アナリティカルレポート

ペルオキシ二硫酸アンモニウムを酸化剤とした 4-アミノアンチピリン 吸光光度法による水中フェノールの定量

森田 絵美^{®1}, 中村 栄子¹

1 緒 言

排水試料中の低濃度のフェノール類の定量のために、フェノール類を 4-アミノアンチピリンとの反応でアンチピリン色素とし、これを溶媒抽出する方法が行われている^{1)~3)}。溶媒として JIS K 0102 工場排水試験方法 (以下、JIS 法)¹⁾、ISO6439²⁾、Standard methods³⁾などの公定法では、クロロホルムが用いられている。クロロホルムの代わりに安息香酸メチルを用いる方法^{4)~6)}も報告されている。

一方、アンチピリン色素の生成は、フェノール類と 4-アミノアンチピリンだけでは進行せず、アルカリ性の条件下で酸化剤の共存が必要であり⁷⁾、アルカリ化のための緩衝液は、Emerson⁷⁾によってアンモニアを用いた場合が最も高感度であることが見いだされており、その後 Ettinger⁸⁾によってアンモニアアルカリで pH 9.8~10.2 の範囲において安定な反応が得られることが報告されている。これらの検討や前述の公定法ではいずれも酸化剤としてヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムが用いられている。ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムはシアノ基を含有するため、その廃液に酸を加えると有毒なシアン化水素ガスを発生する危険がある⁹⁾。また、廃液には特別な処理が必要であり、多数の試料を測定する場合にその処理費用は高額となる。さらに、酸化剤としてヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを用いた場合、アンチピリン色素による吸光度は時間とともに減少していくことが報告されている⁶⁾¹⁰⁾。

ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムに代わる酸化剤として、バッチ法ではペルオキシターゼ及び過酸化水素を用いる方法¹¹⁾¹²⁾、ヨウ素を用いる方法¹³⁾、ペルオキシ二硫酸塩を用いる方法¹⁰⁾等が報告されている。ペルオキシ二硫酸塩を用いる方法は、フローインジェクション分析法 (以下、FIA 法)でも利用されており^{14)~17)}、ISO 14402¹⁸⁾ではペルオキシ二硫酸塩による FIA 法が規定されている。バッチ法においては Ochynski¹⁰⁾が pH、反応温度、発色の安定性を検討しているが、リン酸塩、炭酸塩、ホウ酸塩の緩衝液を用い、前者二つの緩衝液では極大吸収波長 500 nm の、後者のホ

ウ酸塩緩衝液では極大吸収波長 540 nm のアンチピリン色素が生成すると報告している。この検討により選択されたホウ酸塩緩衝液においては、pH 9.0~10.6 の範囲で安定な反応が得られたと報告されているが、その結果はアンモニウム塩緩衝液及びヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを用いた場合と比較して感度がやや劣る。これらのことから、アンモニウム塩緩衝液及びペルオキシ二硫酸塩を用いた場合に、生成するアンチピリン色素の極大吸収波長が異なることや感度の向上も考えられた。また、Ochynski の方法では光路長 40 mm のセルを用いており、低濃度試料のための溶媒抽出法には適用していないため、その定量範囲は 0.50~20 µg/mL と報告されている。

本検討ではアンモニウム塩緩衝液条件において、ペルオキシ二硫酸アンモニウムの有効性を再確認し、感度の向上を目的として緩衝液の pH、ペルオキシ二硫酸アンモニウムの添加量、反応温度、発色の安定性などを検討した。また、ペルオキシ二硫酸アンモニウムによる方法で生成したアンチピリン色素を安息香酸メチルに抽出し、低濃度試料へ適用した。

2 実 験

2.1 装 置

吸光度測定には、光路長 10 mm のガラスセル及び島津製作所製の紫外可視分光光度計 UV-1650PC を用いた。溶媒抽出には、ヤマト科学製の振とう器 SHAKER SA-31 を用いた。試薬の秤量には、島津製作所製の電子天秤 AUY220 を用いた。

2.2 試 薬

フェノール 100 mg を適量の水に溶解し、水酸化ナトリウム溶液 (約 1 mol/L) 2 mL を加えた後、水で全量を 100 mL とし、1 mg/mL フェノール標準液を調製した。使用時にはこれを水で適宜希釈して用いた。塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液 (9.8 mol/L) は、塩化アンモニウム 67.5 g をアンモニア水 570 mL に溶かし、水を加えて 1000 mL とした。4-アミノアンチピリン溶液 (98 mmol/L) は、4-アミノアンチピリン 2.0 g を水に溶かして 100 mL とした。ヘキ

¹ 横浜国立大学大学院環境情報学府: 240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-2

Fig. 1 Effect of pH

Phenol concentration : 4.0 $\mu\text{g/mL}$. Wavelength : 510 nm

サシアノ鉄(III) 酸カリウム溶液 (270 mmol/L) は、ヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウム 9.0 g を水に溶かして 100 mL とした。ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液 (220 mmol/L) は、ペルオキシ二硫酸アンモニウム 5.0 g を約 90 mL の水に溶かし、水酸化カリウム溶液 (約 5 mol/L) を滴下して pH 10.0 に調節した後、水で全量を 100 mL とした。試薬は市販特級品を、水はイオン交換後蒸留したものを用いた。

