

＜論文＞

着色帯形成によるオルトリンおよび亜硝酸簡易定量法の開発

A Spot Test for Orthophosphate and Nitrite by Color Band Formation

木曾祥秋¹, 九澤和充¹, 佐藤剛志¹, 西村和之², 笠倉忠夫³, 細谷卓也⁴¹ 豊橋技術科学大学・エコロジー工学系 / 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1² 独立行政法人国立環境研究所・循環型社会形成推進・廃棄物研究センター・適正処理技術研究開発室 / 茨城県つくば市小野川 16-2³ 豊橋技術科学大学・科学技術コーディネーター / 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1
⁴(株) トーケミ・技術第二部 開発室 / 東京都台東区台東 1丁目 19番 2号Yoshiaki KISO¹, Kazumichi KUZAWA¹, Tsuyoshi SATO¹,
Kazuyuki NISHIMURA², Tadao KASAKURA³, Takuya HOSOTANI⁴¹Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of Technology
/ 1-1, Hibarigaoka, Tempaku-cho, Toyohashi, 441-8580 Japan²Research Center for Material Cycles and Waste Management,
National Institute for Environmental Studies
/ 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaragi, 305-8506 Japan³Coordinator for collaboration R&D, Toyohashi University of Technology
/ 1-1, Hibarigaoka, Tempaku-cho, Toyohashi, 441-8580 Japan⁴Development Lab, Tohkemy Co.
/ 1-19-2 Taito, Taito-ku, Tokyo, 110-0016 Japan

Abstract

A simple and rapid analytical method is required to support the appropriate control of wastewater treatment facilities. In this study, we focused on the development of a spot test for phosphate and nitrite by measuring color band length formed in a mini column. An anionic colored compound derived from each ion is retained on an adsorbent coated with a cationic material, and a color band is formed in a column packed with the adsorbent. As a result, the color band length correlated linearly with the concentration of each ion. Phosphate and nitrite in actual wastewater were analyzed successfully by the columns, which can detect phosphate in the range of 1-6 mg-P/L and nitrite in the range of 1-20 mg-N/L. In this method, phosphate analysis was not interfered by suspended solid (SS) and dissolved organic materials, although SS gave slightly lower values for nitrite determination.

Key Words : Spot Test, phosphate, nitrite, color band, detecting tube

1 はじめに

閉鎖性水域における富栄養化を抑制するために、小規模廃水処理施設においても栄養塩除去が求められるようになってきている。栄養塩除去を含む高度処理施設では、従来の生物学的処理に比べてより高度な維持管理が要求され、その前提として栄養塩類の水

質測定が不可欠である。しかしながら、小規模施設においては、水質等の自動測定および自動制御の導入が困難であり、また、保守点検・調整も高い頻度で実施されるとは限らない。このような状況においては、現場での測定が可能でかつ比較的精度の高い簡易測定が求められる。

栄養塩類の簡易測定法として既に種々の方法が用

いられている。精度の高い方法として可搬型の吸光光度計を用いるものやイオン選択性電極を用いる方法があるが、比較的高価である。最も簡易な方法は色調あるいは色の濃さを目視によって判定する方法であり、試験紙あるいは溶液試料が用いられる。この方法は安価であるが、一般的に濃度の判定段階の幅が大きいこと、個人差が生じやすいことなどから、定量精度が低いとみなされている。また、目視の判定でも吸光光度計を用いる場合でも懸濁成分は定量に影響を及ぼすため、分析操作の前処理としてろ過を必要とする場合がある。

下水などの生活排水中のオルトリンを簡易に測定する方法として、我々はミニカラム内にモリブデン青の着色帯を形成させる方法の可能性について検討を行ってきた¹⁾。その結果、6mg-P/L以下の濃度範囲で着色帯長さとしリン濃度の間に直線性があることを示し、簡易測定法として有用であることが示唆された。

