

水中のアンモニア性窒素の定量法, イン ドフェノール法の一変法について

Application of a modified indophenol method to the
routine analysis of ammonia nitrogen in water

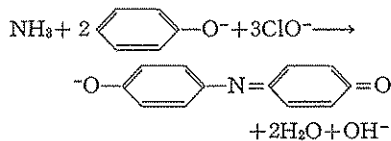
早川 亮太* 大野 尚子*

Ryota Hayakawa and Naoko Ohno

1 まえがき

アンモニアの比色分析には、古来ネスラー法が、その感度と簡便さのゆえにもっとも広く用いられていたが、ネスラー試薬が水銀化合物であり、使用後の廃液処理に問題があるところから、ネスラー法に代るものとして、ここ数年来インドフェノール法が各方面で採用される機運となってきた。

インドフェノール法は、多くは触媒の存在下でアンモニアがフェノールおよび次亜塩素酸と反応して青色の色素 (indophenol blue) を生成することを利用したもので、発色機構は明らかでない部分も多いが、その主反応は次のようなものと考えられている。



この反応はすでに 1859 年 Berthelot によって報じられ¹⁾、アンモニアの定量法としての歴史はネスラー法について古い²⁾が、試薬の種類、組成、濃度その他の操作条件いかによって、発色の強度、安定性が大きく左右されることから、分析方法の改善に関する報文は数多く、1970 年 Harwood 等³⁾は 23 種類の変法をあげており、その後も引続き報告がみられるが、このことはインドフェノール法がまだ方法として十分に確立されていないことをもの語っている。

わが国の公定法、協定法にも種々のインドフェノール法が採用されてきたが、その主要なものの分析条件をま

とめてみると表 1 のようになる。筆者は下水道協会「下水試験方法」の改訂作業にさいし、Zadorojny 等⁴⁾による変法について検討したところ、既存の JIS その他の方法と比較して感度、安定性の点できわめてすぐれていることが明らかとなったため⁵⁾、これにもとづいて現行「下水試験方法」のフェノール次亜塩素酸法の試験操作を定めた。その後もいくつかのインドフェノール法に関する報文が出されているが、なかでも 1976 年 Scheiner によって報じられた変法は⁶⁾、追試の結果、Zadorojny 法に匹敵し、操作の簡便さの点では実用上さらにすぐれていることをみとめた。以下「下水試験方法」に適用するにあたっての問題点を明らかにした。

2 Scheiner 法の概要

アンモニアに作用して Indophenol blue を生成するのに直接関与する試薬としては、フェノールと次亜塩素酸ナトリウム、これに反応促進剤としてニトロプルシッドナトリウムの三者で、試薬の構成は特に目新しくないが、原著において挙げている特色を要約すると、

- ① フェノールとニトロプルシッドナトリウムとが一剤となり、さらに緩衝剤が加えられているため、試験溶液が pH 3~11.5 の範囲では、あらかじめ pH を調整する必要がない。
- ② 最後に加える次亜塩素酸ナトリウム試薬は、比色管の標線まで満せばよいので、操作が簡略である。
- ③ 1 cm セルで 0.02~1 mg/l アンモニア性窒素を高い再現性で測定することが可能であり、呈色は室温ですくなくとも 48 時間安定である。
- ④ 下水に関連する妨害物質としては、400 mg/l 以上の硬度および 5 mg/l 以上の亜硝酸性窒素である。

3 Scheiner 法の「下水試験方法」への適用

3-1 現行の「下水試験方法」のインドフェノール法

* 日本環境衛生センター公害部水質産業廃棄物課
Water Pollution and Industrial Waste Laboratory,
Department of Environmental Pollution,
Japan Environmental Sanitation Center

