

# 環境水中の微量イオン種定量のための分析法 (1)

— 亜硝酸イオンの定量における吸光光度法とイオンクロマトグラフィー法の比較検討 —

蒲生啓司・澤本博道

(教育学部化学教室)

Analytical Methods for the Determination of Trace Ion Species in Environmental Water (Part 1) ; Instrumental Comparison for the Determination of Nitrite in Spectrophotometric and Ion Chromatographic Method

Keiji GAMOH and Hiromichi SAWAMOTO

Laboratory of Chemistry, Faculty of Education

**Abstract** : Instrumental comparison in spectrophotometric and ion chromatographic method was described for the determination of nitrite. In the spectrophotometric method the nitrite was first diazotized with p-aminobenzoic acid, followed by coupling to 8-hydroxyquinoline to produce an azo dye compound. The azo compound was spectrophotometrically determined at 498 nm. Many conditional factors for the two serial reactions were investigated to obtain the optimum analytical conditions. The linear response range in the low concentration of nitrite was  $1 \times 10^{-9} \sim 1.5 \times 10^{-6}$  g/ml. In the ion chromatographic method, which consisted of the non-suppressor single column type, the nitrite was separated by an anion exchange column and determined by direct spectrophotometric detection at 210 nm. The linear response range in the low concentration of nitrite was  $1 \times 10^{-8} \sim 2 \times 10^{-6}$  g/ml. A good correlation between the spectrophotometric and the ion chromatographic determination of nitrite was observed in the direct instrumental comparison.

キーワード：環境化学，微量分析，亜硝酸イオン，イオンクロマトグラフィー

## 緒 言

近年の各種産業の発展は、種々の化学物質による自然水域の汚染を進行させることになり、化石燃料消費量の増大によって、酸性降下物による環境の酸性化等の地球規模での環境汚染に拍車をかけ、更には飲み水たる水道水の汚染にまで進行し、行政機関はその対応に苦慮する機会が多くなってきている。低沸点有機ハロゲン化合物による地下水汚染、ゴルフ場使用農薬による水道水源の汚染、あるいは強毒性大腸菌による汚染等、汚染源に関わる問題には限りがない。このような状況下で、我が国を初め、米国<sup>1)</sup>あるいはWHO<sup>2,3)</sup>で水質基準の見直しが行われている最中であり、水質基準測定項目の公定法についても、現行法で対処するのは非常に困難な状況になっていることが指摘されている。

環境汚染物質の生成及び移動に関する研究や汚染物質の除去法の評価、更には適切な環境基準の設定のためには、環境試料中の微量成分を、感度及び精度良く定量する方法の開発及び再検討が第

一義的に重要である。

環境分析における水試料の無機成分の定量法の推移<sup>4)</sup>を1991年までの過去10年間で見てみると、依然として蛍光・吸光光度法及び原子吸光法が最も良く用いられているばかりでなく、むしろ増加の傾向にある。このことは、蛍光・吸光光度法における、高感度でかつ選択性の高い有機試薬の開発とその応用研究が精力的に行われていることを反映していると思われる。一方、クロマトグラフ法もその増加傾向の見られる定量法の一つであるが、低濃度試料へ対応すべく安定性の高い高感度検出器の開発が達成されてきた結果であると思われる。更に、対象成分に応じて検出器を選択できる、言い換えれば検出器の持つ高い選択性が微量成分の選択的検出を可能にしてきた、ということができる。

陰イオン種の測定においては、水質基準の公定法として、主として滴定法が採用されてきたが、最近のイオンクロマトグラフィーの進歩により、USEPA<sup>5)</sup>あるいは Standard Methods<sup>6)</sup>では陰イオンの測定にイオンクロマトグラフィー法を採用している。我が国では、抗水・廃水試験方法<sup>7)</sup>、工業用水試験方法<sup>8)</sup>等に採用している。また、上水試験方法の改定に向けての検討においても、陰イオン種のイオンクロマトグラフィー法の採用を第一義的に考えている。

イオンクロマトグラフィーは、1975年 Small ら<sup>9)</sup>によって開発され、電気伝導度検出器を用いるサプレッサー方式のデュアルカラム法として登場した。以来、イオン性及び非イオン性の有機・無機系の大気汚染物質の分離分析法として脚光を浴び、その後のノンサプレッサー方式のイオンクロマトグラフィー<sup>10)</sup> 更には分光光度計検出器を用いる間接吸光度検出法<sup>11)</sup>の出現によって、イオンクロマトグラフィー技術は、水質汚染、大気汚染に関連する環境化学の分野を中心に、広範な分野において適用されてきた。

本研究では、環境水中の微量イオン種定量のための分析法の研究の一環として、亜硝酸イオンの定量における吸光光度法とイオンクロマトグラフィー法の比較検討について報告する。

