

技術論文

アニソールを用いる地下水中の硝酸態窒素の吸光光度定量

郷 康 弘^{®1}

硝酸イオンの定量に用いられるフェノールの誘導体であるアニソールは、フェノールと異なり毒物・劇物には指定されておらず、難水溶性である。本研究では、アニソールのメタノール溶液を発色試薬溶液として用いて、48% 硫酸水溶液中、塩化物イオン存在下、硝酸イオンと反応・発色させ硝酸態窒素を定量する方法について検討した。前記条件下でのアニソールと硝酸イオンの反応により溶液はだいたい色に発色し、吸収極大波長 485 nm における見掛けのモル吸光係数は $1.22 \times 10^4 \sim 1.44 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ であった。フェノールの場合に比べて吸収極大波長は長波長であり、類似の水溶性試薬を用いる方法のいずれよりも高感度であった。このアニソールを用いる方法を地下水中の硝酸態窒素の定量に応用した。その結果、地下水中の硝酸態窒素の定量において満足すべき相関性が得られた。

1 緒 言

硝酸イオンに由来して発生する塩化ニトロシルによるフェノールのニトロ化発色反応を利用した硝酸イオン定量法¹⁾は、Velghe らによって報告されている。著者はフェノールが安価であることに着目して Velghe らの方法を天然水中の硝酸性及び亜硝酸態窒素の和の測定²⁾並びに下水中の全窒素測定³⁾に応用した。

また、水酸基を 2 個有する芳香族化合物であるレゾルシノールを用いる研究も Serrat により報告された⁴⁾。更にナフトール系の化合物であるクロモトローブ酸^{5)~9)}、1-ナフトール-8-スルホン酸を用いる研究¹⁰⁾が報告されている。

上述の芳香族化合物試薬はいずれも水溶性であるが、疎水性試薬については、Nakamura が 4,5-デヒドロキシクマリンを用いる硝酸イオンの溶媒（ベンゼン）抽出比色定量法を報告した¹¹⁾。しかし、溶媒抽出法では有害で可燃性の水に不溶の有機溶媒を使用する必要があるほか、有機溶媒廃液並びに有機溶媒で飽和された廃水も生じる。そこで、水に難溶性の試薬を均一溶媒系における発色反応へ応用することが可能ならば、硝酸イオンの分析における発色試薬の選択範囲が拡大され、より高感度な分析法が開発可能と期待できる。本研究では水に難溶性の疎水試薬であるアニソールのメタノール溶液を発色試薬溶液として用い、塩化物イオンを含む 48% 硫酸水溶液中で硝酸イオンと反応させると均一溶液となり発色反応が起こることを見いだしたので、この方法を利用した硝酸態窒素の定量法の開発を検討した。

本研究で開発した方法において、アニソールと硝酸イオンの反応により反応液はだいたい色を呈し、吸収最大波長は 485 nm であり、見掛けのモル吸光係数は $1.22 \times 10^4 \sim 1.44 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ であり、水溶性の芳香族化合物を用いた類縁の比色分析法のいずれよりも高感度であった。この方法は亜硝酸イオンを含まない地下水の硝酸イオンの定量に応用可能であった。

アニソールは、フェノールと異なり、毒物及び劇物取締法¹²⁾の毒物・劇物に該当しないほか、水質汚濁防止法¹³⁾の有害物質にも指定されていないので、試薬管理の点から、1-ナフトール-8-スルホン酸同様にフェノールより有利である。

2 実 験

2.1 試 薬

実験には下記のように調製した溶液あるいは試薬を用いた。

硝酸態窒素標準溶液：硝酸態窒素標準液 $\{\text{NO}_3^- \text{ (N として)}: 1000 \mu\text{g/mL}; \text{和光純薬製}\}$ を希釈して使用した。

アニソール $\{0.35\% \text{ (w/v)}\}$ 溶液：アニソール（特級，99.0% 以上，和光純薬製）0.35 g をメタノール（残留農薬・ポリクロロビフェニル試験用，和光純薬製）100 mL に溶解した。