表 1 公定法等に用いられているインドフェノール法の比較

分析条件	工場排水試験方法 JIS K0102(1974) 17.1.2 B	上水試験方法 ³⁾ 衛生試験法 ⁴⁾	海洋観測指針 ⁵⁾	下水試験方法 ⁶⁾	Scheiner 法 ⁹⁾
試験溶液採取量(最大)(ml)	10	10	50	50	25
最終容量(試薬添加後の)(ml)	25	20	54	59	50
NH ₃ -N量範囲 (最大試験溶液中)(mg)	0.001~0.04	0.001~0.01	—	0.005~0.05	0.0005~0.02
NH ₃ -N濃度範囲 (最大試験溶液中)(mg/l)	0.1~4	0.1~1	0.014 (一点検生, 50mmセル)	0.1~1	0.02~1
フェノール濃度 (最終容量中)(w/v%)	2	0.25	0.09	0.34	1.2
有効塩素濃度 (最終容量中)(w/v%)	0.12	0.025	0.075~0.125	0.1	0.033
反応促進剤	アセトン	ニトロプルシッド ナトリウム	ニトロプルシッド ナトリウム	ニトロプルシッド ナトリウム	ニトロプルシッド ナトリウム
液 温 (°C)	20~25	25~30	室 温	22~27	室 温
吸光度測定までの放置時間	20分	1時間	24時間	1時間	45分
呈色後の安定時間	30分	2~3時間	数日間	24時間	48時間

「下水試験方法」が現行のものに改訂される時点においては、ネスラー法の存続を望む声が現場において強かったためこれを主要試験法とし、さきの Zadorojny 法にもとづいて作成した試験法、「フェノール次亜塩素酸法」は「付」としてとり扱った。JIS の工場排水試験方法 (K 0102 1974)、上水試験方法および衛生試験法〔後二者は同一で、また JIS の排ガス中のアンモニア分析方法 (K 0099 1969) の操作も同様である〕と呈色の経時変化を比較した結果は図 1 に示すとおり安定性が良く、またブランク値が事実上 0 であることも、他方より有利である。ただ pH 調節は別としても、3 種類の試薬を相次いで加える操作が繁雑であることは否めない。

3-2 Scheiner 法にもとづく試験操作

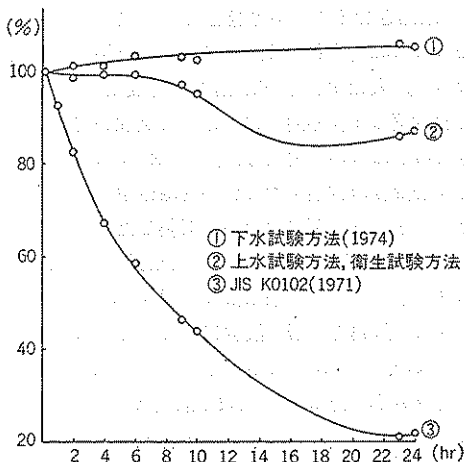


図 1 呈色の経時変化(酸化剤溶液添加後30分間の吸光度を100%とする)

Scheiner 法は現場的に簡易であることが特色とみなされるが、現行「下水試験法」の操作の流れに乗せる場合を考慮して、以下のような試験操作を作成した。

試薬

(1) 緩衝液

リン酸三ナトリウム (Na₃ PO₄·12H₂O) 30g, クエン酸三ナトリウム (C₆H₅ Na₃O₇·2H₂O) 30g および EDTA 3g を水に溶かして 1 l とする。この液の pH は約 12 である。

(2) フェノール・ニトロプルシッド試薬

フェノール (C₆H₅ OH) 60g を緩衝液に溶かし、これにニトロプルシッドナトリウム (Na₂ [Fe (CN)₅ (NO)]·2H₂O) 0.2g を加え、緩衝液を加えて 1 l とする。この液の pH は約 9.1 である。冷暗所に保存する。保存期間 3 週間。

(3) 水酸化ナトリウム溶液 (1 N)

水酸化ナトリウム (NaOH) 40g を水に溶かして 1 l とする。

(4) 次亜塩素酸ナトリウム試薬

市販の次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素 3.5%) 30ml を水酸化ナトリウム溶液 (1 N) 400ml に加え、水を加えて 1 l とする。冷暗所に保存する。保存期間 1 か月。

