

化学発光-フローインジェクション分析法による 自然水中のフミン酸の定量

胡 新成, 北野 優, 竹中 規訓,
坂東 博, 前田 泰昭^{®*}, 張 大年^{**}

(1994年6月21日受理)

アルカリ性の水溶液中で、フミン酸と次亜臭素酸ナトリウムとの反応によって化学発光が生じることを見いだした。化学発光の最大波長は 560~600 nm であった。この化学発光反応を利用して、自然水中の微量のフミン酸のフローインジェクション分析法を開発した。又、 Fe^{2+} はこの化学発光反応に対して増感効果があることが分かった。フミン酸に対する検出限界は 0.01 ppm である (0.5 ml 試料を注入する場合)。この化学発光反応は非常に速いので、試料と次亜臭素酸ナトリウムとの混合は二重管を用いて、発光セルの中で行った。過酸化水素、尿素やアンモニウムイオンと次亜臭素酸ナトリウムとの反応によっても化学発光が生じるので、フミン酸の測定を干渉する。アンモニウムイオンの干渉はオンライン陽イオン交換カラムによって除去された。自然水中に存在する過酸化水素や尿素の濃度は低いため、それらの干渉は無視できる。

1 ま え が き

フミン酸は直接人体に害がないが、上水中にフミン酸が含まれると、塩素処理過程を経て、トリハロメタンのような有害物質を生成するおそれがある¹⁾。又、フミン酸は土壌あるいは自然水中の難溶解性の有機物の移動に寄与し、汚染物質の広域への広がりを助けていることが指摘されている²⁾。

フミン酸は分子量が数千から数十万までであり、ポリヘテロ縮合体に様々な官能基が結合した無定型高分子である。上水水源の水質を把握するために、フミン酸の測定が重要な指標の一つとなってきた。従って、高感度、迅速、しかも、低コストのフミン酸の測定方法が必要である。現在、フミン酸の測定法として、TOC 測定法³⁾、吸光度法⁴⁾、蛍光測定法⁵⁾などが挙げられる。これらの方法では試料中の他の有機化合物との分離定量に問題がある。化学発光法は、検出感度が高く、定量範囲が広く、装置が簡単であり、応答が速いなどの利点があり、多くの分野で応用されている。著者らは、過酸化水素-ホルムアルデヒド-フミン酸化学発光システムを報告

したが⁶⁾、このシステムの反応系は比較的複雑であり、検出限界は 0.05 ppm で、一層高感度化が望まれた。本研究では、更に簡単な化学発光反応系、次亜臭素酸ナトリウムとフミン酸の化学発光反応系を見だし、この化学発光反応とフローインジェクション分析法 (FIA) を組み合わせ、自然水中のフミン酸を迅速に、簡便に、高感度に測定することができるので、ここに報告する。

2 実 験

2.1 装 置

FIA/化学発光システム: Fig. 1 に測定装置の概略図を示す。本システムは二つの流路から構成される。一つは次亜臭素酸ナトリウム溶液 (A) であり、他の一つはキャリアーの蒸留水の流路 (B) であり、これらはペリスタポンプ (C) によって送液される。試料溶液は六方インジェクター (D) で系に 0.5 ml が定量的に注入される。アンモニウムイオンの干渉を除去するために、インジェクターの後に、オンライン陽イオン交換カラム (G) (3.5 i.d.×150 mm, 強酸性陽イオン交換樹脂粒状 Amberlite IR-120B, ポリスチレンスルホン酸型, オルガノ製) を設置した。発光セルは、渦巻状のガラス管

* 大阪府立大学工学部: 593 大阪府堺市学園町 1-1

** 華東理工大学: 上海市梅院路 130 号

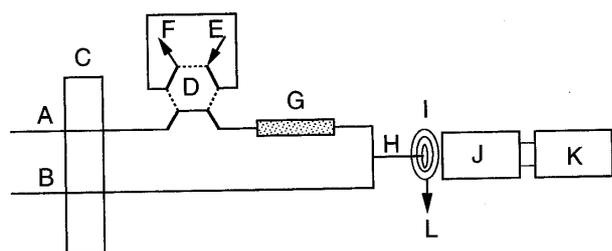


Fig. 1 Schematic diagram of chemiluminescence-flow injection system

A: carrier stream of distilled water; B: stream of hypobromite solution; C: paristaltic pump; D: six way injector; E: injection sample; F: waste; G: cation exchange column; H: double concentric tube; I: scroll CL cell; J: photomultiplier tube and amplifier; K: recorder; L: waste

