

水中アンモニアのオルトフタルアルデヒド によるけい光定量について (第2報)

Fluorometric Determination of Ammonia in water with *o*-Phthalaldehyde (II)

佐藤 稔 大谷 倫子 川村 貢 浅井 建爾
前田 博之 清水 良夫 富所 謙吉 高杉 信男

Minoru Sato, Tomoko Otani, Mitsugu Kawamura,
Kenji Asai, Hiroyuki Maeda, Yoshio Shimizu,
Kenkichi Tomidokoro and Nobuo Takasugi

アンモニアのけい光反応において、反応の安定化を図るために、緩衝液の pH 値が中性のとき、アンモニアとけい光試薬のオルトフタルアルデヒドと 2-メルカプトエタノールとは、非常に安定したけい光物質を生成することが判明した。

その検量線は、アンモニア濃度 0.1~7mg/l の範囲で直線性を示し、また、この方法はアミノ酸・アミンの妨害の程度が低いことが判明した。

1 緒 言

アンモニアは、自然界で窒素の循環系を構成する一物質であり、水系の汚染の状態を考察する上で重要な指標の一つでもある。

このアンモニアの定量法は、比色法、イオンクロマトグラフ法、イオン電極法など各種の方法がある。

とりわけ、フェノールを使用するインドフェノール法が公定法^{1)~4)}に広く採用されている。

我々は、有害物質を極力使用しない方法の開発を目的として、オルトフタルアルデヒドを使用したけい光分析によるアンモニアの定量法(以下、OPA 法と略記)について検討を行った結果、若干の知見を得たので報告する。

2 方 法

2-1 装 置

分光けい光光度計は、島津 RF-500 (光源は 150 W キセノンランプ)及び 10 mm 石英セルを用いた。また、水素イオン濃度は、日立堀場ガラス電極 pH メーター、F-7 LC 型で測定した。

2-2 試 薬

オルトフタルアルデヒド(以下、OPA と略記)は特級(関東化学製)をジメチルスルホオキシドに溶解し、2-メルカプトエタノール(以下、MCE と略記)は生化学用(和光純薬工業製)をメタノール溶液とした。

ジメチルスルホオキシド及びメタノールはドータイト試薬ルミナゾールを、リン酸二水素ナトリウム及び水酸化カリウム(以上、メルク製)、塩化アンモニウムは特級(和光純薬工業製)を使用した。

他の試薬は特級品を、いずれもそのまま使用した。

水は、Millipore Milli Q オーガネックス型純水装置で精製したものを使用した。

2-3 測定操作

試料 0.5 ml を共栓試験管にとり、次いで pH 6.9 の 0.2 M リン酸二水素ナトリウム緩衝液を 5 ml, 60 mM OPA ージメチルスルホオキサイド溶液を 0.5 ml, 30 mM MCE ーメタノール溶液を 0.5 ml 加えて混合し、室温で 60 分間暗所に静置した後、励起波長 418 nm (バンド幅 5 nm), けい光波長 475 nm (バンド幅 40 nm) で、けい光強度を測定した。

また、ガラス器具は、アンモニアによる汚染を除去するために、あらかじめ、乾燥器で加熱し、デシケーター内で放冷したものを使用した。

なお、分光けい光光度計の感度調整は 10^{-6} M 硫酸キニーネの 0.1 N 硫酸溶液を使用した。

3 結果及び考察

3-1 反応条件の検討

3-1-1 けい光スペクトル

2-3 の測定操作より求めた極大波長は、励起側 418 nm, けい光側 475 nm であり、そのスペクトルを Fig. 1 に示した。

なお、波形は未補正である。

3-1-2 pH の影響

通常、OPA 法によるアンモニアの定量は、緩衝液の pH 値が pH 9~10 のアルカリ性の条件下で行なわれ^{5)~7)} その反応が安定性に欠けることも報告されている⁵⁾。