これまで亜硝酸イオン測定については、ザルツマン法に代表される吸光光度法を用いる方法<sup>12-16)</sup>を初めとして、吸着ストリッピングボルタンメトリー法<sup>17,18)</sup>による電気化学検出法、あるいはイオンクロマトグラフィー法等、様々な方法が研究されてきた。いずれも一長一短があり、検出感度、前処理必要の有無、あるいは検出器の安定性の問題等が指摘されているが、本研究では、検出器の安定性が高く、高感度検出が期待できる、8-ヒドロキシキノリン/p-アミノ安息香酸を用いる吸光光度法と、ノンサプレッサー方式分光光度計検出イオンクロマトグラフィー法を用いた、定量性の直接比較を行うこととした。

亜硝酸イオンに8-ヒドロキシキノリン及びp-アミノ安息香酸を反応させて、生成するアゾ化合物を電気化学的に検出する方法は既に知られているが<sup>19)</sup> 未だ吸光光度法には実用的に応用されていない。電気化学的検出法と吸光光度法では検出原理が異なるため、反応の至適条件も種々異なることが予想されるので、可能な限り本反応に関わる諸条件を設定し検討を加えた。

一方、イオンクロマトグラフィーを用いる最大の利点は、分離部と検出部が独立して機能し、それらがオンラインで直結している点にある。分離部としてのカラムには、親水性ポリマーをベースとした低交換容量のイオン交換樹脂を用いているが、言わばこのイオン交換樹脂の安定供給が、ノンサプレッサー方式のイオンクロマトグラフィーの出現を可能にしたと言われている。検出部は、基本的にイオンクロマトグラフィーでは電気伝導度検出器が用いられるが、ここでは伝導度計を用いず、検出の選択性を考慮して、亜硝酸イオンの紫外部での吸収を利用した分光光度計検出器を用いた。

## 実験方法

## 1. 測定原理及び方法

本吸光光度法における亜硝酸イオン定量のための測定原理を下図 (Fig. 1) に示した。

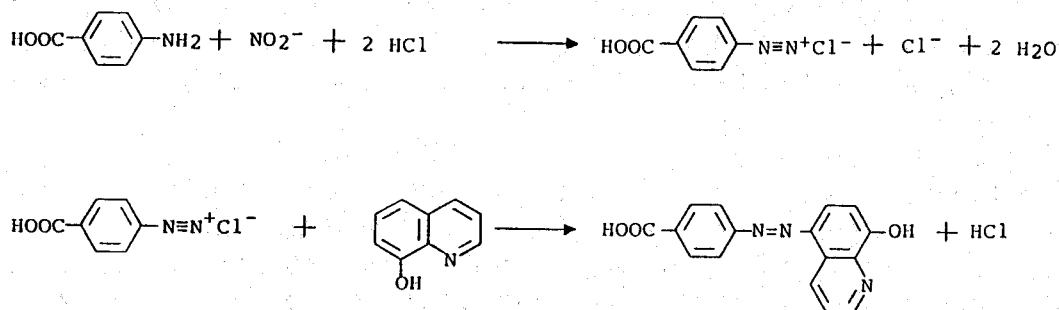


Fig. 1 Reaction scheme of the formation of an azo dye compound produced by nitrite and p-aminobenzoic acid/8-hydroxyquinolin.

即ち、試料中に存在する亜硝酸イオンが、塩酸の存在下でp-アミノ安息香酸と反応してジアゾニウム塩を生成し、これが引き続き加えられる8-ヒドロキシキノリンと反応して最終生成物であるアゾ化合物に変換される、その呈色反応に基づいている。

実験の手順として、亜硝酸イオンの標準溶液、または亜硝酸イオンを含む分析試料をサンプル管に入れ、p-アミノ安息香酸、塩酸を順次加え、数分間放置した後に、8-ヒドロキシキノリンと水酸化ナトリウム水溶液を加え、更に蒸留水を少量加えて数分後に、分光光度計によってアゾ化合物の吸収極大の吸光度を測定し、検量線を作成した。この際、本法における反応の最適化を図るために、以下の諸条件を検討した。即ち、1) p-アミノ安息香酸の濃度、2) 8-ヒドロキシキノリンの濃度、3) p-アミノ安息香酸と8-ヒドロキシキノリンの濃度比、4) 水酸化ナトリウム水溶液の濃度、5) 塩酸の濃度、6) 水酸化ナトリウム水溶液と塩酸の濃度比、7) p-アミノ安息香酸と塩酸を加えた後、8-ヒドロキシキノリン及び水酸化ナトリウム水溶液を加えるまでの時間と測定までの時間、である。これらの検討結果から最適条件を求め、その条件下で種々の濃度 (0.001~1.5 ppm) に調製した亜硝酸イオンを用いて検量線を作成した。また、実試料として、水道水等を用いて亜硝酸イオンの検出を試みた。

イオンクロマトグラフィー法においては、種々の濃度に調製した亜硝酸イオンの溶液を一定量カラムに注入して、得られたクロマトグラムピーク面積を求めることにより検量線を作成した。

## 2. 測定機器及び測定条件

本研究で用いた測定機種は、紫外可視分光光度計 (島津製作所製 UV-160) 及びイオンクロマトグラフ (東ソー製、送液ポンプ CCPD, カラム恒温槽 CO-8000, レオダイン社製 7125 型 サンプルインジェクタ、及び日立製作所製紫外分光光度計検出器 L-4000, データ処理装置 D-2500 から成る) である。イオンクロマトグラフィーでは、分離カラムとして、東ソー製 TSK gel IC Anion PW (4.6 mm i.d. x 5 cm) を、移動相として、5 mM リン酸二水素カリウム水溶液を用い、流速