塩化ナトリウム溶液：塩化ナトリウム（残留農薬用，99.5% 以上，和光純薬製）23.0 g を水にとかして 100 mL とした。

95% 硫酸：硫酸（特級，和光純薬製）を使用した。

¹ 熊本市環境総合研究所：862-0946 熊本県熊本市画図町所島 404-1

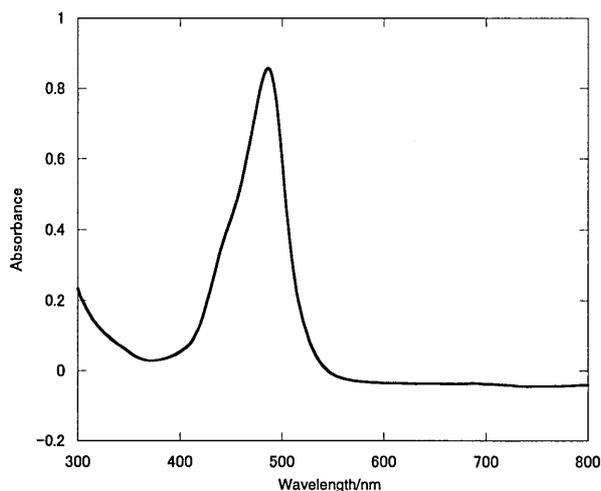


Fig. 1 Absorption spectrum of a final solution treated with the proposed procedure

Concentration of nitrate-nitrogen was 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Reference was water.

2・2 器具と装置

用いた器具と装置は下記のとおりである。

分光光度計 (V-550: 日本分光製): 485 nm の吸光度を測定する場合に、水を対照としてガラスセルを用いて測定した。300~800 nm の吸収スペクトルの測定には石英セルを用いた。

イオンクロマトグラフィー (DX-AQ: DIONEX 製): カラムは AS12A (4 mm) で (0.0135mMNaCO₃ + 0.0015mM NaHCO₃) の溶離液を流量 1.0 mL/min の条件で用いた。

栓付き試験管: 25 mL までの目盛り付きで、容量が約 30 mL の栓付き試験管を本法での発色操作に用いた。

メンブランフィルター (ポリエステル製で孔径が 0.45 μm のもの: ザルトリウス製): 地下水の硝酸性窒素を測定する場合に、事前に採取水の汙過を行うのに用いた。

2・3 硝酸性窒素の標準定量操作

試料水 (硝酸性窒素として 0 μg から 20.0 μg を含む) 10.0 mL を試験管に取り、23.0% 塩化ナトリウム溶液 0.5 mL と 0.35% アニソール溶液 1.0 mL を加えて試験管内の溶液をよく混合した後、95% 硫酸 10.0 mL を加えて反応後約 30 分放冷した。その間、試験管をよく振って発生する気体を取り除いた。その後、その一部をガラスセルに取り、485 nm における吸光度を測定した。また、検量線は以下の操作により作製した。まず、試験管に 2.0 $\mu\text{g/mL}$ の硝酸性窒素標準溶液 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL を取り、7.5 mL 以下を取った試験管には純水を加えて 10.0 mL とした。以後の操作は定量操作と同様に行った。

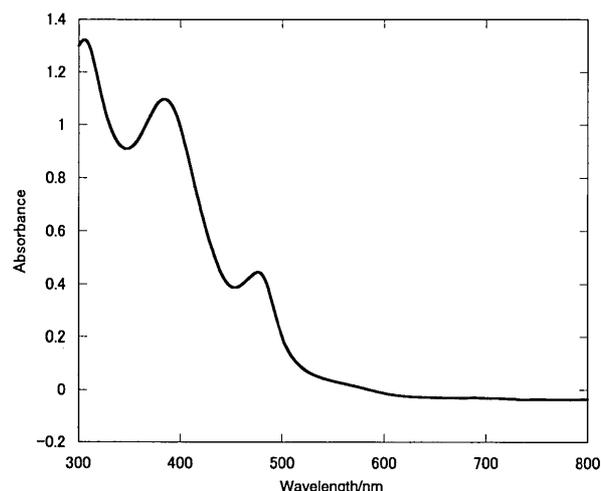


Fig. 2 Absorption spectrum of a final solution treated with 1.0% phenol solution dissolved in methanol

Concentration of nitrate-nitrogen was 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Added volume of 23.0% sodium chloride solution and 1.0% phenol solution were 0.5 mL of each. The (4 + 1) sulfuric acid (10 mL) was added. Reference was water.

