イソインドール誘導体化-連続流れ方式化学発光検出によるアンモニウムイオンの定量

竹内浩士[®], 伏見千晶, 中村圭吾, 指宿堯嗣*

(1993 年 6 月 11 日受理)

アンモニウムイオンをオルトフタルジアルデヒド及び 2-メルカプトエタノールを用いて蛍光性の誘導体に変換した後、シュウ酸アリール-過酸化水素化学発光系で定量する方法を検討した。誘導体化反応は約 200 秒で完了するので、連続的なフロー分析が可能となった。最適化した条件で検出限界は NH_3 として 2.9 ng ml^{-1} であり、 $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ まで直線的な応答が得られた。第一アミン類は定量的に誘導体化・検出されるが、その他の共存物質の影響は小さい。雨水試料に適用し、従来法とよく一致することを確認した。

1 緒 言

アンモニア (NH_3) は自然界や人工の発生源から排出される塩基性 ($\text{p}K_a=9.25$) の大気汚染物質である¹⁾。水溶性であり、容易に大気中の水滴 (雲, 霧, 雨など) に移行し水滴中の水素イオンを消費するので、見掛け上酸性物質の影響を減じる。亜硫酸の溶液中の酸化反応として重要なオゾン酸化や金属イオン接触酸素酸化反応は中性ないし弱酸性条件下で早く進行するが、生成する硫酸がしだいに反応速度を低下させる²⁾。アンモニアが存在すると溶液の pH が上昇し、速い反応が維持される。又、大気中の硫酸・硝酸などと反応してエアロゾルを形成するため、乾性沈着にも大きく寄与している³⁾。

アンモニウムイオン (NH_4^+) の定量にはインドフェノール青法などの吸光度法、イオン電極法、イオンクロマトグラフィー (IC) などが用いられている⁴⁾⁵⁾。いずれの方法も検出限界はさほど低くない ($5\sim 100 \text{ ng ml}^{-1}$) ので、ごく低濃度の場合は濃縮などの前処理が必要となる。又、イオン電極法以外は基本的に間欠的な測定となる。

著者らは化学発光 (CL) 法が極めて高感度で装置的にも簡便であることから、これを原理とする可搬型の測定装置を開発し⁶⁾、既に過酸化水素⁶⁾、亜硫酸⁷⁾、オゾン⁸⁾⁹⁾、ホルムアルデヒド¹⁰⁾などの定量に適用してきた。CL は反応試薬を換えることにより種々の測定対象

に対応できるので、 NH_4^+ についても適当な CL 系を見いだせば、1 台の分析装置で多成分の測定が可能となり、連続測定が必要な酸性雨関連の現地観測や室内実験に大変便利である。

$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ については直接の化学発光反応が知られていないので、ホルムアルデヒド¹⁰⁾と同様に、蛍光性の誘導体に変換した後、既存の CL 試薬であるシュウ酸アリール-過酸化水素系¹¹⁾¹²⁾を利用することとした。シュウ酸アリールとしては溶解度の高いシュウ酸ビス [4-ニトロ-2-(3,6,9-トリオキサデシルオキシカルボニル)フェニル] (TDPO) も最近開発されているが¹³⁾、ここでは広く使用されているシュウ酸ビス (2,4,6-トリクロロフェニル) (TCPO) を使用した。TCPO は H_2O_2 と反応し、共存する蛍光物質を通じて強い発光を与える¹¹⁾¹²⁾。この系は励起光源を省いた蛍光検出法と考えることもできる。

アンモニアないしアミノ酸類を蛍光誘導体化する方法はいくつか知られているが、オルトフタルジアルデヒド (OPA) と 2-メルカプトエタノール (ME) (混合物を以下 OPA 試薬と称する) を用いる方法¹⁴⁾が広く行われている。アミノ酸の HPLC¹⁵⁾、マイクロエマルジョンの利用¹⁶⁾、膜分離と組み合わせた NH_3 の FIA¹⁷⁾、チオールの代わりに亜硫酸塩を用いた変法¹⁸⁾などの応用がある。生成する蛍光誘導体 ($\lambda_{\text{ex}}=370$, $\lambda_{\text{em}}=486 \text{ nm}$) は、TCPO- H_2O_2 系で最も効率の良い蛍光物質とされるペリレン ($\lambda_{\text{ex}}=366$, $\lambda_{\text{em}}=470 \text{ nm}$)¹⁹⁾ とよく似た蛍光特性を有するので、良好な検出法となることが予測さ

* 工業技術院資源環境技術総合研究所: 305 茨城県つくば市小野川 16-3

Fig. 1 Flow diagram of the chemiluminescent analyzer for ammonium ion

The flow rates of the solutions (ml/min) are given in parentheses.