(I) (内径 2 mm, 外径 3 mm, 総長 15 cm) を使用した。試料と試薬との混合は発光セル内に設置している二重管 (H) の出口で行った。二重管の内管には内径 0.5 mm, 外径 1.0 mm のテフロンチューブで, 外管は内径 3/32, 外径 5/32 インチのタイゴンチューブを用いた。発光セルと二重管型混合器の概略図を Fig. 2 に示す。次亜臭素酸ナトリウム溶液を内管で送液し, キャリヤ溶液と試料溶液を外管で送液した。二重管の内管の長さを変化させ, 次亜臭素酸ナトリウム溶液と試料溶液の混合時点から発光セルまでの距離が化学発光強度に及ぼす影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示した。この実験から, 最大化学発光強度を得るために, 次亜臭素酸ナトリウム溶液と試料溶液の混合はできるだけ発光セルに近いほうが良いことが分かった。従って, 化学発光-FIA システムの試料と試薬との混合は Fig. 2 に示したように発光セル中で行った。発光強度は光電子増倍管 (J) (浜松ホトニクス製 R 374) によって検出した。光電子増倍管の印加電圧を -800 V とした。

化学発光スペクトル測定装置: 化学発光を格子分光器 (Opto-Line Inc., 310.01/L) を用いて, 単色光に分光し, フォトンカウンター (浜松ホトニクス C1 230 型, 光電子増倍管は浜松ホトニクス R 649 型) で検出した。スペクトルを測定する場合, 発光セルは一本直型ガラス管 (内径 2 mm, 外径 3 mm) を用いた。この直型セルは分光器の入り口スリットの直前のところに設置した。二重管混合器はこの直型発光セルとタイゴンチューブでつながれている。

TOC の測定には島津 TOC-500 型を用いた。

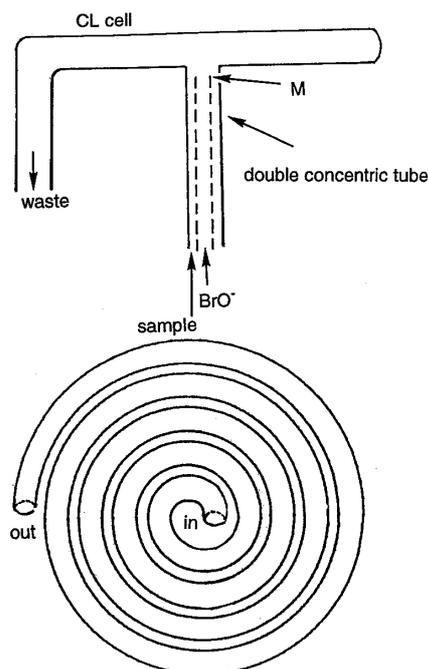


Fig. 2 Schematic diagram of chemiluminescence cell

M is the outlet of the inner part of the double concentric tube, where humic acid solution and sodium hypobromite solution were mixed. Above is the side view of the CL cell; below is the front view.