2・3 定量操作

フェノールとして 50～500 μg を含む試料の適量を共栓付きメスシリンダー 100 mL にとり、水を加えて液量を 100 mL とする。塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液 3 mL、4-アミノアンチピリン溶液 2 mL、ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液 2 mL を加え、試薬溶液添加後 10 分間放置して発色液とする。発色液の吸光度を波長 510 nm において測定する。以下、この操作による方法を直接法と記す。

また、低濃度試料 (フェノールとして 2.5～50 μg を含む) の場合は、試料 100 mL を分液漏斗 200 mL にとり、直接法と同様に操作してアンチピリン色素を生成後、安息香酸メチル 10 mL を加え、振とう器で約 2 分間抽出を行う。安息香酸メチル層を分離し、これを硫酸ナトリウムで脱水する。安息香酸メチル層の吸光度を波長 465 nm において測定する。以下、この操作による方法を濃縮法と記す。

3 結果及び考察

3・1 pH の影響

ペルオキシ二硫酸アンモニウムを酸化剤とした場合の発色時における最適 pH を確認した。なお、JIS 法におけるアンモニウム塩緩衝液の pH は約 10 であり、その添加濃度は最終発色体積中において 0.27 mol/L となっている。フェノール標準液を試料とし、2・3 の直接法による定量操作に準じて操作した。ただし、試料溶液の体積は 50 mL とし、

Fig. 2 Effect of ammonium peroxodisulfate concentration

Phenol concentration : 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Wavelength : 510 nm

試料に pH 9.5～11.0 の塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液を最終発色体積中での濃度が 0.27 mol/L となるように添加し、4-アミノアンチピリン溶液 1 mL、ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液 1 mL を添加して、試料溶液の pH がアンチピリン色素生成へ及ぼす影響を検討した。結果を Fig. 1 に示す。なお、図中では緩衝液の pH で示した。pH 9.5～11.0 の範囲でほぼ一定の吸光度が得られた。塩化アンモニウム-アンモニア緩衝液の pH は約 10 に調節することとし、その調製方法及び添加量は JIS 法に準拠することとした。

3・2 酸化剤の添加量の影響

フェノール標準液を試料とし、最終発色体積中のペルオキシ二硫酸アンモニウム濃度が 1.1～11 mmol/L となるように添加して 2・3 の直接法による定量操作に準じて操作し、酸化剤の添加量がアンチピリン色素生成へ及ぼす影響を検討した。ただし、本操作では、それぞれの試薬溶液を加えた後、水を加えて最終発色体積を 100 mL とした。結果を Fig. 2 に示す。2.2～11 mmol/L の濃度でほぼ一定の吸光度が得られたため、最終発色体積中のペルオキシ二硫酸アンモニウム濃度が約 4 mmol/L となるように、ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液 (220 mmol/L) 2 mL を添加した。

3・3 発色温度の影響

発色温度がアンチピリン色素生成へ及ぼす影響を検討した。フェノール標準液を試料とし、発色温度を 10, 20, 30 $^{\circ}\text{C}$ で、2・3 の直接法による定量操作に準じて操作を行った。それぞれの温度における吸光度の時間経過を、発色試薬添加後 60 分間まで調べた。結果を Fig. 3 に示す。30 $^{\circ}\text{C}$ の条件では時間経過とともにやや退色が認められたが、発色試薬添加後 5～30 分間は 10, 20, 30 $^{\circ}\text{C}$ の条件でほぼ一定の吸光度が得られた。発色時間は室温において 10

Fig. 3 Effect of temperature
 $\triangle$ 30 °C, $\circ$ 20 °C, $\square$ 10 °C. Phenol concentration : 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Wavelength : 510 nm

Fig. 4 Stability of antipyrine dye
 $\blacklozenge$ Peroxodisulfate method, $\diamond$ Hexacyanoferrate(III) method. Salicylamide concentration : 20 $\mu\text{g/mL}$. Wavelength : 510 nm

分間とした。

3.4 アンチピリン色素の安定性

ヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウムを酸化剤として用いる場合、サリチルアミドと4-アミノアンチピリンから生成したアンチピリン色素の水層における吸光度は、時間経過とともに急速に減少することを著者らは報告している⁶⁾。そのため、ペルオキシ二硫酸アンモニウムを酸化剤とした場合でのアンチピリン色素の安定性について検討した。サリチルアミド溶液を試料として2.3の直接法による定量操作に準じて操作を行い、試薬溶液添加後からの放置時間と吸光度との関係を検討した。結果をFig. 4に示す。ペルオキシ二硫酸アンモニウムを酸化剤とした場合、発色試薬添加後5～60分間でほぼ一定の吸光度が得られた。