本研究では、検知管方式といえる上述の方法によるオルトリン測定法を実廃水に適用する上での課題について、以下のような観点から検討を行った。(1) 吸着剤の調製方法、(2) 測定操作の確立、(3) 高濃度のモリブデン青は低温で凝集しやすいためその抑制方法。さらに、亜硝酸性窒素についても同様の測定原理に基づく測定の可能性について検討を加えた。

2 測定原理

オルトリンの測定で一般に用いられるモリブデン青は、陰イオン性の多核錯体であり、有機陽イオンとイオン会合体を形成することが知られている^{2)~4)}。例えばカチオン染料であるクリスタルバイオレットなど、また、四級アンモニウムイオンと会合体を形成する⁵⁾。このようなイオン会合体は、疎水性で水に難溶となり、カチオン染料との会合体は容易に沈殿物を形成する。

本研究では、長鎖炭化水素を配位子としてもつ四級アンモニウム塩をイオン対形成剤とし、それをシリカゲルに担持した。これを吸着剤としてミニカラムに充填し、そこにモリブデン青溶液を供給してイオン会合体形成反応によって着色帯を形成させた。

亜硝酸イオンの場合も、陰イオン性のジアゾ化合

物を形成することにより、カラム内の四級アンモニウム塩に捕捉させて着色帯を形成することができた。

3 実験方法

3.1 吸着剤の調製

四級アンモニウム塩として塩化ベンジルセチルジメチルアンモニウム (BCDMA) を用いた。所定量の BCDMA を溶解したエタノール溶液にシリカゲル (粒径: 35~70 メッシュ) を加えて、1日振とうしてからロータリーエバポレーターを用いてエタノールを蒸発させ、その後 110°C で乾燥させた。なお、シリカゲルに対する BCDMA の担持量は 0.2% または 0.4% とした。

3.2 測定用カラム

透明アクリル製カラム (内径 4mm, 外径 6mm, 長さ 120mm) の下端にナイロンメッシュを取り付け、このカラムに吸着剤 0.35g を充填した。充填高さは約 6cm であった。なお、短いチューブを用いてカラム上端に小形ポリエチレンロートを接続して測定を行った。

3.3 モリブデン青の凝集の抑制

濃度の高いモリブデン青は低水温で凝集するが、モリブデン青は極性有機溶媒に容易に溶解することから、エタノールを添加して凝集を抑制する効果を検討した。エタノール濃度を 0~50% の範囲で変化させて、冷蔵庫温度 (約 5°C) における凝集抑制効果およびモリブデン青の吸収スペクトルを検討した。

エタノールはそれ自体を検水に添加する方法があるが、反応試薬として用いられるアスコルビン酸をエタノールに溶解して用いる方法も考えられる。後者のほうが分析操作を簡略化できるとから、アスコルビン酸—エタノール溶液の保存性についても検討を行った。

3.4 オルトリン測定

オルトリン標準溶液 (1~6mg-P/L) 15mL に, JISの方法⁶⁾で調製したモリブデン酸アンモニウム溶液 1mL を加え, 次いでアスコルビン酸—エタノール溶液 (0.72%) 2mL を加えてモリブデン青を形成させた. なお, アスコルビン酸—エタノール溶液は前述の検討結果に基づいて調製した.

呈色が安定した後 (約5分), 上記溶液 1.8mL を測定用カラム上端から供給して全量をろ過した. ろ過液量は着色帯長さとのろ過時間に影響を及ぼすため, この溶液量を用いた. なお, ここで要したろ過時間は10~15分であった. 形成した青色の着色帯はその先端が若干乱れるため, 長さの最大値と最小値の平均値を着色帯長さとした.

3.5 亜硝酸性窒素測定

亜硝酸性窒素の分析は, 一般にアゾカップリング反応に基づく呈色反応が利用されるが, カップリング試薬には多様な芳香族化合物が利用できる. 簡易測定を目的としているため, アゾ化反応と同様な酸性領域でカップリングが可能で, かつ, 生成物が陰イオン性を持つものとして, 1-ナフトールを用いた. さらに測定を簡易化するため, スルファニル酸, 1-ナフトール, 酒石酸を1:1:8の割合で均一混合した反応試薬を調製した.

