

# 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

## Fluometric Determination of Ammonia in the Groundwater with *o*-Phthalaldehyde

佐藤 稔 大谷 倫子 川村 貢  
浅井 建爾 清水 良夫 高杉 信男

Minoru Sato, Tomoko Otani, Mitsugu Kawamura,  
Kenji Asai, Yoshio Shimizu and Nobuo Takasugi

2-メルカプトエタノールの存在下でアンモニアとオルトフタルアルデヒドとが縮合してけい光を呈することを利用した数例の定量法の報告がある。これらの方法を改良した結果、より安定したけい光強度が得られ、0.1~2.0 mg/lの範囲で検量線が直線性を示した。これを地下水中のアンモニアの定量へ応用したところ少量の試料で短時間の分析が可能であった。

### 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、地球上には広く分布している。また、この物質は水系の汚染を示す有力な指標の一つともなっている。

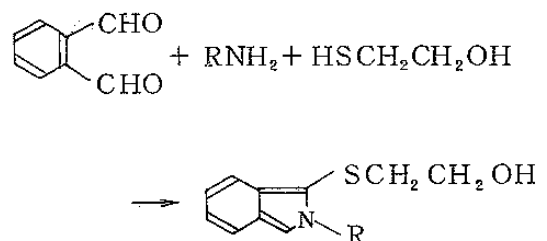
このアンモニアの定量法には、現在、比色法（ネスラー法<sup>1)</sup>、インドフェノール法<sup>2)</sup>及びこの変法<sup>3)</sup>）、イオン電極法<sup>4)</sup>、イオンクロマトグラフィー法<sup>5)</sup>、紫外部吸光法<sup>6)</sup>などの方法があり、このうち、比色法のインドフェノール法が公定法<sup>7),8)</sup>として最も広く採用されている。

しかし、インドフェノール法は、分析に使用する試薬に、水質汚濁防止法及び下水道法で規制を受けるフェノールを含んでいる。

このため、フェノールなどの有害物質を極力使用しない方法、いわゆるクリーンアナリシスを旨とした分析法の一つとして、けい光試薬であるオルトフタルアルデヒドを用いるアンモニアの定量

法に着目した。

けい光試薬であるオルトフタルアルデヒドを用いる方法は、1971年 Roth ら<sup>9)</sup>がアミノ酸の定量法として開発し、その後、1976年 Simons ら<sup>10),11)</sup>は、*n*-プロピルアミンを用いて、その反応機構を解明し、けい光物質の一般構造式が、1-ヒドロキシエチレンチオ-2-アルキル置換イソインドールであることを報告している。



この分析方法は、アミン類の定量、ペプチドの構成アミノ酸の決定など生化学の分野で広く応用されている。

また、1982年 Danielson ら<sup>12)</sup> によってボイラー缶水中のアンモニアの定量、1983年青木ら<sup>13)</sup> によって河川水中及び降水水中のアンモニアの定量が報告されている。

ここで、我々はこれらの方法を応用して、地下水中のアンモニアの定量法について検討を行った。

## 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) を使用した。

## 2-2 試薬

オルトフタルアルデヒド (以下、OPA と略す) 及び2-メルカプトエタノール (以下、MCE と略す) は生化学用 (和光純薬工業製) を、メタノールはドータイト試薬ルミナゾール (和光純薬工業製) を、エタノールはけい光分析用 (関東化学製) を、ホウ酸はアミノ酸自動分析用 (和光純薬工業製) を使用した。

他の試薬は市販特級品をいずれもそのまま使用した。

水は Millipore Milli Q オーガー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、ホウ酸塩緩衝液を 5 ml, OPA 溶液を 0.5 ml, MCE 溶液を 0.5 ml 加えて混合し、25°C 水浴中で10分間保温した後、励起波長 335 nm (スリット幅 5nm) で、けい光波長 455 nm (スリット幅 10 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後、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 pH の影響

0.2 M ホウ酸溶液に 2N 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH が 8, 9, 9.5, 10 の 4 種類のホウ酸塩緩衝液を調製し、pH とけい光強度の関係を調べたところ Fig. 1 に示す結果が得られた。

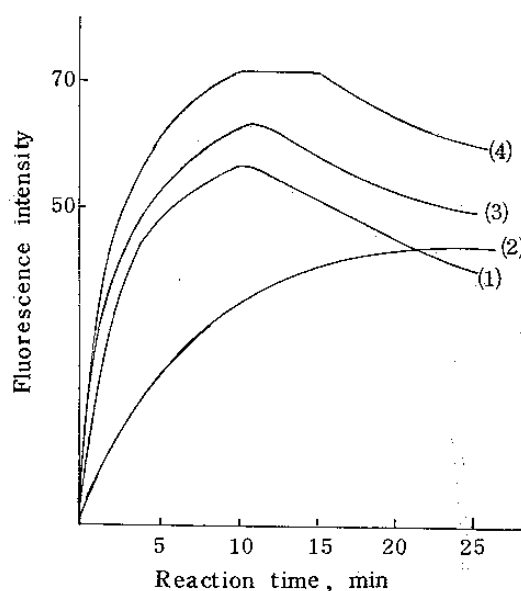


Fig. 1 Effect of pH and reaction time on the fluorescence intensity of ammonia.