そこで、緩衝液の pH 値とそのけい光強度の関係について検討した。

0.2 M リン酸二水素ナトリウム溶液と 2 N 水酸化カリウム溶液を使用し、pH を 6 から 8 まで変化させた緩衝液を調整し、そのけい光強度を Fig. 2 に示した。

これによると、緩衝液の pH が 6.9 のとき最もけ

い光強度が高く安定していることが判った。

なお、ホウ酸塩緩衝液はこの範囲の pH 域では、微弱なけい光を呈したにすぎなかった。

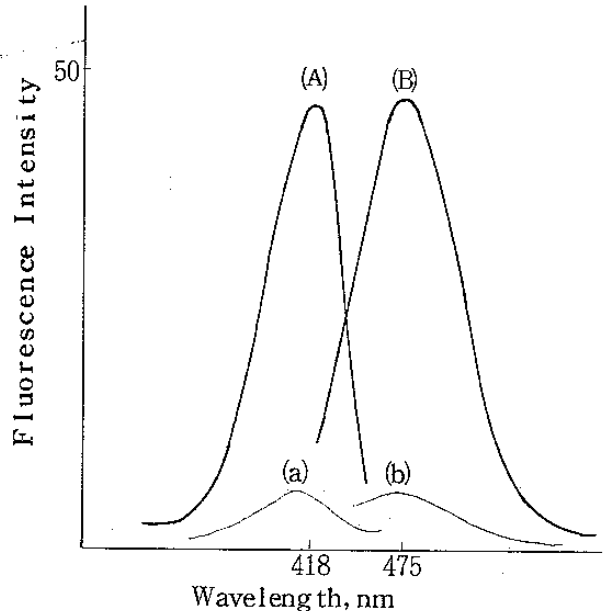


Fig. 1 Excitation and Emission spectra of reaction mixture Concentration of Ammonia is 3 mg/l
(A) Excitation spectra (a) Blank
(B) Emission spectra (b) Blank
()

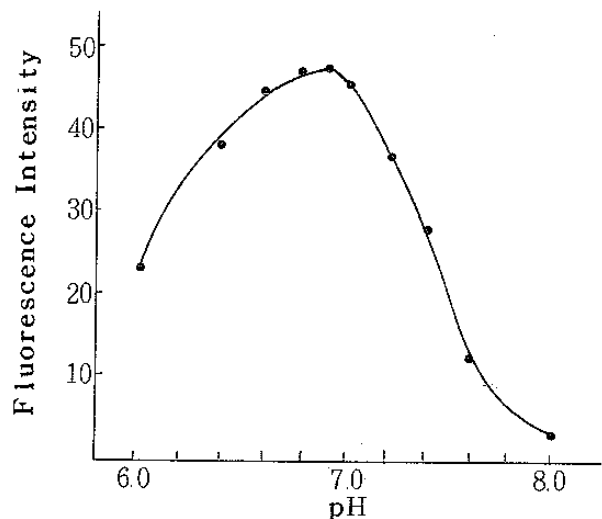


Fig. 2 Effect of pH on fluorescence intensity
Concentration of Ammonia is 3 mg/l
Buffer : 0.2 M Sodium dihydrogenphosphate

3-1-3 けい光試薬の濃度の影響

2-3の測定操作で、けい光試薬の濃度を变化したときのけい光強度との関係について検討した。

OPA-ジメチルスルホオキシド溶液中の OPA 濃度を 30, 60, 80, 100, 300 mM の 6 種類に、また、MCE-メタノール溶液中の MCE 濃度を、1, 30, 60 mM の 3 種類調製し、それぞれ組み合わせて、そのけい光強度の変化を Fig. 3 に示した。

これによると、3 種類の MCE 濃度のなかで MCE 濃度 30 mM のとき、けい光強度が高く、しかも、OPA 濃度が 80 mM までは、その濃度の増加と共に、けい光強度も増加する傾向にあった。

特に、これらの組み合わせのなかで、OPA 濃度 60 mM, MCE 濃度 30 mM のとき、最も安定したけい光強度が得られた。

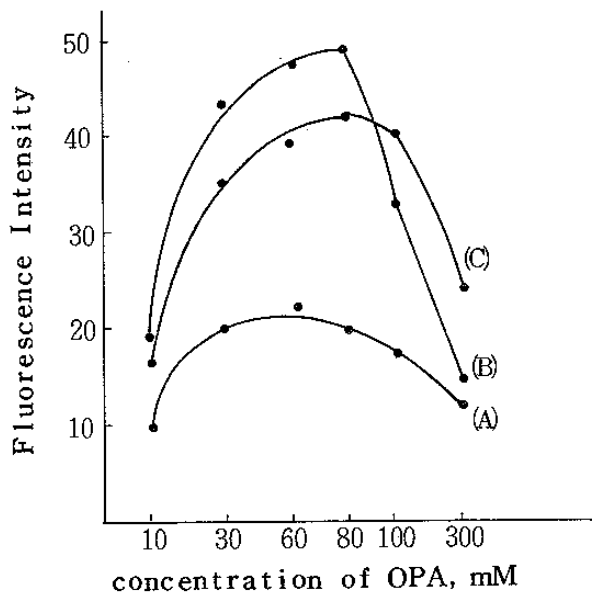


Fig. 3 Effect of OPA and MCE concentration
Concentration of Ammonia is 3 mg/l
(A): MCE 1 mM (B): 30 mM
(C): MCE 60 mM