標準容積 50mL に対して, この反応試薬 0.3g を加えて呈色させた. この着色した溶液 2mL を上述のカラム上端から供給して全量をろ過した. 着色帯長さの測定はオルトリンの場合と同様とした.

3.6 実廃水の測定

実廃水としては, 大学内の浄化槽 (長時間ばっ気活性汚泥法) の流入水および処理水を採取し, これらのろ過水と未ろ過水を用いた. オルトリンの測定には, これら試料を希釈したものおよびオルトリンを添加したものを調製した. 亜硝酸の測定には, これら試料に亜硝酸ナトリウムを添加して測定を行った. なお, すべての試料について, JIS法によってオルトリンおよび亜硝酸性窒素の測定を行った.

4 結果と考察

4.1 オルトリン測定における着色帯長さと濃度の関係

上記操作方法によってオルトリン標準溶液を測定して得られたカラムには, Fig.1 に示すように明確な着色帯が形成された. 着色帯の先端は若干乱れており, カラム内を溶液が均一に流下していないことが示唆された. しかし, 平均長さに対する最大値と最小値の差の割合は15%以下であった. また, カラム上端の方が着色の程度が若干高い傾向が認められており, これは溶液の流下速度に比べてシリカゲルの細孔への拡散が遅いためと考えられる.

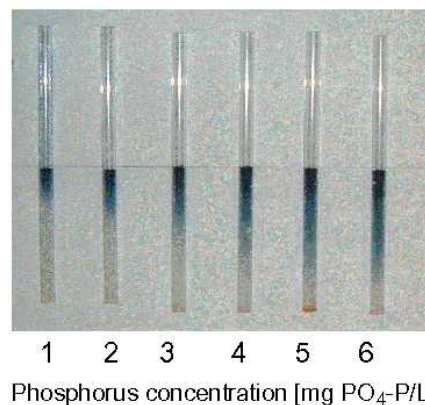


Fig.1 Photograph of color bands formed with molybdenum blue (adsorbent:0.2% BCDMA)

オルトリンの標準溶液を用いて, 繰り返し5回測定した場合の着色帯長さ (標準偏差, 平均値) とオルトリン濃度の関係を Fig.2 に示す. 平均着色帯長さとの関係には高い直線関係が得られ, 目視の測定であるにもかかわらず色の濃淡で判定するより高い精度で測定できることが示された. なお, 着色帯長さの相対標準偏差は概ね5%以下であり, 着色帯先端の乱れにもかかわらず, 安定した着色帯の形成が可能であることが示された. ただし, 回帰式は原点を通過していない. この要因は, シリカゲルが多孔性であるため, ろ過の初期における吸水速度が速いためと考えられる. したがって, このカラムにおける定量下限値は 1mg-P/L であった. 着色帯長さの正確な測定が行えない場合でも, 少なくとも最

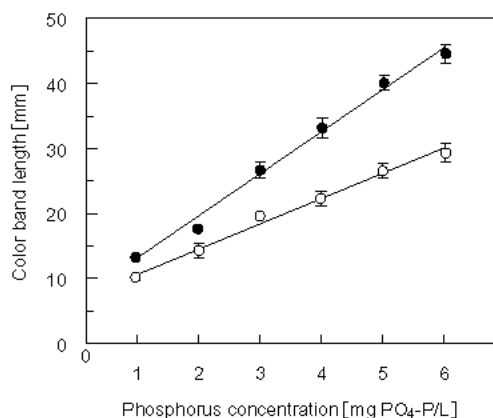


Fig.2 Relationship between color band length and phosphorus concentration

● : 0.2% BCDMA ; ○ : 0.4% BCDMA

大濃度の 1/10 程度の濃度段階で定量可能であると判断できる。なお、セルロースアセテートをコーティングしたシリカゲルを充填したカラムでは、これより低い 0.25~1mg-P/L の範囲で定量可能であり、そのことは既に報告している¹⁾。

