヶ月保存可)
水酸化ナトリウム10±0.1 gおよび硝酸ナトリウム20±0.1 gを量り取り、100 mLのメスフラスコで水を用いてメスアップします。
- アルコール液 (密栓冷暗所で1ヶ月保存可)
1-ブタノール80 mLとエタノール60 mLを混和します。

■検量線作成用標準試料および実試料の調製

Preparation of Standard Samples for Calibration Curve and Analytes

検量線作成用試験管5本にマグネチックスターラーを入れた後、Table 2に示す各溶液をそれぞれ分注します。実試料の調製に関しては、試験管にマグネチックスターラーを入れた後、実試料1 mL、n-ドデカン6 mL、アルカリ水溶液5 mL、アルコール液8 mLを分注します。

Table 2 検量線作成用標準試料の調製例
Mixture Ratio of Standard Sample for Calculation Curve

混和率	0 % (0 ppm)	10 % (0.12 ppm)	40 % (0.48 ppm)	80 % (0.96 ppm)	100 % (1.2 ppm)
クマリン標準液 (1.2 ppm)	0	0.10	0.40	0.80	1.0
n-ドデカン	7.0	6.9	6.6	6.2	6.0
アルカリ水溶液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
アルコール液	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

■振とうと異性化

Shaking and Isomerization

各試験管を振とう器に装着し、240回/分以上で3分間振とうします。振とう器がない場合は手で振とうします。

振とう後、5分間静置し、Fig. 2のように三層に分離していることを確認します。これらは上から順にドデカン層、アルコール液層およびアルカリ水溶液層です。

次に分光蛍光光度計RF-5300PCのセルホルダーに試験管をセットします。マグネチックスターラーを撹拌させながら、360 nmの励起波長（スリット幅:10 nm）を利用し、5分間紫外線照射を行い、クマリンを異性化させます。蛍光波長を500 nm（スリット幅:10 nm）に設定し、蛍光強度を検出することで、異性化の進行状態が確認できます。

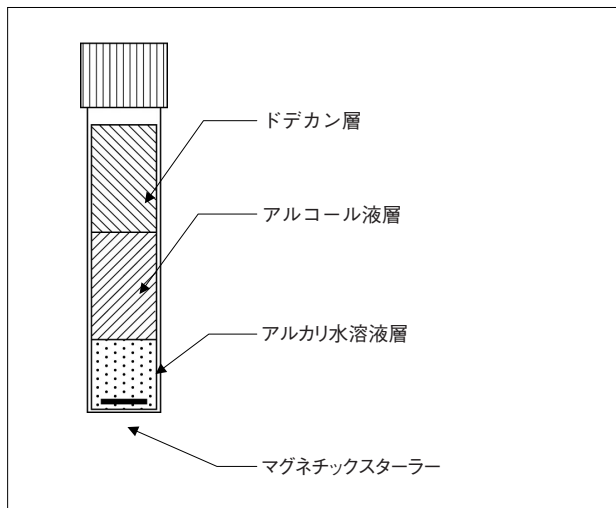


Fig. 2 三層に分離した試験管内の模式図
Three Layers in Test Tube

■クマリンの異性化反応

Isomerization Reaction of Coumarin

クマリンはアルカリ溶液中で加水分解され、シス-*o*-ヒドロキシケイヒ酸になります。さらに紫外線を照射すると異性化されてトランス-*o*-ヒドロキシケイヒ酸になります。Fig. 3にそれぞれの構造式を示します。クマリンをトランス-*o*-ヒドロキシケイヒ酸にすることで蛍光を発生させるようになるため、蛍光強度を測定することにより、クマリンの定量が行えます。

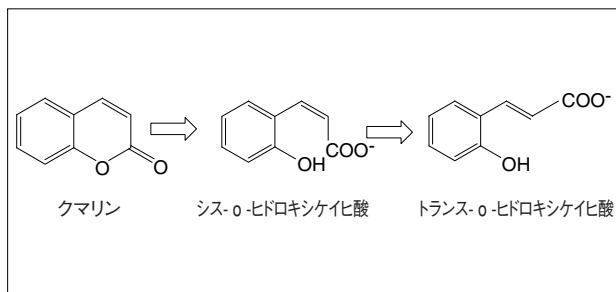


Fig. 3 クマリンの反応
Reaction of Coumarin

■検量線及びクマリン添加軽油の測定結果

Analytical Results

紫外線照射後、Table 3に示した分析条件で測定します。標準試料の蛍光スペクトルをFig. 4、検量線をFig. 5に示します。

ブランク試料を20回繰り返し測定した結果、標準偏差は0.019で、検量線の傾きは785.637でした。これより定量下限値は0.00024 ppmとなります¹⁾。

今回は市販軽油にクマリンを0.5 ppm添加したものを実試料とし、測定しました。結果をTable 4に示します。添加量とほぼ等しい定量結果が得られました。

Table 3 分析条件
Analysis Conditions

励起波長	360 nm
蛍光波長	500 nm (スペクトルスキャン時は390~630 nm)
バンド幅	EX:10 nm, EM:10 nm

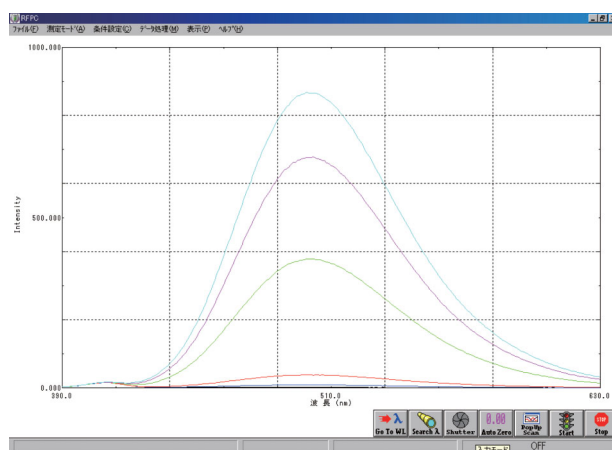


Fig. 4 標準試料の蛍光スペクトル
Fluorescence Spectra of Standard Solutions
蛍光強度の強い方から順に、1.2 ppm, 0.96 ppm, 0.48 ppm, 0.12 ppm, 0 ppm

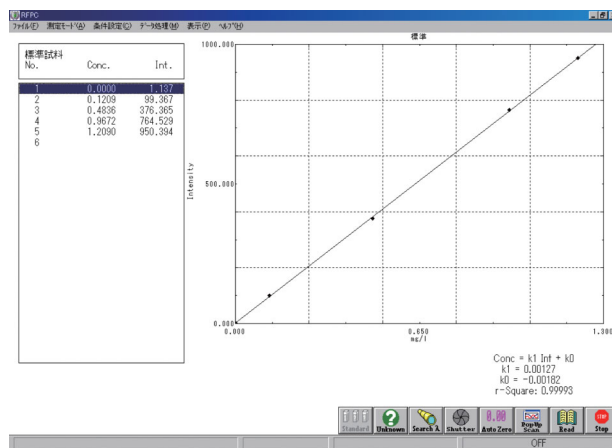


Fig. 5 検量線
Calibration Curve Obtained with Standard Solutions

Table 4 クマリン添加軽油の測定結果
Measurement Result of Coumarin-added Commercial Light Oil

蛍光強度	添加量 (ppm)	測定結果 (ppm)
8.653	0.50	0.4858

1) 平井昭司監修：“現場で役立つ化学分析の基礎” 7章「分析値の提示と分析値の意味」 社団法人日本分析化学会編（2006）オーム社

初版発行：2010年7月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

● 0120-131691 (携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。