試験操作

試験溶液(清浄な試料の場合には検水) 25ml 以下の適量(アンモニア性窒素 (N) として 0.03mg 以下を含む量) を比色管 50ml にとり、水を加えて 25ml としたのち、フェノール・ニトロプルシッド試薬 10ml

を加えて振り混ぜ、ただちに次亜塩素酸ナトリウム試薬を加えて50mlとし、せんをしてよく振り混ぜたのち室温で45分間放置する。この液を吸収セル10mmに移し、水を対照液として波長635nmにおける吸光度を測定する。

なお蒸留法で飽和ほう酸溶液20ml中にアンモニア性窒素を吸収させた場合には、分取した試験溶液中に含まれる飽和ほう酸溶液換算量1mlにつき水酸化ナトリウム溶液(0.5N)1.5mlを加え(注)、さらに水を加えて25mlとなるようにする。

別に全操作にわたり検水と同量の水について空試験を行い吸光度を求め、これを試験溶液についての吸光度から差引き、検量線から試験溶液中のアンモニア性窒素量を求め、さらに検水中のアンモニア性窒素のmg/lを算定する。

検量線の作成

アンモニア性窒素標準液(0.01mg N/ml) 0, 0.1, …… 3 mlを比色管50mlにそれぞれとり、水を加えて25mlとし、以下試験溶液と同様に操作を行って吸光度を測定し、アンモニア性窒素標準液0mlのもの吸光度を差引き、アンモニア性窒素量と吸光度との関係線を作成する。

(注)「下水試験方法」

第25節 全窒素 2.2 還元法

第26節 アンモニア性窒素 2.3 蒸留比色法

第28節 硝酸性窒素 2.3 還元法

第29節 有機性窒素

においては、いずれも飽和ほう酸溶液20mlをアンモニアの吸収液とし、これを250mlにメスアップしたものを試験溶液(検液)としている。この場合、試験溶液分取量(Vml)に対する水酸化ナトリウム溶液(0.5N)の添加量(Xml)は、

$$X=0.12V \quad \left(X=20 \times \frac{V}{250} \times 1.5=0.12V \right)$$

の関係にある。

3-3 適用にあたっての問題点

3-3-1 定量限界

現行の「下水試験方法」およびScheiner法の吸光度Eは、セル長10mmの場合以下のとおりで、

現行法(最終容量59ml) $E=0.021 \times N$ (μg)

Scheiner法(μ 50ml) $E=0.029 \times N$ (μg)

検量線の立上りはScheiner法が約1.4倍高く、また最終容量あたりのアンモニア性窒素(N)濃度について

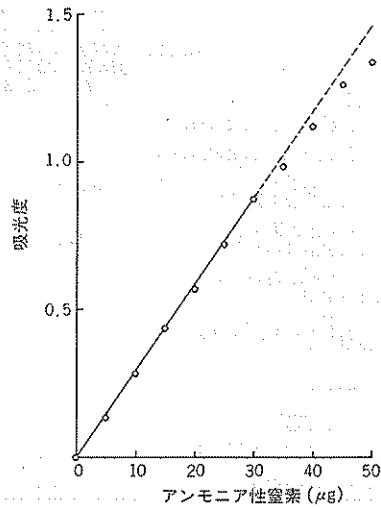


図2 Scheiner法による検量線
(日立101 d=10mm $\lambda=635\text{nm}$)