BCDMA の担持量が多い吸着剤では着色帯が短くなったが、いずれの濃度でも直線関係が得られた。既に報告した結果でも同様な傾向が示されており¹⁾、測定濃度範囲に応じた吸着剤の調製が可能であるものといえる。なお、下水等の生活排水レベルのオルトリン濃度を測定するには、0.2% BCDMA 吸着剤が適当と判断した。

4.2 モリブデン青の凝集の抑制

本法では、公定法に比べて高濃度のオルトリンを希釈せずに測定することをひとつの目的としている。高濃度のモリブデン青は低水温時に沈殿を生じやすいため、入手の容易さや安全性を考慮して極性有機溶媒としてエタノールを添加することを試みた。その結果、このオルトリン濃度範囲では、10%のエタノールの添加によって 5°C においても沈殿が形成しないことが確認された。しかしながら、試料へのエタノール添加は、モリブデン青の形成反応、モリブデン青の最大吸収波長および吸光係数に影響を及ぼす恐れがあり、さらにモリブデン青と BCDMA のイオン会合体の溶解度が増加するため着色帯長さ

も影響を及ぼすことが考えられる。

エタノールを 0~50% 含む標準溶液を用いて、JIS の方法でモリブデン青を発色させたが、その場合でもモリブデン青が形成された。また、モリブデン青の最大吸収波長はエタノール濃度の増加とともに 887nm から 818nm へと短波長側にわずかにシフトしたが、最大吸光度はほとんど変化しなかった。

一方、エタノール濃度が高くなるにしたがってカラム内の着色帯長さは長くなり、エタノール 50% において 6mg-P/L 溶液ではカラム下端まで着色した。また、エタノール濃度が高くなると着色帯先端部が不明確になる傾向が見られた。以上の結果から、エタノール濃度は 10% 程度が適当であり、その添加方法としてアスコルビン酸のエタノール溶液として用いることが可能であることが示唆された。

一般にアスコルビン酸は不安定で水溶液では短時間に黄色く着色するため長期保存ができない。そのためアスコルビン酸—エタノール溶液の保存性について検討を加えた。アスコルビン酸の水溶液およびエタノール溶液 (いずれも 0.72%) を、冷蔵庫温度 (約 5°C)、室温、45°C (夏季屋外を想定) において保存した。アスコルビン酸溶液の着色の程度は、400nm における吸光度を指標とした。水溶液における結果を Fig.3 に示す。なお、吸光度が 5 以上の値は 5 として表示した。冷蔵庫保存以外の水溶液では、著しい黄色の着色が認められた。一方、図には示していないがエタノール溶液では高温で保存してもこの期間中ほとんど着色が認められなかった。

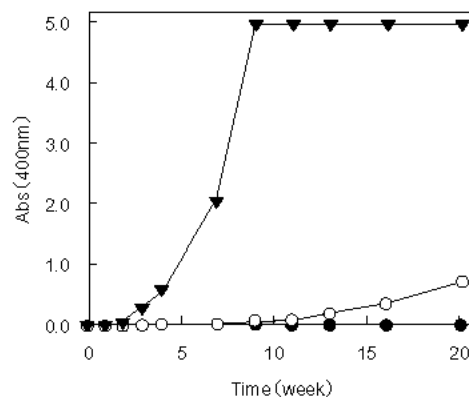


Fig.3 Absorbance at 400 nm of aqueous ascorbic acid solutions.