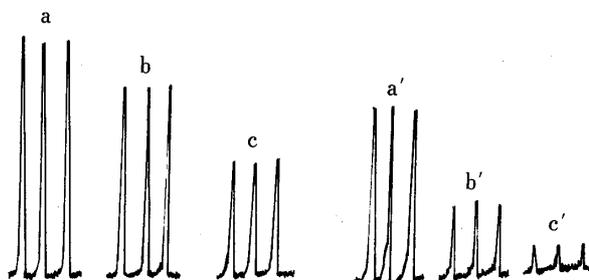


Fig. 3 Comparison of the chemiluminescence intensities between mixing humic acid and hypobromite in the inner part of the chemiluminescence cell (a and a') and before reaching the cell at 5.0 cm (b and b') and 10 cm (c and c')

a, b and c: 1.5 ppm humic acid; a', b' and c': 0.375 ppm humic acid + 0.1 mM ferrous ion

2.2 試薬

次亜臭素酸ナトリウム水溶液: 水酸化ナトリウム 10 g を 400 ml の超純水の中に溶かし, この溶液の中に飽和臭素水溶液を 10 ml 加え, 超純水で全量を 500 ml にした。これを保存溶液として褐色瓶に入れて冷蔵庫に保存

した。

フミン酸の精製とその標準溶液: 市販のフミン酸 (和光純薬工業製試薬化学用) を 0.01 M の水酸化ナトリウムに溶かし, 2 号濾紙で濾過し, 沈殿物を除去し, 濾液を塩酸で酸性にして, フミン酸を沈殿させた. この操作を 2 回繰り返して, 不純物を除き, 最後に塩酸で沈殿させた沈殿物を蒸留水で十分に洗浄し, 塩分を除いた. 得られたフミン酸は凍結乾燥により固体として保存した. 精製したフミン酸を 0.1000 g 採り, 0.001 M の水酸化ナトリウム溶液に溶かし, 全量を 1000 ml とし, 100 ppm のフミン酸標準溶液とした.

Fe^{2+} 溶液: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.055 g 採り, 0.025 M の H_2SO_4 に溶かし, 全量を 200 ml とした.

その他のすべての試薬は和光純薬製試薬特級を用いて, 超純水で溶解して, 調製した.

3 結果及び考察

3.1 反応条件の最適化

次亜臭素酸ナトリウムとアンモニウムイオン⁷⁾及び尿素⁸⁾との反応も化学発光を生ずることを既に報告した. フミン酸の定量がアンモニウムイオンや尿素による干渉を受けることが予想される. 反応条件の最適化では, アンモニウムイオンや尿素の化学発光をできるだけ小さくできるようにした.

3.1.1 次亜臭素酸ナトリウム濃度 Fig. 4 は次亜臭素酸ナトリウムの濃度がフミン酸, アンモニウムイオン及び尿素の化学発光強度に及ぼす影響を示した. 次亜臭素酸ナトリウムの濃度の増加とともに, 尿素の発光強度が対数的に増加するのに対して, フミン酸やアンモニウムイオンの発光強度の変化は小さいことが分かった. 4.0 mM の次亜臭素酸ナトリウム水溶液を用いると, 尿素の化学発光は非常に小さくなるが, フミン酸の発光強度はそれほど減少しないことが分かった. 従って, 4.0 mM を最適の次亜臭素酸ナトリウム濃度とした.

3.1.2 水酸化ナトリウムの濃度 Fig. 5 は次亜臭素酸ナトリウムの中の水酸化ナトリウムの濃度が化学発光強度に及ぼす影響を示した. 水酸化ナトリウムの濃度の増加とともに, フミン酸の化学発光はやや増え, アンモニウムイオンの化学発光はやや減少するが, 尿素の化学発光の変化はあまりない. 高濃度の水酸化ナトリウムを用いることは操作上不便であるため, 水酸化ナトリウム濃度を 0.5 M とした.

3.1.3 次亜臭素酸ナトリウム溶液及びキャリアーの流量 次亜臭素酸ナトリウム溶液とキャリアーの流量を変えて, それらがフミン酸の化学発光強度に及ぼす影

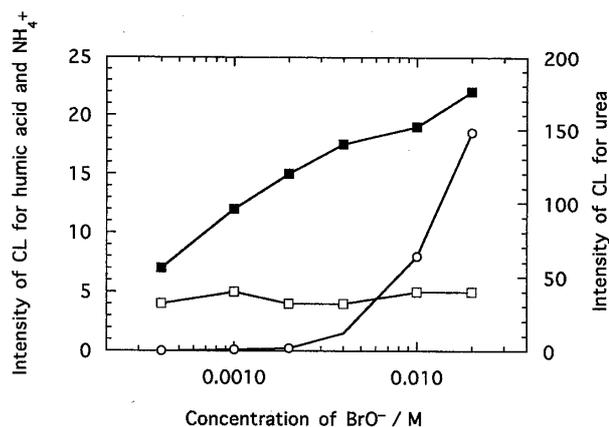


Fig. 4 Effect of hypobromite concentration on the chemiluminescence intensities of humic acid (■), urea (○) and ammonium ion (□)