(1): pH 10, (2): pH 8, (3): pH 9,  
(4): pH 9.5  $\text{NH}_4^+$ : 0.8 mg/l,  
OPA:  $2 \times 10^{-3}$  M, MCE:  $7 \times 10^{-2}$  M.

この結果、pHが8のときは、他の3つと比べるとそのけい光強度は弱く、pHが9, 9.5, 10のときは、それぞれのけい光強度に差があるものの、ほぼ類似のパターンを示し、約10分後にその最大値が得られた。

ことに、pH9.5のとき、そのけい光強度は最大であり、最も安定していた。

### 3-1-2 OPA 濃度及び MCE 濃度

OPA 溶液の濃度を  $1 \times 10^{-3}$  M から  $1 \times 10^{-2}$  M までの範囲で、また、MCE 溶液の濃度を  $1 \times 10^{-4}$  M から  $1 \times 10^{-1}$  M までの範囲で、それぞれ

の濃度を変化させてけい光強度を調べた。

一般的に、OPA 及び MCE 濃度が高くなるとそのけい光強度も高くなり、最大強度に達する時間及び最大けい光保持時間も短くなる傾向にある。

これらの組み合わせで、けい光強度及びその安定性について検討した結果、OPA 濃度が  $2 \times 10^{-3}$  M 及び MCE 濃度が  $7 \times 10^{-2}$  M のとき Fig. 2 に示すような良好なけい光強度が得られた。

これによると、けい光強度は OPA 濃度  $1 \times 10^{-3}$  M から  $2 \times 10^{-3}$  M までの間で増加の傾向にあり、 $2 \times 10^{-3}$  M の時その強度は最大で安定していた。

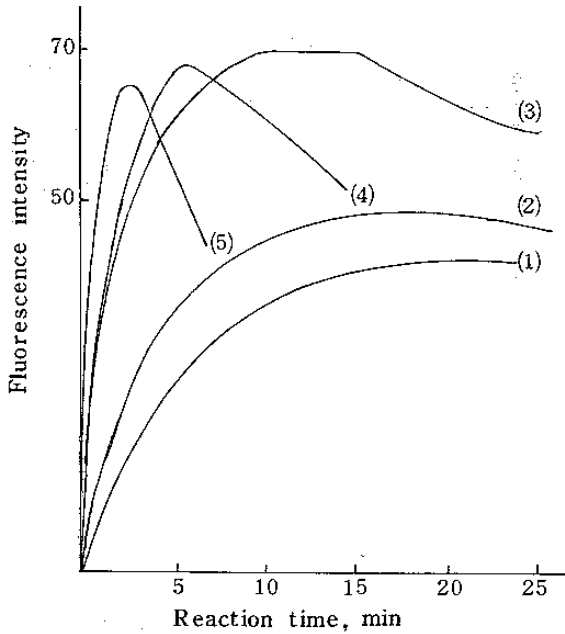


Fig 2 Influence of OPA concentration on the fluorescence intensity of ammonia.

- (1) :  $1 \times 10^{-3}$  M, (2)  $1.5 \times 10^{-3}$  M,  
 (3) :  $2 \times 10^{-3}$  M, (4)  $3 \times 10^{-3}$  M,  
 (5) :  $1 \times 10^{-2}$  M,  
 $\text{NH}_4^+$  :  $0.8 \text{ mg/l}$ , Buffer pH 9.5,  
 MCE :  $7 \times 10^{-2}$  M.

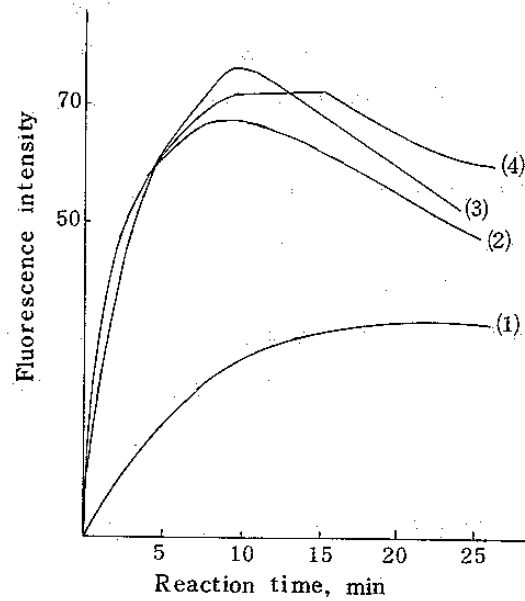


Fig 3 Effect of solvents on the fluorescence intensity of ammonia.