● : 5°C ; ○ : Room Temp. ; ▼ : 45°C

これらのアスコルビン酸溶液を用いて、JIS法に基づいてオルトリン(1mg-P/L)の測定を行った。ここで得られたモリブデン青の吸光度(880nm)と、測定の前度調製したアスコルビン酸溶液を用いて測定した吸光度の比をFig.4に示す。

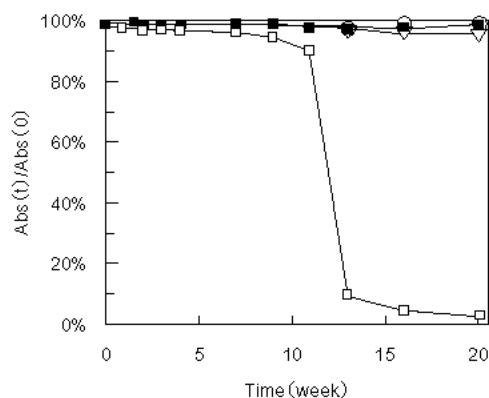


Fig.4 Effects of long term storage of ascorbic acid solutions

Ratio of absorbance at 880 nm of molybdenum blue before (Abs (0)) and after storage (Abs (t)).

- : 5°C C₂H₅OH ; ○ : 5°C H₂O ;
- ▼ : Room Temp. C₂H₅OH ;
- ▽ : Room Temp. H₂O ;
- : 45°C C₂H₅OH ; □ : 45°C H₂O

水溶液で黄色く着色したアスコルビン酸溶液を用いた場合、見かけ上モリブデン青溶液は緑色に近づくが、アスコルビン酸溶液自体の着色が880nmでの吸光度には影響を及ぼさなかった。しかし、高温での保存はモリブデン青の呈色を減退させやすいことが明らかである。一方、高温で保存しても黄色く着色しなかったエタノール溶液では、モリブデン青の呈色にも影響しないことが確認された。

以上の結果から、アスコルビン酸—エタノール溶液は水溶液に比べて保存性が著しく改善されることが示された。既に述べたようにエタノールの添加がモリブデン青の呈色反応および吸光度にほとんど影響しないことを考慮すると、アスコルビン酸—エタノール溶液は、本法だけでなく自動測定機器などで使用する場合にも保存性の高いアスコルビン酸溶液として有用であると考えられる。

4.3 実廃水中のオルトリンの測定

大学内の浄化槽流入水および処理水を用いて、公定法と本法によるオルトリンの測定を行った。本法では、ろ過水と未ろ過水の両方を測定した。なお、ここで用いた試料のSSは11.3~207mg/L、COD_{Mn}は12.3~188mg/Lと極めて広い範囲で変動していた。

オルトリンの公定法と本法による測定結果の関係をFig.5に示す。なお、本法による測定結果は、Fig.2に示した0.2%BCDMAの回帰式を用いて算出した値である。図中に示す破線は15%の偏差を示すが、本法と公定法との対応性は比較的高いものであり、この濃度範囲において有効数字2桁で定量することが可能といえる。また、6検体の流入汚水について、本法による測定をそれぞれ3回行った結果、相対標準偏差は1~12%であった。

Fig.5の結果は、未ろ過水においても測定が可能であることを示していることから、ろ過水と未ろ過水の測定結果をFig.6に示すようにプロットした。この結果から、試料中の懸濁物質は本法での測定に影響しないことが明らかである。しかし、試料中の懸濁物質が多いと、ろ過時間がわずかに長くなることが指摘された。

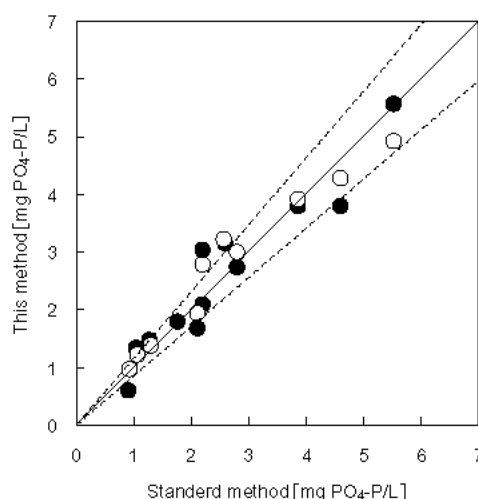


Fig.5 Comparison with both phosphorous concentrations measured by this spot test and standard method for actual wastewater.(adsorbent : 0.2% BCDMA)