3 結果と考察

3・1 吸収スペクトルと反応生成物

Fig. 1 に水を対照とした場合の発色させた溶液の 300 nm から 800 nm までの吸収スペクトルを示す。発色させた溶液はだいたい黄色で、吸収極大波長は 485 nm であった。フェノールを用いる方法¹⁾²⁾よりも高感度であり、吸収極大が長波長にシフトすることが分かった。反応生成物はアニソールのパラ位がニトロシルカチオン (NO^+) により親電子置換反応を受けて生成された *p*-ニトロソアニソールであろうと推測している。オルト位の場合、フェノールの水酸基同様に、ニトロシルカチオン (NO^+) の攻撃に対して、メトキシ基が立体障害を起こし生成しにくいことが推測される。

3・2 メタノールの発色への影響

フェノールは、メタノールにも溶解する。まず比較のために検討した 1.0% フェノールのメタノール溶液を用いて行った硝酸イオン定量法を適用して得た吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。発色反応後、色調が明るい黄色になったが、水溶液同様²⁾に最大吸収波長は 380 nm にもあり、溶媒による波長移動は観測されなかった。メタノール溶液を用いた場合も、水溶液の場合同様 *p*-ニトロソフェノールが生成したものと考えられる。また、この標準定量操作では、発色させた場合、溶液の全体積である 20 mL に占めるメタノール量 (1.0 mL) は、約 5% (v/v) と考えられ、可

視部領域における吸光度へのメタノールの影響はほとんど無視できるものと考えられる。

3・3 硫酸添加濃度の影響

市販の硫酸(95%)を水で希釈して、67, 76, 86%とした。希釈した硫酸並びに非希釈硫酸を10.0 mL添加して、アニソールのニトロソ化生成物の485 nmにおける吸光度を測定した。その他の条件は1.0 μg/mLの硝酸性窒素溶液10 mL, 23%濃度の塩化ナトリウム溶液添加量0.5 mL, 0.09%アニソール1.0 mLとした。67%硫酸では発色しなかった。76%硫酸の場合には吸光度は0.146であり、86%の場合では吸光度は0.834となり、95%の非希釈硫酸では1.098であった。吸光度が硫酸濃度の増加とともに増加したので、以後の操作では95%の市販の硫酸をそのまま使用した。

3・4 塩化物添加濃度の影響

塩化ナトリウム水溶液(0~23.0%)0.5 mLを添加して、

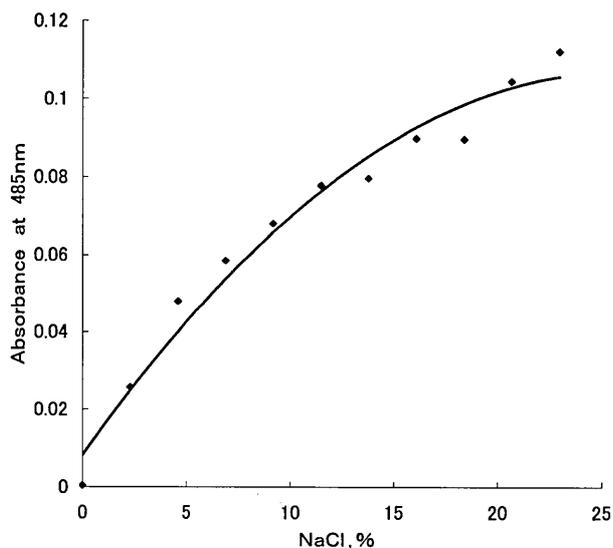


Fig. 3 Effect of concentration of sodium chloride on the absorbance at 485 nm

Concentration of nitrate-nitrogen was 0.2 μg/mL.

アニソールのニトロソ化生成物の485 nmにおける吸光度を測定した。Fig. 3に結果を示す。他の条件は、硝酸性窒素0.2 μg/mL, アニソールの溶液は0.36%で1.0 mLとした。塩化ナトリウムを添加しないとほとんど発色しないので、ニトロカチオン(NO₂⁺)による親電子置換反応であるニトロ化はほとんど起きていないと考えられる。以上の結果より、以後の実験では、23.0%の塩化ナトリウム水溶液を0.5 mL加えることにした。

3・5 試薬の濃度の影響

95%の硫酸を用いて、アニソール濃度0.09~1.0%の範囲で感度並びに精度を検討した。Table 1に感度を見掛けのモル吸光係数で、精度を相関係数で表した結果を示す。感度並びに精度の両面で満足できる結果が0.34~0.36%のアニソール濃度の場合に認められた。0.35%アニソール溶液を用いた場合、0~2.0 μg/mLの硝酸性窒素濃度(X: μg/mL)と485 nmにおける吸光度(Y)の間には、 $Y = 1.03X - 0.087$ が成り立ち、YとX間の相関係数は0.996であった。