3.5 検量線

フェノール標準液の濃度を段階的に変化させて2.3に従って操作を行い、検量線を作成した。その結果、直接法、濃縮法ともフェノール濃度と吸光度との間に良好な直線関係が得られた。直接法では2.0 $\mu\text{g/mL}$ のフェノール標準液における5回の繰り返し変動係数は0.3%，検出限界は0.013 $\mu\text{g/mL}$ であった。濃縮法では0.20 $\mu\text{g/mL}$ のフェノール標準液における5回の繰り返し変動係数は0.1%，検出限界は0.0011 $\mu\text{g/mL}$ であった。

3.6 排水への適用

本法を排水及び河川水に適用した。いずれの試料からもフェノールは検出されなかったため、フェノール標準液を添加した試料を用い、本法での定量値とヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウムによるJIS法での定量値とを比較した。結果をTable 1に示す。本法による測定値とヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウムによる測定値は一致した。

Table 1 Comparison between peroxodisulfate method and hexacyanoferrate(III) method on the determination of phenol in waste water and river water

Sample	Phenol added ($\mu\text{g/mL}$)	Phenol found ($\mu\text{g/mL}$)	
		Peroxodisulfate method	Hexacyanoferrate(III) method
Waste water	2.0	2.0 ₆ ^{a)}	2.0 ₂ ^{a)}
	0.20	0.19 ₇ ^{b)}	0.19 ₁ ^{c)}
River water	2.0	2.0 ₆ ^{a)}	2.0 ₅ ^{a)}
	0.20	0.20 ₁ ^{b)}	0.19 ₄ ^{c)}

a) Direct method (wavelength ; 510 nm). b) Extraction method with methyl benzoate (wavelength ; 465 nm). c) Extraction method with chloroform (wavelength ; 460 nm). Waste water : Water discharged from experiment line in Yokohama National University. River water : Katabira River

4 結 言

4-アミノアンチピリン吸光度法において広く用いられているヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウムの代わりにペルオキシ二硫酸アンモニウムを用い、アンモニウム塩緩衝液条件下での試料溶液のpH、酸化剤の添加量、発色温度、発色時間の条件を検討した。求めた最適条件により生成させたアンチピリン色素の極大吸収波長は510 nm付近にあり、アンモニウム塩緩衝液条件において、酸化剤ヘキサシアノ鉄(III) 酸カリウムを用いた場合と一致した。また、本法により生成させたアンチピリン色素を安息香酸メチルに抽出し、0.025～0.50 $\mu\text{g/mL}$ の低濃度試料に適用し、良好な結果を得た。

文 献

- 1) 日本規格協会 : JIS K 0102 工場排水試験方法 (2008).
- 2) ISO : ISO6439 (1990).
- 3) APHA, AWWA, and WEF : 21st. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005).
- 4) 畑村博史, 吉田のり子 : 和歌山市衛生研究所報, **12**, 68 (1999, 2000).
- 5) 村井幸男 : 環境と測定技術, **28**, 46 (2001).
- 6) 森田絵美, 中村栄子 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **59**, 917 (2010).
- 7) E. Emerson : *J. Org. Chem.*, **8**, 417 (1943).
- 8) M. B. Ettinger, C. C. Ruchhoft, R. J. Lishka : *Anal. Chem.*, **23**, 1738 (1951).
- 9) 高木誠司 : “定性分析化学 中巻”, p. 347 (1979), (南江堂).
- 10) F. W. Ochynski : *Analyst*, **85**, 278 (1960).
- 11) 宮本邦彦, 山東英幸, 横山 剛 : 衛生化学, **24**, 175 (1978).
- 12) Y. Saito, M. Mifune, S. Nakashima, Y. Tanaka, M. Chikuma, H. Tanaka : *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 5016 (1986).
- 13) 栗原 誠 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **32**, 766 (1983).
- 14) B. K. Afghan, P. E. Belliveau, R. H. Larose, J. F. Ryan : *Anal. Chim. Acta.*, **71**, 355 (1974).
- 15) Jürgen Möller, Michel Martin : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **329**, 728 (1988).
- 16) C. Kwade, R. Voigtländer : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **342**, 426 (1992).
- 17) J. F. van Staden á H. E. Britz : *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**, 1066 (1997).
- 18) ISO : ISO 14402 (1999).

Determination of Phenol in Water by 4-Aminoantipyrine Spectrometry
Using Peroxodisulfate as Oxidant

Emi MORITA¹ and Eiko NAKAMURA¹

¹ Graduate School of Environment and Information Sciences Yokohama National University, 79-2, Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 240-8501

(Received 19 September 2010, Accepted 15 January 2011)

We studied using an ammonium peroxodisulfate as the oxidizing reagent instead of potassium hexacyanoferrate(III) on the 4-aminoantipyrine spectrometry for the determination of phenol. Suitable color development was obtained by the addition of 1 - 5 mL of ammonium peroxodisulfate solution (pH 10, 220 mmol/L) and 2 mL of 4-aminoantipyrine solution (98 mmol/L) to a 100 mL sample solution at pH 10 buffered with an ammonium chloride - ammonia solution (9.8 mol/L). The proposed procedure was applied to methyl benzoate extraction for determining small amounts of phenol in water. Results obtained by the proposed method were in agreement with that by the JIS method.

Keywords : phenol ; 4-aminoantipyrine ; oxidant ; ammonium peroxodisulfate.