- (1) : OPA (Ethanol) — MCE (Ethanol)  
 (2) : OPA (Methanol) — MCE (Ethanol)  
 (3) : OPA (Methanol) — MCE (Methanol)  
 (4) : OPA (Ethanol) — MCE (Methanol)  
 $\text{NH}_4^+$  :  $0.8 \text{ mg/l}$ , Buffer : pH 9.5,  
 OPA :  $2 \times 10^{-3}$  M, MCE :  $7 \times 10^{-2}$  M.

### 3-1-3 溶媒の影響

既報の文献において、OPA 及び MCE のいずれもエタノールに溶解した報告<sup>9),14)</sup>や、OPA をメタノールに、また、MCE をメトキシエタノールに溶解した報告<sup>12)</sup>があり、ことに、メトキシエタノールを使用した場合は、メタノール使用の場合よりもけい光強度が約1.3倍増加したことが報告されている。

このことは、溶媒の種類を選択することにより、けい光強度が変化することを示唆している。

そこで、OPA 及び MCE をそれぞれエタノール及びメタノールに溶解し、4通りの組み合わせをつくりけい光強度及びその経時変化を Fig. 3 に示した。

この結果、OPA 及び MCE の両方をエタノールに溶解したものは、けい光強度が徐々に増加していくのに対し、他の3つの組み合わせは、ほぼ類似したパターンを示し、約10分後に最大けい光強度に達した。

このなかで、OPA をエタノールに溶解し、MCE をメタノールに溶解したものの組み合わせは、最大けい光強度を5分間保持しており、その強度も比較的高く、安定性も優れていた。

従来、アンモニアと OPA との反応生成物は不安定であることが報告<sup>13)</sup>されていたが、この方法であるとより安定したけい光強度が得られることがわかった。

### 3-1-4 最適条件

以上の検討結果より、最適条件を次のように決めた。

OPA は濃度  $2 \times 10^{-3}$  M のエタノール溶液、MCE は濃度  $7 \times 10^{-2}$  M のメタノール溶液とし、緩衝液は pH 9.5 のホウ酸塩溶液とした。

### 3-2 検量線及び精度

検量線の直線範囲は、 $0.1 \sim 2.0$  mg/l であり、 $0.8$  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4.5%であ

った。

### 3-3 添加回収実験

泥炭地の地層中には鉄が多く含まれることから、地下水中の窒素化合物は還元されて、アンモニアの占める割合が多いため、泥炭地に位置する井戸より採水した試料(アンモニア濃度  $0.91$  mg/l)にアンモニア  $1$   $\mu$ g 及び  $5$   $\mu$ g 添加したときの、回収率はそれぞれ110%(変動係数6.5%)と90%(変動係数2.3%)であった。

## 4 結 語

- 1) けい光試薬の OPA をエタノールに、また、MCE をメタノールに溶解することにより、青木らよりも安定したけい光強度が得られた。
- 2) 検量線の直線範囲は  $0.1 \sim 2.0$  mg/l であり、公定法より短時間での定量が可能である。

## 5 文 献

- 1) APHA: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 15th Ed., p. 356~360 (1980)
- 2) J. A. Russel: J. Biol. Chem., 156, 456~461 (1944)
- 3) APHA: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 15th Ed., p. 360~361 (1980)
- 4) M. E. Lopez et al: Anal. Chem., 54, 2085~2089 (1982)
- 5) S. A. Bouyoucos: Anal. Chem., 49, 401~403 (1977)
- 6) P. N. Vijan et al: Anal. Chem., 53, 1447~1450 (1981)
- 7) 日本水道協会編: "上水試験方法", p. 265~268 (1978)
- 8) 日本薬学会編: "衛生試験法・注解", p. 741~742 (1980), 金原出版
- 9) M. Roth: Anal. Chem., 43,

- 880~883 (1971)
- 10) S. S. Simons, D. F. Johnson : J. Am. Chem. Soc., **98**, 7098 ~ 7099 (1976)
- 11) S. S. Simons, D. F. Johnson : Anal. Biochem., **90**, 705 ~ 725 (1978)
- 12) N. D. Danielson, C.M. Conroy : Talanta, **29**, 401~404 (1982)
- 13) T. Aoki et al : Anal. Chem., **55**, 1620 ~ 1622 (1982)
- 14) S. Taylor et al : Anal. Biochem., **60**, 153 ~ 162 (1974)