Humic acid: 1.5 ppm; Urea: 0.1 mM; Ammonium ion: 0.1 mM; Sodium hydroxide: 0.5 M

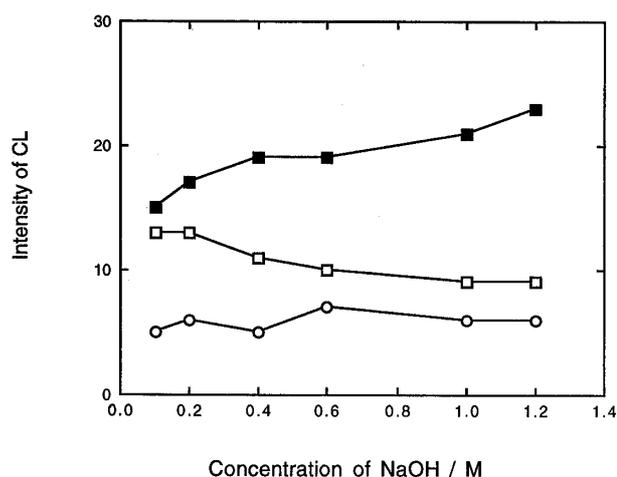


Fig. 5 Effect of sodium hydroxide concentration on the chemiluminescence intensities of humic acid (■), urea (○) and ammonium ion (□)

Humic acid: 1.5 ppm; Urea: 0.1 mM; Ammonium ion: 0.1 mM; Sodium hydroxide: 0.5 M

響を調べた. 両方とも, 流量が多いほど, フミン酸の発光強度が高かった. 本実験では, 次亜臭素酸ナトリウム溶液の流量とキャリアーの流量を 8.0 ml/min とした.

3.2 化学発光のスペクトル

化学発光スペクトル測定用の装置を用いて, 0.1% のフミン酸と 0.2 M の次亜臭素酸ナトリウムを反応させ, その化学発光スペクトルを測定し, Fig. 6 に示し

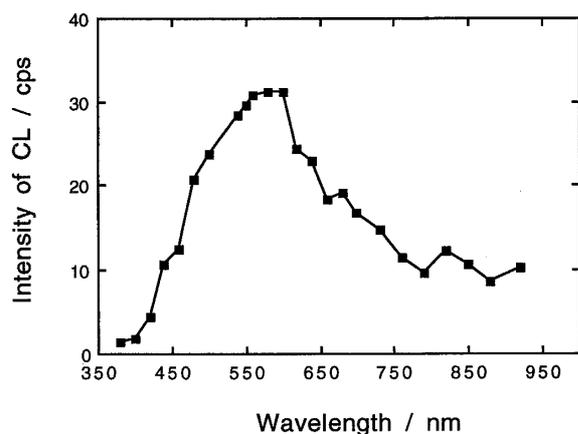


Fig. 6 Chemiluminescence spectrum of humic acid reacting with hypobromite

た。次亜臭素酸ナトリウムとフミン酸の化学発光のスペクトルは 560~600 nm の最大波長を示すブロードなものである。Slawinska ら⁹⁾は、没食子酸あるいはポリフェノールと過酸化水素の化学発光反応の発光種が一重項酸素であると報告した。フミン酸は構造上ポリフェノールを含んでいて没食子酸と類似しており、フミン酸と次亜臭素酸の化学発光スペクトルも没食子酸の化学発光のスペクトルに近いので、フミン酸の化学発光の発光種の一つが励起状態の一重項酸素ではないかと推定される。しかし、ブロードなスペクトルであるので、フミン酸の化学発光はその他の発光種にもよると考えられる。詳細については今後検討する予定である。