- : 0.2% BCDMA ; ○ : 0.4% BCDMA

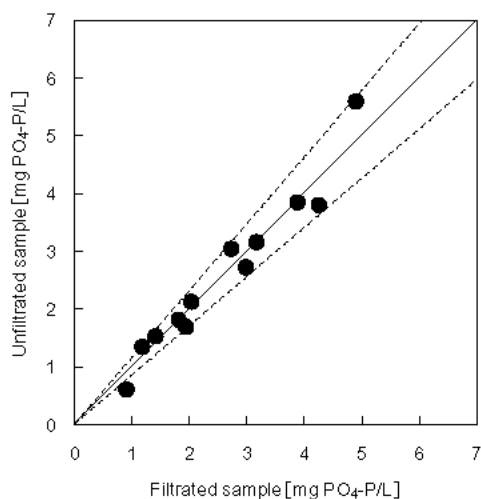


Fig.6 Effects of filtration on phosphorus analysis of actual wastewater by this spot test

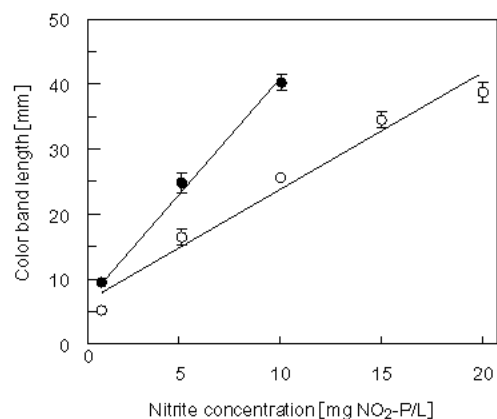


Fig.7 Relationship between color band length and nitrite concentration

● : 0.2% BCDMA ; ○ : 0.4% BCDMA

4.4 亜硝酸測定における着色帯長さとの濃度の関係

硝酸イオンは通常亜硝酸イオンに還元して測定されることから、ここでは亜硝酸性窒素の簡易測定を試みた。生活排水処理における処理水の T-N 濃度の目標値は通常 20mg-N/L 以下であることから、この値を上限値とすることを目標とした。

実験条件で示した試薬により、亜硝酸イオンは橙色の陰イオン性のアゾ化合物を生成する。このアゾ化合物はオルトリン測定に用いたものと同じカラムで過することにより明確な着色帯が形成された。また、リンの着色帯に比べると、先端以外での着色の程度は比較的均一であった点が指摘できる。これは、モリブデン青よりもアゾ色素の方が BCDMA に保持されやすいことを示唆するものと考えられる。

1~20mg-N/L の亜硝酸性窒素標準溶液を用いて 3 回の繰り返し測定を行った。その結果、着色帯長さの相対標準偏差は 5% 未満であり、オルトリンと同じく測定の安定性が高いことが示された。3 回の測定における平均着色帯長さとの濃度の関係を Fig.7 に示す。この場合も、高い直線関係が得られ、かつ、BCDMA 担持量が多いほど着色帯が短くなることが示された。呈色反応は異なるものの、オルトリンも亜硝酸性窒素も同様な吸着剤が使用できる点でも有用性が高いといえる。

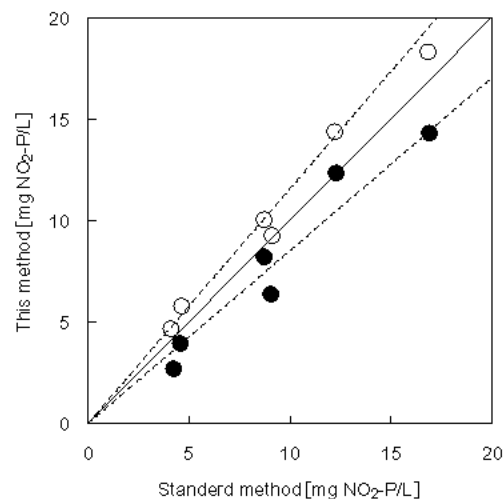


Fig.8 Comparison with both nitrite concentrations measured by this spot test and standard method for actual wastewater (adsorbent : 0.4% BCDMA)