0.7ml/min, カラム温度45℃, 検出波長210nmで分析を行った。

## 結果及び考察

### 1. 吸光光度法

緒言でも述べてあるように、被測定イオン種である亜硝酸イオンは、p-アミノ安息香酸と8-ヒドロキシキノリンとの反応によって、アゾ化合物として取り込まれるため、その低濃度域での測定においては、吸光光度法的に適した反応条件の設定が要求される。以下、分析の最適化を図るための諸条件を検討した。尚、吸光度の測定に当たり、分光器がダブルビーム方式であることから、各諸条件の設定に応じて全て亜硝酸イオンを含まないブランクを用い、分光器内でのバックグラウンド補正を行った。

#### 1) p-アミノ安息香酸の濃度

亜硝酸イオンの1ppm水溶液を用いて、塩酸0.1M, 水酸化ナトリウム0.1M, 及び8-ヒドロキシキノリンの濃度を300ppmとした時の、p-アミノ安息香酸の最適濃度を検討した。Fig. 2. に示したように、p-アミノ安息香酸の濃度を10~1000ppmの範囲で変動させた時、200ppmを越えた濃度で吸光度がほぼ飽和に達し、250ppm付近に最大値が観察されたので、p-アミノ安息香酸の最適濃度を250ppmとした。

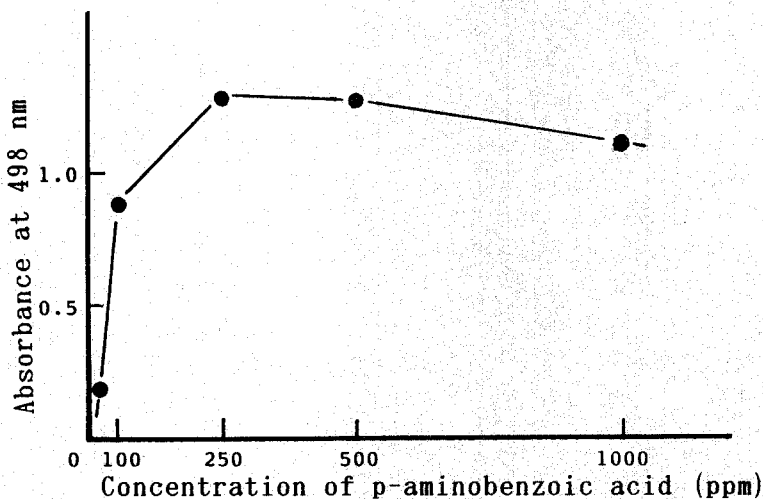


Fig. 2. Effect of p-aminobenzoic acid concentration on the azo dye compound formation reaction.

#### 2) 8-ヒドロキシキノリンの濃度

亜硝酸イオンの1ppm水溶液を用いて、塩酸0.1M, 水酸化ナトリウム0.1M及びp-アミノ安息香酸を250ppmとした時の、8-ヒドロキシキノリンの最適濃度を検討した。Fig. 3. に示したように、8-ヒドロキシキノリンの濃度を30~2000ppmの範囲で変動させた時、1000ppmを越えた濃度で吸光度がほぼ飽和に達したため、8-ヒドロキシキノリンの最適濃度を1000ppmとした。

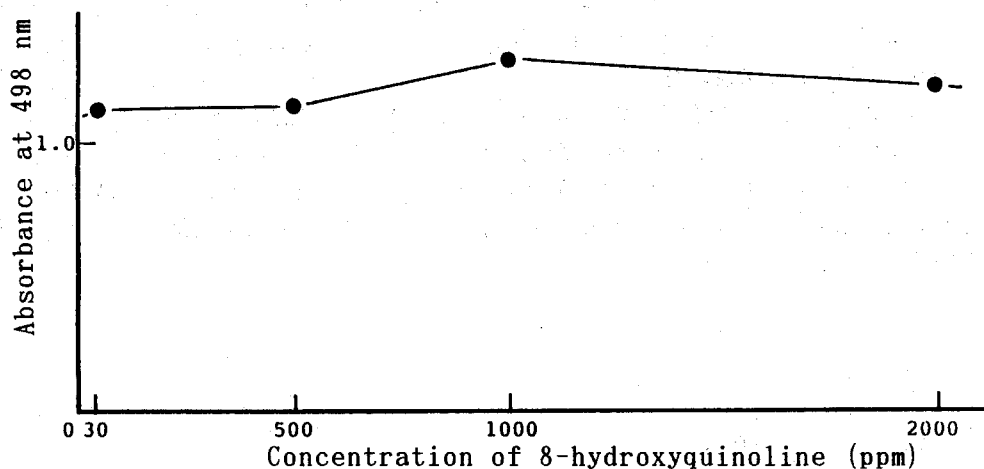


Fig. 3. Effect of 8-hydroxyquinoline concentration on the azo dye compound

3) p-アミノ安息香酸と8-ヒドロキシキノリンの濃度比

亜硝酸イオンの1 ppm水溶液を用いて、塩酸0.1M、水酸化ナトリウム0.1M、p-アミノ安息香酸濃度250ppm、8-ヒドロキシキノリン濃度を1000ppmとした時の、p-アミノ安息香酸と