3.3 干渉試験

ルミノールの化学発光はルミノールが酸化剤によって酸化され化学発光を生ずるので、多くの酸化剤がルミノールを酸化し化学発光を起こすことがよく知られている¹⁰⁾。しかし、本研究で用いた次亜臭素酸ナトリウムは、限られた化合物でしか化学発光を生じない。つまり、この化学発光反応の選択性は高いといえる。次亜臭素酸ナトリウムと種々の物質、主に還元性物質との反応が化学発光を起こすかどうかについて検討を行った。その結果を Table 1 に示す。多くの物質は化学発光を生じないが、過酸化水素、ピロガロール、尿素やアンモニウムイオンが次亜臭素酸ナトリウムと化学発光反応を起こすので、もし、これらの物質がフミン酸と共存すると、フミン酸の定量を強く干渉する。アンモニウムイオンの干渉は Table 2 に示すように陽イオン交換カラムを用いることによって除去することができた。0.01 mM 以下の尿素は干渉しないが、それ以上になるとフミン酸

Table 1 Relative chemiluminescence intensities for various substances

Substance and concentration/mol dm ⁻³	Ratio of CL intensity with 1 ppm humic acid	
Hydrogen peroxide	0.005	1.3
Urea	0.0001	0.5
Ammonium chloride	0.0001	0.7
Hydroxylamine	0.025	0.03
Thiourea	0.01	0.03
Pyrogallol	0.001	0.5
Histidine	0.01	1.2
Ascorbic acid	0.01	no signal
Hydroxylamine	0.025	0.03
Hydrazine	0.0028	0.06
Sodium formate	0.01	no signal
Formamide	0.01	no signal
Oxamide	0.001	0.5
α -Alanine	0.01	0.02
β -Alanine	0.01	no signal
Methylamine	0.002	no signal
Methylamine	0.02	no signal
Ethyldiamine	0.02	no signal
Trimethylamine	0.02	no signal
Diethylamine	0.02	no signal
Sodium nitrite	0.01	no signal
Sodium sulfite	0.01	no signal

Table 2 Removal of interference by ammonium ion using an on-line cation exchange column

samples	Intensity of CL	
	Without column	With column
Humic acid 1.5 ppm	24	13
NH ₄ ⁺ 0.01 mM	0	0
NH ₄ ⁺ 0.05 mM	4	0
NH ₄ ⁺ 0.1 mM	8	0
Urea 0.1 mM	11	5
Urea 0.01 mM	1	0
Humic acid 1.5 ppm + NH ₄ ⁺ 0.01 mM	60	13
Humic acid 1.5 ppm + NH ₄ ⁺ 0.05 mM	140	15
Humic acid 1.5 ppm + urea 0.01 mM	24	13
Humic acid 1.5 ppm + urea 0.1 mM	36	20

Note: in this experiment, ferrous salt is not added to the sample solutions.

の測定を干渉した。又、亜硝酸イオン、亜硫酸イオンは化学発光反応を起こさないが、これらが次亜臭素酸ナトリウムと酸化還元反応を起こし、次亜臭素酸ナトリウムを消費するので、フミン酸と次亜臭素酸ナトリウムの反