● : unfiltrated ; ○ : filtrated

4.5 実廃水に添加した亜硝酸性窒素の測定

大学内浄化槽流入水に亜硝酸イオンを添加したもののおよびそのろ過水について、本法で亜硝酸性窒素の測定を行った。なお、試料水のSSは126~286mg/L、COD_{Mn}は74.0~188mg/Lであった。

公定法での測定結果と本法での測定結果の関係をFig.8に示す。なお、この場合もFig.7に示した0.4%BCDMAにおける回帰式を用いて濃度を算出した。亜硝酸性窒素においても、ろ過試料では公定法との偏差は概ね15%以下であり、本法による定量性は高いといえる。しかしながら、未ろ過試料では公定法およびろ過試料に比べて低い値を示しており、SSが負の影響を及ぼすことが示された。したがって、現場測定においても何らかの簡易なる過が必要と考えられる。

5 まとめ

本研究において、オルトリンおよび亜硝酸性窒素の簡易測定法としてミニカラム内に形成させた着色帯長さから定量する方法について検討を行った。その結果は、以下のようにまとめられる。

- (1) 着色帯長さとの濃度の間に高い直線関係が認められ、オルトリンは1~6mg-P/Lの範囲で、亜硝酸性窒素については1~20mg-N/Lの範囲で定量できることが示された。
- (2) 実廃水を用いたオルトリンの測定では、懸濁物質は定量にほとんど影響を及ぼさなかったが、亜硝酸性窒素では懸濁物質による負の影響が認められた。
- (3) オルトリン測定に用いるアスコルビン酸はエタノール溶液とすることで、測定を安定化させるだけでなく保存性が向上することが確認された。

以上の結果から、着色帯形成を用いた分析法は簡易測定法として有用性が高いものと考えられる。しかしながら、測定時間の短縮、硝酸イオンの測定への応用などの課題が残されており、今後これらの点についてさらに改善を行う予定である。

さらに、本法の基本的な原理は着色物質の固相抽出と同じであることが指摘でき、このことを考慮すればより多様な測定方法への応用も可能と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、環境省の地球環境保全等試験研究費による助成をいただいたことに謝意を表します。

参考文献

- 1) 木曾祥秋, 杉浦洋介: リンの簡易分析法の開発, 浄化槽研究, **12** (1), 23-29 (2000)
- 2) A. K. Babko, Yu, F. Shkaravslil, V. I. Kulik: The Use of the phosphomolybdates of Basic Dyes for the Extraction-Photometric Determination of Phosphorous, *J. Analytical Chemistry of the USSR*, **21**, 172-174 (1966)
- 3) 本水昌二, 脇本利明, 桐柴恭二: エチルバイオレットを用いるヘテロポリ酸の抽出とリン, ヒ素(V)及びヒ素(III)の吸光度測定, *BUNSEKI KAGAKU*, **31**, 717-721 (1982)
- 4) S. Taguchi, E. Ito-oka, K. Masuyama, I. Kasahara, K. Goto: Application of organic solvent-soluble membrane filters in the preconcentration and determination of trace elements: Spectrophotometric determination of phosphorous as phosphomolybdenum blue, *Talanta*, **32**, 391-394 (1985)
- 5) K. Hiroy, T. Tanaka, A. Kawahara, M. Adachi, K. Fukushi: A new spectrophotometric determination of phosphorous in sea water based on the measurement of color intensity of membrane filters, *BUNSEKI KAGAKU*, **31**, E401-E407 (1982)
- 6) 工場排水試験方法, JIS K 0102, 43.1.1, 46.1.1 (1998)
- 7) K. Horita, G. F. Wang, M. Satake: Column Preconcentration Analysis-Spectrophotometric Determination of Nitrate and Nitrite by a Diazotization-Coupling Reaction, *Analyst*, **122**, 1596-1574 (1997)

(受付 2002. 5. 13)

(受理 2002. 6. 5)