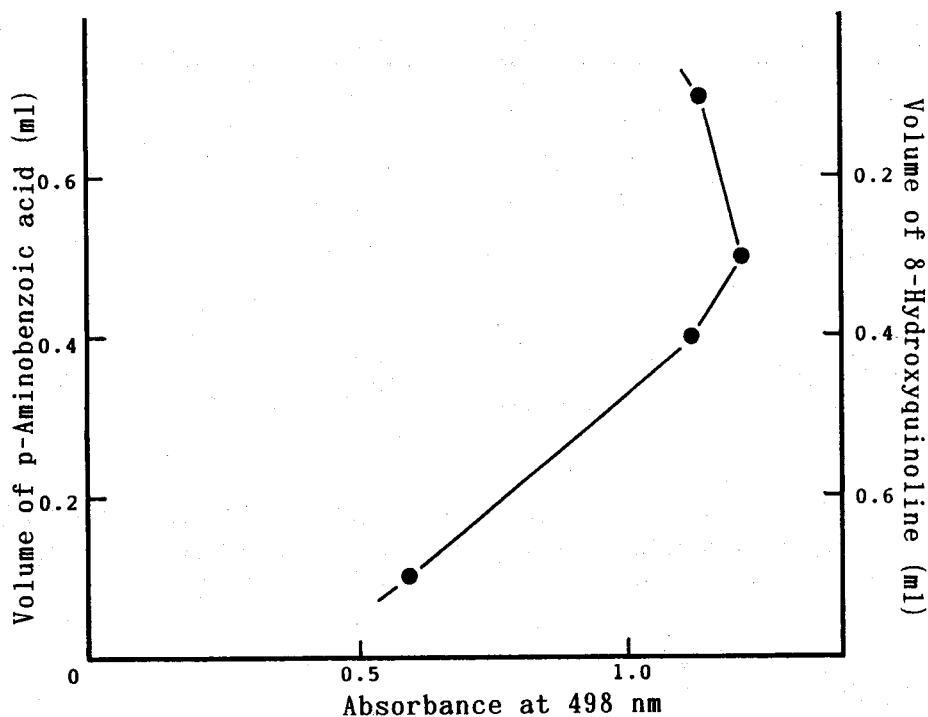


Fig. 4. Effect of the ratio of p-aminobenzoic acid and 8-hydroxyquinoline on the azo dye compound formation reaction.

8-ヒドロキシキノリンの最適濃度比（容量比）を検討した。混合比を、7 : 1, 4 : 4, 5 : 3, 及び1 : 7と変化させた時の吸光度の変化を観察したところ、Fig. 4. に示したように、5 : 3 の時に最も大きい吸光度を与えたことから、最適濃度比を5 : 3とした。

#### 4) 水酸化ナトリウム水溶液の濃度

亜硝酸イオンの1 ppm水溶液を用いて、塩酸0.1M, p-アミノ安息香酸濃度50ppm, 8-ヒドロキシキノリン濃度を300ppmとした時の水酸化ナトリウム水溶液の最適濃度を検討した。Fig. 5. に示したように、水酸化ナトリウム水溶液の濃度を0.05M, 0.1M, 及び0.5Mとした時の吸光度の変化を観察した結果、0.1Mの時に最も大きい吸光度を与えたことから、水酸化ナトリウム水溶液の最適濃度を0.1Mとした。

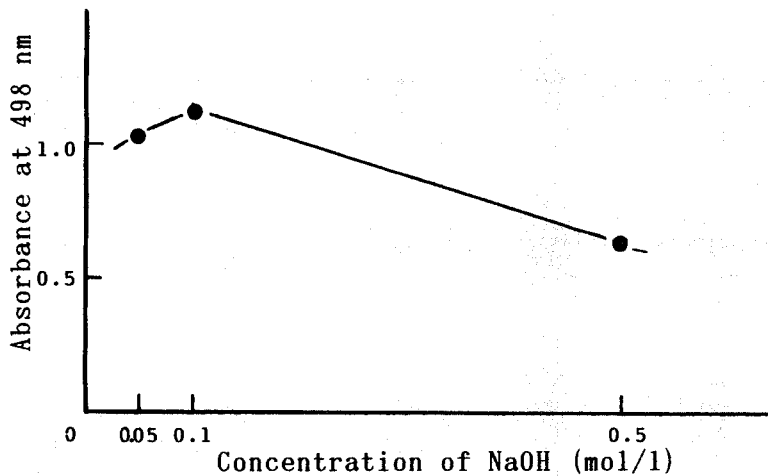


Fig. 5. Effect of hydrochloric acid concentration on the azo dye compound formation reaction.