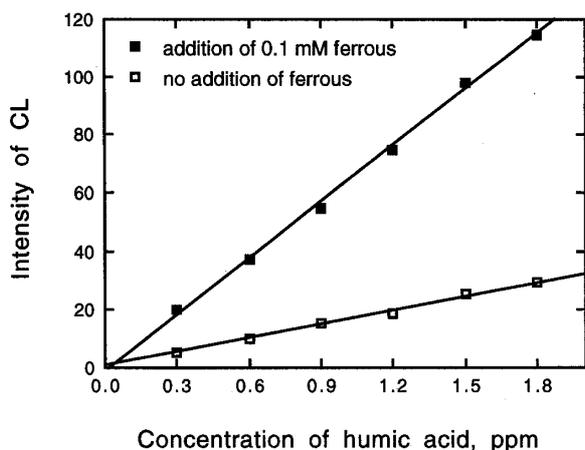


Fig. 7 Enhancing effect of ferrous ion on the chemiluminescence intensity

Hypobromite: 0.004 M; Sodium hydroxide: 0.5 M

応にマイナスの影響があった。但し, 1.0 mM 以下の亜硝酸イオンや亜硫酸イオンは干渉しなかった。自然水中にはこのような高い濃度の亜硝酸イオン, 亜硫酸イオンが存在しないので, 実際にはこれらのイオンによる干渉は無視できると考えられる。又, 金属陽イオンの干渉も検討した。ほとんどの金属イオンが干渉しないが, Fig. 7 に示したように, Fe^{2+} の添加によりこの発光反応に増感効果が見られた。これについては後で詳しく述べる。

3・4 オンライン陽イオン交換樹脂カラムによるアンモニウムイオンの干渉の除去

アンモニウムイオンの干渉を除去するために, Fig. 1 に示したように, サンプルインジェクターの後に付けた陽イオン交換カラムを用いてアンモニウムイオンを除去する効果を検討した。その結果を Table 2 に示した。Table 2 によると, 0.05 mM 以下のアンモニウムイオンの干渉は陽イオン交換カラムを用いて除去できることが分かった。又, 陽イオン交換カラムを使わない場合, フミン酸とアンモニウムイオンの混合溶液の発光強度がフミン酸とアンモニウムイオンの単独溶液の発光強度の和よりずっと大きいことが分かった。これは, アンモニウムイオンの化学発光分析法⁷⁾に対して, フミン酸の添加による高感度化が実現できる可能性を示している。又, アンモニウムイオンとフミン酸の混合溶液のこのような相乗効果は陽イオン交換カラムを用いることによってほとんどなくなった。



Fig. 8 Precision of this chemiluminescence method
Humic acid: 0.075 ppm; Hypobromite: 4 mM;
Sodium hydroxide: 0.5 M; Ferrous: 0.1 mM. With
the cation exchange column

3・5 Fe^{2+} の増感効果

前述のように Fe^{2+} はフミン酸と次亜臭素酸ナトリウムの化学発光に増感効果がある。しかし, Fe^{2+} の錯体イオン, 例えば, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, Fe-EDTA^{2-} や Fe^{3+} の場合では, 増感効果はなかった。又, Fe^{2+} とフミン酸の混合溶液が陽イオン交換カラムを通過してからも, 増感効果があることが分かった。これらのことから, Fe^{2+} の増感効果は Fe^{2+} とフミン酸の錯体形成に関連していると推定される。しかし, Fe^{2+} の増感効果の詳細はまだ分かっていないので, 今後更に詳しく検討が必要である。なお, 次亜臭素酸ナトリウムと尿素や次亜臭素酸ナトリウムとアンモニウムイオンの化学発光には Fe^{2+} の添加による増感が見られなかった。

3・6 検出限界と精度

得られた最適条件で, 0.1 mM の Fe^{2+} を含有している 0.075 ppm のフミン酸を 10 回測定したシグナルの例を Fig. 8 に示した。その相対標準偏差は 2.9% であった。検出限界は $S/N=3$ として, フミン酸に対して 0.01 ppm であった。0.01~2.0 ppm の範囲でフミン酸濃度と発光強度との間に良好な直線関係が得られた。

3・7 実試料への応用

本方法を自然水中のフミン酸の定量に応用した。試料は, 河川水, 池水, 水道水や雨水などを用いた。採取した水試料は, まず 2 号濾紙で濾過してから, そのまま直接化学発光強度を測定した。その結果を Table 3 に示す。又, これらの試料の TOC を測定し, Fig. 9 にフミン酸濃度と TOC との間の相関を示し, 相関係数は 0.844 であった。Fig. 9 によると, 自然水の中の TOC は平均的に約 10% がフミン酸であると考えられる。本方法は, 高感度で, しかも簡便, 迅速であるので, 自然水中のフミン酸の定量に適用できることが分かった。