3-1-4 けい光の安定性

2-3の測定操作で、緩衝液の組成を変化させ

たときのけい光の安定性について検討した。

リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウムを用いて、pH 6.9, 0.2 M の 4 種類の緩衝液を調製した。

つまり、リン酸二水素ナトリウム-水酸化カリウム、リン酸二水素ナトリウム-水酸化ナトリウム、リン酸二水素カリウム-水酸化ナトリウム、リン酸二水素カリウム-水酸化カリウムの 4 種類の緩衝液について、そのけい光強度を調べたところ、いずれも、混合後約 40 分で最大けい光強度に達し、短いものでも、その後約 30 分間は安定しており、その強度は大差なかった。

特に、これらの組み合わせのなかで、リン酸二水素ナトリウム-水酸化カリウムから成る緩衝液が、最大けい光強度を 1 時間保持するなど、その安定性に優れていた。

3-2 検量線及び精度

2-3の測定操作により作成した検量線の直線範囲は、0.1~7 mg/l であり、0.4 mg/l 及び 4 mg/l のアンモニア溶液に対し 10 回の繰り返し測定を行ったところ、変動係数は、それぞれ、2.0% 及び 1.2% であった。

3-3 妨害物質の影響

アミノ酸、アミンの影響を調べるために、その濃度がおおよそ 5 mM となるように調製した溶液について、そのけい光強度を測定した結果を Table 1 に示した。

本法では、グアニジン、プロリン、ヒドロオキシプロリンが正の誤差を与えること以外、他のアミノ酸、アミンの妨害の程度は低いことが判った。

3-4 添加回収実験

札幌市内の河川の中流域より採取した河川水、汚泥地に位置する井戸より採水した地下水、7 月中の雨水について、おのおの三検体についての回収率及び変動係数を Table 2 に示した。

これによると、地下水が最も回収率が良く、し

かも、変動が少なく、次いで雨水、河川水の順であった。

Table 1 Interference of Various Amino Acids and Amines

Compound	concn of Compound (mM)	concn of Ammonia (mg/l)
Aspartic Acid	5.1	N. D
Arginine Monohydrochloride	4.9	N. D
Cysteine	5.0	N. D
Glutamic Acid	5.0	N. D
Glycine	5.1	N. D
Guanidine Hydrochloride	5.1	0.11
Histidine Monohydrochloride	5.1	N. D
Hydroxyproline	5.1	0.10
Isoleucine	5.0	N. D
Leucine	5.0	N. D
Lysine Monohydrochloride	5.0	N. D
Methionine	5.0	N. D
Phenylalanine	5.0	N. D
Proline	4.8	0.10
Serine	5.5	N. D
Threonine	4.7	N. D
Tryptophan	5.0	N. D
Tyrosine	5.1	N. D
Valine	5.0	N. D
Methylamine	5.0	N. D
Ethylamine	5.0	N. D
Diethylamine	5.0	N. D
Trimethylamine	5.0	N. D

Table 2 Summary of Ammonia Recovery Experiments

Sample (n = 5)	Found (mg/l)	Recovery (%)		RSD (%)	
		4 μ g	20 μ g	4 μ g	20 μ g
River Water	0.50	85	80	2.3	2.0
	0.30	83	81	2.0	2.3
	0.31	89	83	2.0	2.4
Ground-water	2.4	90	86	1.5	1.2
	1.2	89	88	1.7	1.3
	0.92	99	94	1.4	1.3
Rain Water	0.20	88	87	1.9	1.5
	0.18	88	81	1.8	1.3
	0.16	89	83	1.8	1.4

4 結 語

- 1) 緩衝液の組成をリン酸二水素ナトリウム及び水酸化カリウムとし、その液性を中性にすることにより、非常に安定したけい光体を得られた。
- 2) アミノ酸、アミンの妨害の程度が非常に低いことが判った。
- 3) 検量線の直線範囲は 0.1~7mg/l と非常に広範囲であった。

5 文 献

- 1) 日本水道協会編：“上水試験方法”，p. 265 ~ 268 (1978)
- 2) 日本工業標準調査会審議：“工場排水試験方法”，p. 107 ~ 115 (1981) (日本規格協会)
- 3) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解”，p. 741 ~ 742 (1980)，金原出版
- 4) APHA：“Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”，16th Ed.，p. 382 ~ 383 (1985)
- 5) T. Aoki, S. Uemura, M. Munemori: Anal. Chem., 55, 1620 ~ 1622 (1982)
- 6) N. D. Danielson, C. M. Conroy: Talanta. 29, 401 ~ 404 (1982)
- 7) 三笠博司, 本水昌二, 桐栄恭二: 分析化学, 54, 518 ~ 521 (1985)