3・6 再現性と安定性

反応直後の溶液は高温であり、吸光度測定が困難であった。このため反応経過後30分から30分間のニトロソ化反応生成物の485 nmにおける吸光度の時間的変動を検討した。反応経過後30分において1.0 μg/mLの硝酸性窒素濃度の場合で吸光度は0.856であったが、30分後には0.864になり、30分間での変動は1%以下であった。

0, 0.5, 1.0, 1.5並びに2.0 μg/mLの硝酸性窒素濃度の標準液10.0 mLを用いて各々5回測定して平均値を求めて、それに基づき検量線を作成した。硝酸性窒素(X μg/mL)と吸光度(Y)の間には、 $Y = 0.880X - 0.002$ の関係が成立して、相関係数は0.997であった。Table 1から分かるように、濃度が少しずれただけでも吸光度の違いが大きくなり、そのために3・5で述べた硝酸性窒素(X μg/mL)と吸光度(Y)の間の式 $Y = 1.03X - 0.087$ と多少異なった検量線になったものと考えられる。

Table 1 Effect of concentration of anisole on sensitivity and precision

Concentration(%) of anisole	Range of nitrate-nitrogen/ μg mL ⁻¹	Apparent molar absorptivity/ cm ⁻¹ (mol/L) ⁻¹	Coefficient of correlation
0.09	0.0~0.4	140	0.895
0.33	0.0~2.0	14050	0.995
0.34	0.0~2.0	14040	0.996
0.35	0.0~2.0	14400	0.996
0.36	0.0~2.0	13410	0.995
0.40	0.0~1.0	10840	0.990
0.50	0.0~2.0	12000	0.990
1.00	0.0~2.0	8740	0.991

Table 2 Effect of various inorganic ions on determination of nitrate-nitrogen (5.0 µg) with anisole

	Added as	Weight of ion/µg	Absorbance at 485 nm
Control		—	0.38 (—)
Na ⁺	Na ₂ SO ₄	9.72	0.386 (1.57)
Ca ²⁺	CaCl ₂	10.8	0.39 (2.63)
Mg ²⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	9.87	0.38 (0)
Fe ²⁺	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	0.38 (0)
NO ₂ ⁻	NaNO ₂	10	0.624 (64.2)
HPO ₄ ²⁻	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	10.7	0.368 (-3.16)
NH ₄ ⁺	(NH ₄) ₂ SO ₄	10.6	0.396 (4.21)
K ⁺	K ₂ CO ₃	11.4	0.382 (0.52)

a) Figures in parentheses are relative errors in %.

Table 3 Analytical results of NO₃-N(mg L⁻¹) in well water samples

Sample No.	NO ₃ -N found/mg L ⁻¹	
	Ion Chromatography ^{a)}	Present method
1	0.5	0.4
2	2.5	2.0
3	2.8	2.7
4	3.5	3.6
5	2.0	1.7
6	5.8	6.0
7 ^{b)}	<0.1	0.1
8	1.6	1.7
9	3.7	3.8
10	3.5	3.6
11	1.8	1.7

a) Refer to ref.15; b) In calculation of coefficient of correlation sample No.7 was omitted

内部標準偏差 (RSD) は 5 回測定の結果, 0.5 µg/mL では 7.52% (平均値: 0.351) で, 1.5 µg/mL では 6.41% (平均値: 1.362) であった。

3.7 共存物質の影響

地下水中の硝酸性窒素の定量を目標として, 淡水中の主要無機イオン¹⁴⁾から定量操作に用いる Cl⁻, SO₄²⁻を除いた Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, リン酸及び亜硝酸イオンと NH₄⁺についての妨害を検討した。

Table 2 にアニソールを用いる硝酸性窒素分析において, 5.0 µg の硝酸性窒素に対して約 2 倍量である 10 µg 程度の無機イオンの干渉の程度を要約した。Table 2 に示したイオンの中では, 亜硝酸イオンのみが大きな正誤差を示した。本法による硝酸イオンの定量においては, 硝酸イオンが還元されて亜硝酸イオンを経由して塩化ニトロシルを生じ, アニソールと反応する。したがって, 本法ではフェノール¹⁾並びに 1-ナフトール-8-スルホン酸の場合⁶⁾と同様に亜硝酸イオンは妨害を示すものと考えられる。

3.8 地下水への応用と公定法との比較

2005 年 10 月と 12 月に, 熊本市内から地下水, 11 検体を採水した。測定は 2006 年 2 月に行ったが, その間, 冷蔵庫内に検体は保管した。Table 3 にイオンクロマトグラフ法¹⁵⁾並びに本報で提案した方法による測定結果を示す。