#### 5) 塩酸の濃度

亜硝酸イオンの1 ppm水溶液を用いて、水酸化ナトリウム水溶液の濃度を0.1M, p-アミノ安息香酸濃度50ppm, 8-ヒドロキシキノリン濃度を300ppmとした時の、塩酸の最適濃度を検討した。Fig. 6. に示したように、塩酸の濃度を0.01M~1Mの範囲で変化させた時の吸光度の変化を観察した結果、0.1Mの時に最も大きい吸光度を与えたことから、塩酸の最適濃度を0.1Mとした。

#### 6) 水酸化ナトリウム水溶液と塩酸の濃度比

亜硝酸イオンの1 ppm水溶液を用いて、水酸化ナトリウム水溶液の濃度0.1M, 塩酸の濃度0.1M, p-アミノ安息香酸の濃度50ppm, 8-ヒドロキシキノリンの濃度を300ppmとした時の、水酸化ナトリウム水溶液と塩酸の最適濃度比（容量比）を検討した。混合比を、それぞれ3 : 1, 2 : 2, 及び1 : 3と変化させた時の吸光度の変化を観察したところ、3 : 1の時に最も大きい吸光度を与えたことから、最適濃度比を3 : 1とした。

#### 7) 反応時間

反応時間として、p-アミノ安息香酸と塩酸を加えた後の放置時間と、8-ヒドロキシキノリンを加えた後、水酸化ナトリウム水溶液を加えてから分光器で測定するまでの放置時間を検討した。塩酸を加えた後の放置時間については、Fig. 7. に示したように、吸光度が経時的に増加する傾向

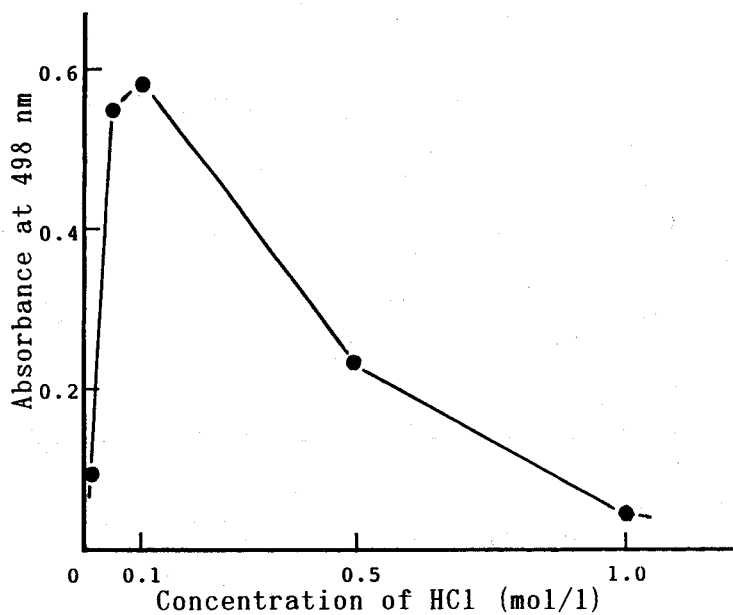


Fig. 6. Effect of sodium hydroxide concentration on the azo dye compound formation reaction.

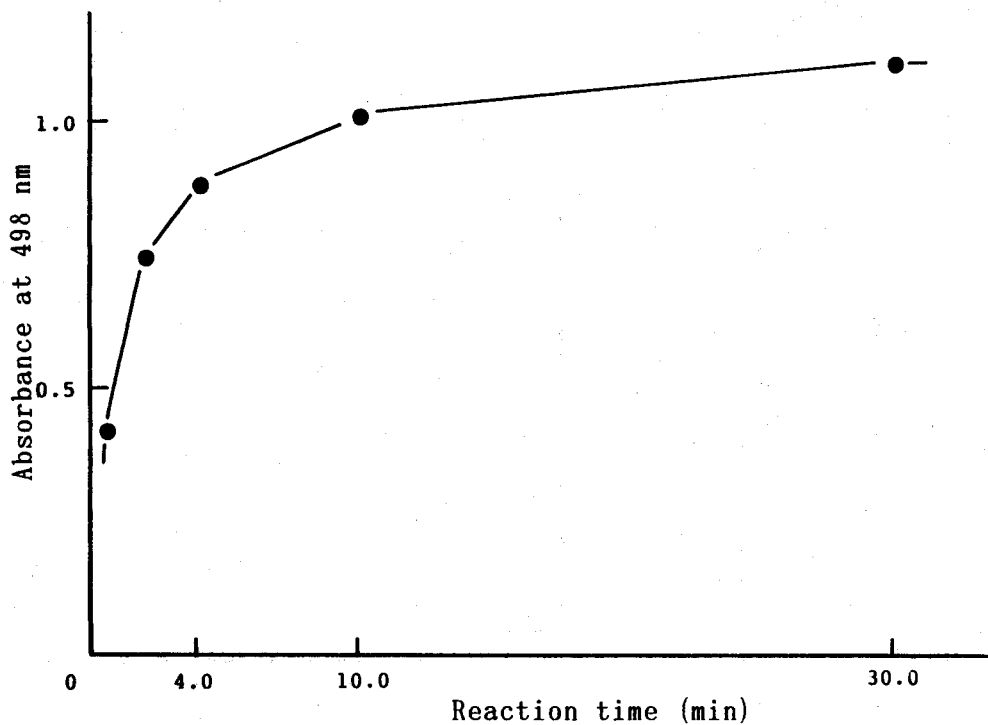


Fig. 7. Effect of the reaction time for the formation of the diazonium salt.