モル吸光係数を求めると、それぞれ17,300, 20,400となる。いま定量限界を $E=0.01$ と仮定すれば、これに対応するN量は $0.5\mu\text{g}$ および $0.35\mu\text{g}$ で、Scheiner法の方が低いが、N濃度で比較すると、試験溶液の最大採取量が現行法50mlに対し、Scheiner法は25mlであるため、それぞれ 0.01mg/l , 0.014mg/l とScheiner法の方が若干高くなる。したがってこの方法のモル吸光係数が高いという特色を生かして定量下限を低くするためには、試験溶液の採取量の割合を大きくとることが望ましい。そこで次亜塩素酸ナトリウム試薬を原報(3-2)の3倍の濃度に調製し、その代りに添加量を $1/3$ すなわち5mlですませるとすれば、試験溶液の分取量をさらに10ml増加させることが可能となり、これによって定量下限は 0.010mg/l となる。そこでこの条件への変更にもなって、吸光度とその安定性(経時変化)、あるいは3倍濃度試薬の保存期間中における安定性がどのように影響されるかについて検討した。すなわち原報通りの濃度と3倍濃度の試薬をおのおの冷蔵庫中に1か月間保存したものと、また別におのおの新製したものとを同時に用いて、 $\text{NH}_3\text{-N}$ $20\mu\text{g}$ に対する吸光度の経時変化を48時間まで追ってみた結果は表2の通りで、これから明かなように、試薬を3倍の濃度にしてもとくに支障はみとめられない。したがって定量下限を 0.010mg/l まで下げる必要がある場合には、試験溶液(あるいは検水)を35mlまでとり、これにフェノール・ニトロプルシッド試薬10mlを加えたのち、次亜塩素酸ナトリウム試薬の前記(3-2)の試薬(3)(4)の3倍濃度としたものを加えて全量を50mlとすればよい。

表 2 次亜塩素酸ナトリウム試薬の濃度および保存期間に関する検討結果

保存期間	次亜塩素酸ナトリウム試薬の濃度	放置時間 (hr)				
		45min	1	2	24	48
新 製	原 報 ど お り	0.630 (100)	0.631 (100.2)	0.630 (100)	0.656 (104.1)	0.655 (103.9)
	3 倍 濃 縮	0.666 (100)	0.669 (100.5)	0.666 (100)	0.676 (101.5)	0.684 (102.7)
1か月冷暗所保存	原 報 ど お り	0.636 (100)	0.640 (100.7)	0.639 (100.5)	0.659 (103.7)	0.661 (104.0)
	3 倍 濃 縮	0.671 (100)	0.671 (100)	0.671 (100)	0.685 (102.1)	0.691 (102.9)

- NH_3 -N 20 $\mu\text{g}/50\text{ml}$
- 表中の数値は3回測定した吸光度の平均値
- () 内は45minを100%としたときの%

3-3-2 pH 調整

吸光度が最高になる pH の範囲は、原著では 11.3~11.7 を示しており、追試の結果もほとんどの場合同様であったため、この範囲を至適 pH とみなし、前記操作条件も最終的な pH がこの範囲内にくるように定められているが、蒸留法で飽和ほう酸溶液にアンモニアを吸収させた場合には、試験溶液中にほう酸イオンが存在することになり、このことが至適 pH 範囲に影響を与えるかどうか問題となる。そこで NH_3 -N 20 μg 、飽和ほう酸溶液 2 ml を含む溶液の pH 条件を種々に変え、最終 pH と吸光度との関係を求めたところ、図 3 のとおりで、ほう酸の存在はとくに考慮する必要がないことをみとめた。

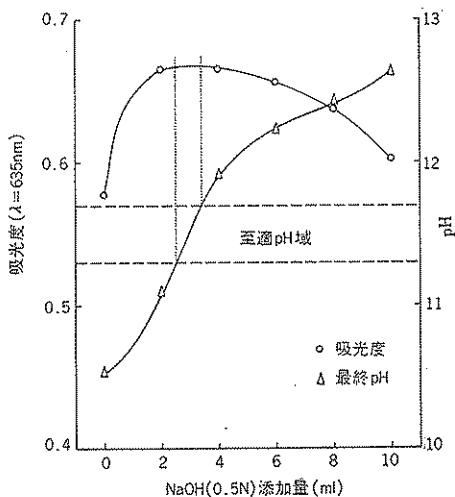


図 3 ホウ酸存在下における最終 pH と吸光度との関係
(飽和ほう酸 2 ml, アンモニア性窒素 20 μg を含有する溶液について)