検体はそのまま希釈せず測定した場合もあったが, 試料によっては 2 倍, 4 倍に希釈して測定を行った。

イオンクロマトグラフ法と提案した方法で測定した値の間には $Y = 1.074X - 0.254$ の式が成り立ち, 相関係数は 0.993 となり良好な相関関係が見られた。ここで, X はイオンクロマトグラフ法で得た値で, Y が提案した方法で求めた値である。地下水は地層によって汚過された水であるため, 共存イオン種が少ないので, 相関性が高くなったものと推測する。

本研究では, 疎水性試薬であるアニソールをメタノールに溶かすことにより, 硝酸イオンの分析が可能となった。アニソールと硝酸性窒素との反応物は可視部領域の 485 nm に単一極大吸収波長を持ち, 見掛けのモル吸光係数は $1.22 \times 10^4 \sim 1.44 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ であった。この値は硝酸性窒素との反応生成物が紫外領域にそれぞれ 380 nm に吸収極大波長を持つフェノール¹⁾の場合のモル吸光係数, $1680 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$, 更には 350 nm に吸収極大波長を持つ 1-ナフトール-8-スルホン酸¹⁰⁾の場合のモル吸光係数 $2380 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ よりもかなり大きい。

また, Serrat が報告⁴⁾した硝酸性窒素との反応生成物が 502 nm に吸収極大波長を持つレゾルシノールのモル吸光係数 (硝酸イオンから硝酸性窒素に換算), $4480 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ よりも大きかった。したがって, 硝酸イオンの定性分析用呈色有機試薬の役割もクロモトローブ酸⁵⁾¹⁶⁾と同様に期待できると考えられる。

最後に研究にご協力いただいた環境総合研究所の方々, 特に試料を分けていただいた都留靖尚氏と元職員の菅本康博氏にお礼申し上げます。また, 討論していただいた熊本大学大学院自然科学研究科の城 昭典教授に心から感謝いたします。

文 献

- 1) N. Velghe, A. Claeys: *Analyst (London)*, **108**, 1018 (1983).
- 2) 郷 康弘: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 261 (2000).
- 3) 郷 康弘: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **51**, 481 (2001).
- 4) F. B. Serrat: *Quimica Analitica*, **17**, 121 (1998).
- 5) P. W. West, G. L. Lyles: *Anal. Chim. Acta*, **23**, 227 (1960).
- 6) J. J. Batten: *Anal. Chem.*, **36**, 939 (1964).
- 7) P. W. West, T. P. Ramachandran: *Anal. Chim. Acta*, **35**, 317 (1966).
- 8) J. W. Robinson, C. J. Hsu: *Anal. Chim. Acta*, **44**, 51 (1969).
- 9) B. K. Afghan, L. Leng, A. V. Kolkarni, J. F. Ryan: *Anal. Chem.*, **47**, 556 (1975).
- 10) 郷 康弘: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 765 (2006).
- 11) M. Nakamura: *Analyst (London)*, **106**, 483 (1981).
- 12) 昭和 25 年法律第 303 号 (1950).
- 13) 昭和 45 年法律第 138 号 (1970).
- 14) 国立天文台: “理科年表”, p. 583 (2005), (丸善).
- 15) 日本水道協会編: “上水試験方法 2001 年版”, p. 197 (2001).
- 16) 日本分析化学会編: “改訂 4 版分析化学データブック”, p. 23 (1994), (丸善).

Spectrophotometric Determination of Nitrate-Nitrogen in Groundwaters Using Hydrophobic Reagent Anisole

Yasuhiro GOU¹

¹ Kumamoto-shi Environmental Research Institute, 404-1, Tokorojima, Ezumachi, Kumamoto-shi, Kumamoto 862-0946

(Received 27 September 2006, Accepted 9 December 2006)

A spectrophotometric method to determine nitrate-nitrogen was developed based on the reaction of anisole with nitrate in the presence of sulfuric acid and sodium chloride. Anisole was added as its methanol solution to give homogeneous color-developed solutions. Color development is probably ascribed to the formation of a nitroso-derivative of anisole caused by nitrosyl chloride, which resulted from the reaction of nitrate and chloride under strongly acidic conditions. The nitrate-nitrogen contents in well-water samples determined by the present method were in good agreement those determined by ion chromatography. The sensitivity of the present method is higher than those of similar methods based on water-soluble aromatic compounds.

Keywords : nitrate ; anisole ; spectrophotometry ; methanol ; groundwater.