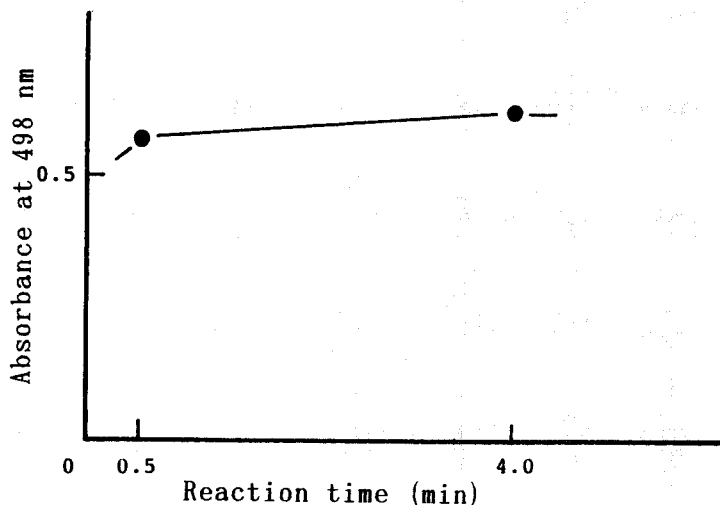


Fig. 8. Effect of reaction time for the formation of the azo dye compound.

にあったが、10分以降は増加の割合が小さくなったため、ここでの放置時間は10分とした。また、水酸化ナトリウムを加えた後の放置時間については、Fig. 8.に示したように、1分までは吸光度が経時的に増加したが、2分以降は増加の割合がほとんどなくなるため、ここでの放置時間は2分とした。

以上の検討結果より、反応に用いる各試薬の至適濃度及び容量は、亜硝酸イオンを含む分析試料 1 ml に対して、p-アミノ安息香酸：250 ppm, 0.5ml, 塩酸：0.1M, 0.5ml, 8-ヒドロキシキノリン：1000ppm, 0.3ml, 水酸化ナトリウム：0.1M, 1.5mlであり、また、最適反応時間は、塩酸を加えた後10分後、水酸化ナトリウムを加えた後測定までの時間は2分間であった。この反応条件下で検量線を作成した。検量線は、亜硝酸イオンの濃度範囲を 0.001~0.05ppm 及び 0.01~1.5ppm として、Fig. 9. 及び Fig.10. に示した。ほぼ良好な直線が得られ、検出下限も先の電気化学検出法の結果<sup>19)</sup>より

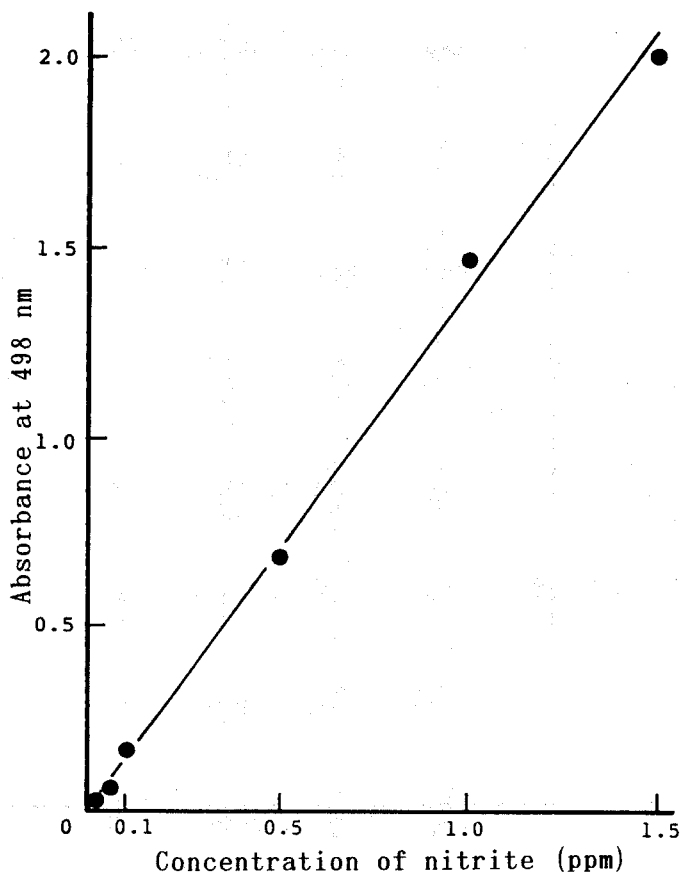


Fig. 10. Linearity of nitrite determined by spectrophotometric detection (1).