ただしほう酸が存在するときには、常法どおりに二種類の試薬を添加しただけでは最終的に至適 pH に至らず、発色も不十分であることを経験し、このほう酸の緩衝作用に対抗するためには補助的にアルカリを添加する必要があることがわかったが、この所要量を定めるために次のような実験を行った。

まず飽和ほう酸溶液 2 ml に水を加えて 25 ml としたもの(「下水試験方法」に定めた飽和ほう酸溶液 20 ml を含む吸収液を 250 ml にメスアップして、この 25 ml を分取した場合に該当する。)に対し、水酸化ナトリウム溶液 (0.5N) を滴加していったときの液の pH 変化を求めたところ、図 4 の X を結ぶ曲線が得られた。ついで別にこの初期 pH が異なる液に、それぞれ 2 種の試薬を加え、最終 pH を測定した結果は、図中 Δ を結ぶ曲線となり、試薬の緩衝作用がかなりきいていることがわかる。

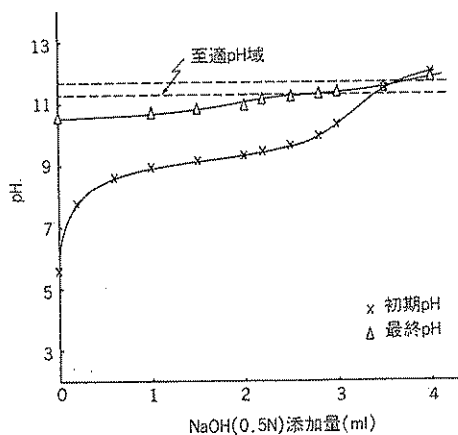


図 4 ホウ酸存在下における初期 pH と最終 pH との関係
(飽和ほう酸 2 ml, アンモニア性窒素 20 μg を含有する溶液について)

ここで最終至適 pH 11.3~11.7 に対応する初期 pH の範囲はおよそ 10~12 で、アルカリ添加量は 0.5N で 2.5~3.5 ml (中央値で 3 ml) となり、したがって飽和ほう酸溶液 1 ml あたり水酸化ナトリウム溶液 1.5 ml の添加量を定めた。

4 む す び

ネスラー法に代って一般化してきたインドフェノール法は変法が多く、各種公定法に記載されている方法をみても一長一短がある。

筆者は 1976 年に報じられた Scheiner 法に注目し、これを「下水試験方法」に適用するにあたっての問題点について検討を加え、一試案を得た。これによる特色は操作の簡易さと発色後の安定さにあり、実用的な方法としてすぐれていることが明らかである。

引用文献

- 1) Boltz, D. F.: "Colorimetric determination of nonmetals" 96, (Interscience Publishers) 1958.
- 2) Harwood, J. E. and D. J. Huyser: Some aspects of the phenol-hypochlorite reaction as applied to ammonia analysis. *Water Res.* 4, 501~515, 1970.
- 3) 日本水道協会: 上水試験方法, 195~196, 1970.
- 4) 日本薬学会: 衛生試験法注解, 705, 1973.

- 5) 気象庁: 海洋観測指針, 192~194, 1970.
- 6) 日本下水道協会: 下水試験方法, 116~117, 121, 1974.
- 7) Zadorojny C., S. Saxton and R. Finger: Spectrophotometric determination of ammonia. *J.W.P.C.F.* 45, 905~912, 1973.
- 8) 早川亮太, 樫村弘子: 水中の全窒素の測定法について, 日環セ所報, No. 1: 29~33, 1974.
- 9) Scheiner D.: Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Res.* 10, 31~36, 1976.

Summary

A convenient analytical procedure, based on a modified indophenol method proposed by Scheiner (1976) was developed for ammonia nitrogen determination, during routine analysis of sewage works.

The method obtains highly reproducible results in the range from 0.02 to 1 mg/l of ammonia nitrogen (1 cm light path), and the color developed is stable at least for 48hr. The procedure is simplified by the preparation of a single reagent combined with the buffer solution.

The interference of boric acid used as an absorbent solution when distillation is carried out, is eliminated by adding 1.5 ml of NaOH (0.5N) per 1 ml of saturated boric acid.