Table 3 Humic acid concentrations in natural waters determined by the CL-method

Samples	Humic acid, ppm
Yamato river (Osaka)	1.86
Yamato river (Nara)	0.31
Treated sewage	0.16
Fudai pond	1.34
Fukai pond	1.89
Rain water	0.97
Rain water under a fir [†]	1.27
Rain water under a cherry ^{††}	0.10
Tap water	0.24
Komyo pond	0.46
Takehada reservoir	0.24

[†] This sample was diluted 3.4/50 with distilled water; ^{††} This sample was diluted 1/50 with distilled water.

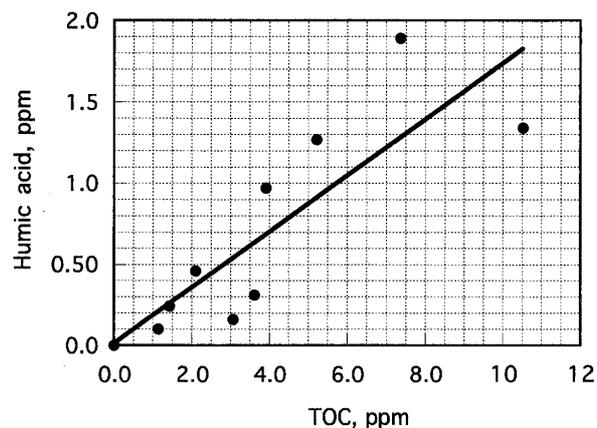


Fig. 9 Concentrations of humic acid in natural waters plotted as a function of TOC in the same sample

文 献

- 1) 中川美智代: 大阪府立大学工学部修士論文, p. 79, (1992).
- 2) C. T. Chiou, R. L. Malcolm, T. I. Briton, P. E. Kile: *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 502 (1986).
- 3) W. Agui: *Environ. Sci.*, **3**, 209 (1990).
- 4) Z. Genfa, P. K. Dasgupta, W. S. Edyemond, J. N. Marx: *Anal. Chim. Acta*, **243**, 207 (1991).
- 5) P. D. Carpenter, J. D. Smith: *Anal. Chim. Acta*, **159**, 299 (1984).
- 6) M. Kitano, Y. Ogasawara, X. Hu, N. Takenaka, H. Bandow, Y. Maeda: *Microchem. J.*, **49**, 265 (1994).
- 7) X. Hu, N. Takenaka, S. Takasuna, M. Kitano, H. Bandow, Y. Maeda, M. Hattori: *Anal. Chem.*, **65**, 3489 (1993).
- 8) X. Hu, N. Takenaka, M. Kitano, H. Bandow, Y. Maeda, M. Hattori: *Analyst* [London], **119**, 1829 (1994).
- 9) D. Slawinska, J. Slawinski: *Anal. Chem.*, **47**, 2101 (1975).
- 10) 今井一洋: “生物発光と化学発光—基礎と実験”, p. 110 (1989), (廣川書店).



Sensitive determination of humic acid in natural water by chemiluminescence-flow injection method Xincheng HU, Masaru KITANO, Norimichi TAKENAKA, Hiroshi BANDOW, Yasuaki MAEDA* and Danian ZHANG** (*Environmental Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture, 1-1, Gakuen-cho, Sakai-shi, Osaka 593; **East China University of Chemical Technology, 130 Meilong Road, Shanghai, China)

The chemiluminescence produced by the reaction between humic acid and hypobromite in alkaline solution has been applied to the determination of humic acid in natural water. The maximum wavelength of this chemiluminescence is 560~600 nm. The limit of detection for humic acid was 0.01 ppm. The interference from ammonium ion has been eliminated by using an on-line cation exchange column. The interference from urea can be neglected because the concentration of urea in natural water is very low. Ferrous cation enhances the chemiluminescence of humic acid and hypobromite, but, does not enhance that of urea or ammonium ion.

(Received June 21, 1994)

Keyword phrases

chemiluminescence; humic acid; hypobromite; FIA; ferrous.