も低いようであるが、極低濃度域での直線性、即ち定量性には若干の問題があると考えられる。また、2 ppm 以上の亜硝酸イオン濃度では測定器の吸光度域を越えてしまうので、必要に応じて試料を希釈しなければならない。

また、本研究で得られた吸光光度法における各試薬の至適濃度及び容量は、先に報告された電気化学的検出法におけるそれ<sup>19)</sup>と若干異なっているが、そこでは、塩酸を加えた後や、水酸化ナトリウムを加えた後測定までの最適反応時間等の検討は行われていないため、必ずしも一致するものではなく、直接比較することはできない。

更に、亜硝酸イオン検出にあたって、系内に存在する他のイオン種が妨害成分となるかどうかの検討を加えたところ、硝酸イオン、硫酸イオン、及びチオシアン酸イオンについて、亜硝酸イオンに対しての濃度比を100倍～500倍とした時においても定量に影響することはなかった。

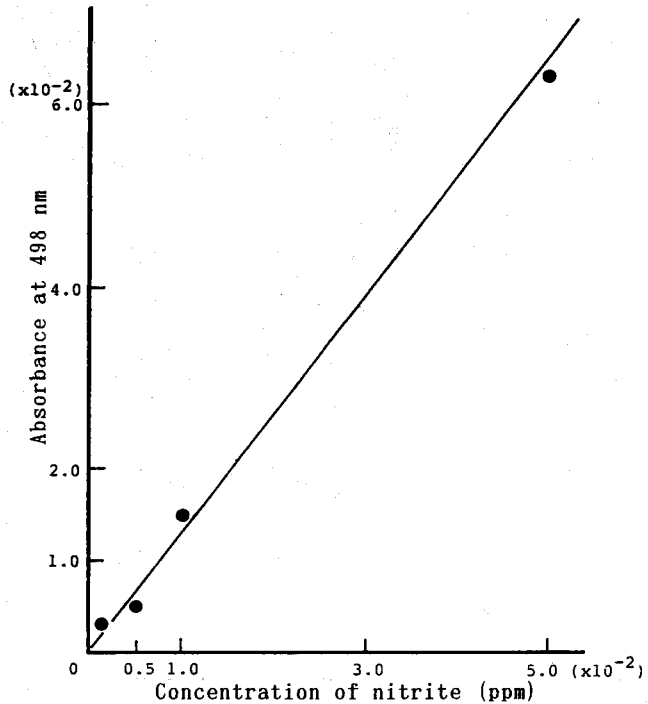


Fig. 10. Linearity of nitrite determined by spectrophotometric detection (2).

## 2. イオンクロマトグラフィー法

上記吸光光度法に使用した同一亜硝酸イオン試料を用いて、イオンクロマトグラフィー法によって得られる、亜硝酸イオン濃度とピーク面積の結果から、Fig.11. に示す検量線を作成した。0.01～2 ppm の範囲で、極めて良好な直線関係が得られた。検出下限は、0.002ppm (S/N=4) であった。

また、亜硝酸イオン検出にあたって、系内に存在する他のイオン種が妨害成分となるかどうかの検討を加えたところ、分離上、保持時間の接近している臭化物イオンや、硝酸イオンについては、いずれも本条件下での検出波長で吸収を示すことから、濃度比にして約200倍を越えると、亜硝酸イオンのピークを定量することが極めて困難であった。一方、硫酸イオン、及びチオシアン酸イオンについては、いずれのイオン種も保持時間が大きく異なり、また硫酸イオンについては、吸収を示さないことから、亜硝酸イオンに対しての濃度比を100倍～500倍とした時においても定量に影響することはなかった。

## 3. 実試料の分析

実試料として水道水を選び、二つの方法に従って分析を行った。その結果、いずれの方法によっても亜硝酸イオンを検出することができなかったため、0.1ppm の亜硝酸イオンを水道水に添加し

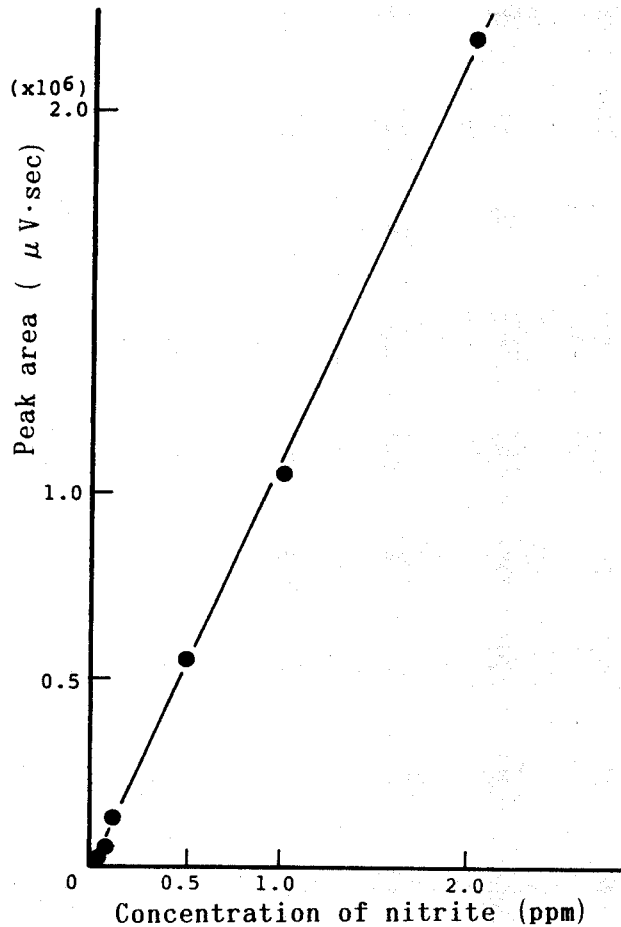


Fig.11. Linearity of nitrite determined by ion chromatographic detection.

て分析を行ったところ、いずれの方法も、高い回収率を示した(吸光光度法:  $98 \pm 5\%$  ( $n=10$ ), イオンクロマトグラフィー法:  $99 \pm 3\%$  ( $n=10$ )). この結果は、水道水中に比較的高濃度に含まれる陰イオン種(硝酸イオンや硫酸イオン)の妨害を全く受けずに、いずれの方法も亜硝酸イオンの定量が可能であることを示している。

### 結 語

亜硝酸イオン定量の際に敢えて問題点を指摘するならば、サンプルの捕収方法であり、保存方法である。不安定イオン種であるだけに、サンプリングから測定に至るまでの時間は、可能な限り短い方が良い。その点で、本研究では、標準試料の調製は必ずその日に行い、一日を一サイクルとして全諸条件の検討を行っている。

吸光光度法においては、反応と検出の選択性が、イオンクロマトグラフィー法においては、分離と検出の選択性がその最大の特長であり、亜硝酸イオンの定量にはその両者の特長が十分に活かされる。本研究において、二つの分析方法を用いて同一試料を直接比較検討する意義がそこにある。イオンクロマトグラフィーでは、検出に分光光度計を用いたことにより、再現性の良い結果を得る

ことができた。いずれの方法も亜硝酸イオンの定量法として満足すべき分析結果を打ち出しており、両者の相関も非常に高いので、今後実用化を図るためには、サンプリングからデータ処理に至るまで、分析システムの自動化等が必要になってくると思われる。

イオンクロマトグラフィーでは、常時、移動相という流れの中で分析が行われるため、測定作業は試料の注入のみであり、オートインジェクタ等の使用により連続分析が可能である。<sup>20)</sup> また、吸光光度法においては、反応に用いる試薬を連続的に加えるシステムが構築できれば、測定の自動化が可能である。そうした目的に沿って、現在当研究室では、フローインジェクション-吸光光度法の分析システムを確立すべく分析条件の検討が進行中である。

## 謝 辞

本研究は、本学部化学教室所属の三回生、及び四回生の精力的な実験によって達成されたものである。ここに、氏名を記すことで感謝の意を表したい。三回生：井上忠和君、岡田真理君、小島正一君、榎森節子君、坂本真紀君、四回生：産田浩彦君、開原慎次君。

## 文 献

- 1) USEPA 40 CFR Part 141. Drinking water; Substitution of contaminants and priority list of additional substances which may require regulation under the safe drinking water act. 52, No.130, 25720 (1987).
- 2) WHO: Guidelines for drinking-water quality (1984).
- 3) WHO: Revision of the WHO guidelines for drinking-water quality. Report of a coordination group-meeting in Geneva, 13-14 March (1990).
- 4) 大関邦夫・糠塚いそし：ぶんせき, 264-271 (1992).
- 5) USEPA Method 300.1: Determination of anionic substances by ion chromatography (1989).
- 6) Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th Ed.,(1990).
- 7) JIS M 0202 抗水・廃水試験方法 (1987).
- 8) JIS K 0101 工業用水試験方法 (1991).
- 9) H.Small, T.S.Stevens and W.C.Bauman, *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 10) D.T.Gjerde and J.S.Fritz, *J. Chromatogr.*, **176**, 199 (1979).
- 11) H.Small and T.E.Miller, Jr., *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 12) American Society for Testing and Materials, 1979 Annual Book for ASTM Standards, Part 31: Water, p.463, ASTM, Philadelphia, 1979.
- 13) A.Bhatt and V.K.Gupta, *J. Indian Chem. Soc.*, **57**, 1056 (1980).
- 14) A.Chaube, A.K.Baveja and V.K.Gupta, *Talanta*, **31**, 391 (1984).
- 15) S.Flamerz and W.A.Bashir, *Analyst*, **110**, 1513 (1985).
- 16) V.Raman and M.S.Dabbas, *Microchem. J.*, **40**, 242 (1989).
- 17) Z.Zhao and X.Cai, *J. Electroanal. Chem.*, **252**, 361 (1988).
- 18) C.M.G.van den Berg and H.Li, *Anal. Chim. Acta*, **212**, 31 (1988).
- 19) L.Guanghan and H.Zhike, *Talanta*, **39**, 123 (1992).
- 20) K.Gamoh and T.Yagi, *Anal. Sci.*, **4**, 433 (1988).

(平成4年9月30日受理)

(平成4年12月28日発行)