れた。又、誘導体化反応が比較的迅速に進行するので、オンラインでの誘導体化・連続定量が可能となった。

2 実 験

既報の化学発光分析装置⁸⁾の流路系を改造して用いた。その構成を Fig. 1 に示す。フッ素樹脂製反応コイル (内径 2 mm) の長さは 75 cm で、設定した流量での反応時間は約 200 s であった。試料、OPA 試薬、過酸化水素及び TCPO の各溶液の流量はそれぞれ 0.48, 0.24, 0.24 及び 2.10 ml min⁻¹ とした。プランジャー式定量ポンプ及びペリスタリックポンプにはそれぞれ、イワキ MM-2 型及び大洋科学 DECARF-N 型を用いた。光電子計数装置の積算時間は 10 又は 100 秒とした。このほか、反応条件の検討などに、日立 330 形自記分光光度計、日立 F-3000 形分光蛍光光度計、Dionex 14 型イオンクロマトグラフ及び堀場 F-8 形 pH メーターを使用した。

OPA 及び ME は和光純薬、TCPO は東京化成から入手した。その他の試薬類は市販の特級品をそのまま用いた。溶液の調製には日本ミリポア Milli-Q システムの超純水を使用した。TCPO はアセトン溶液とし、OPA 試薬溶液は OPA 1 mmol につき、2.5 ml のエタノールに溶解した後、ドラフト内で必要量の ME と緩衝液を加えて調製した。標準試料は塩化アンモニウムを用いて 1 g NH₃ l⁻¹ の溶液を調製した後、更に希釈して用いた。

3 結果と考察

3・1 流路系及び化学発光試薬

TCPO の溶媒には、発光強度とポンプチューブ保護

の観点から、既報の HCHO 定量¹⁰⁾同様、アセトンを用いた。TCPO は水への溶解度が小さいために試料溶液の流量を増やすことが困難であったが、今回は TCPO アセトン溶液の流量を比較的大きくすることで、他の水溶液と混合しても沈殿が生じないようにすることができた。用いたポンプの都合もあり、TCPO、H₂O₂、OPA 試薬及び試料の各溶液の流量をそれぞれ、2.10, 0.24, 0.24, 0.48 ml min⁻¹ に設定した。次項の誘導体化反応の条件設定の後に、CL 系の最適化を行い、CL 試薬として、0.5 mM TCPO アセトン溶液及び 0.5% (147 mM) H₂O₂ 水溶液を用いることとした。雑音低減のためにアセトンの脱気を行った。以上の結果、HCHO 定量の場合¹⁰⁾と比較して、CL セルから排出される混合液中のアセトン及び TCPO 濃度は約 2 倍となり、バックグラウンド発光に影響する H₂O₂ 濃度は約 60% となった。又、試料送液量は 2.4 倍となった。

3・2 誘導体化反応

溶液中のアンモニウムイオンはアルカリ性で OPA 及び ME と反応し、蛍光性の 1-アルキルチオイソインドールを生成する²⁰⁾。

この反応は比較的速いので、反応時間が約 200 s となるような反応コイルを用いてオンライン誘導体化を行った (Fig. 1)。誘導体化反応の速度、生成する誘導体の蛍光強度、化学発光反応速度などはいずれも pH 依存性をもつが、TCPO などの溶解性に影響する塩類濃度を高くしないよう、pH の調整は OPA 試薬についてのみ最小限の緩衝剤濃度 (20 mM Na₂HPO₄-NaOH) で行った。Fig. 2 に誘導体化試薬溶液の pH が化学発光強度に及ぼす影響を示す。NH₄⁺ に対する化学発光強度は pH の上昇とともに増大し、pH 10.5 で極大となった後、再び低下した。pH が高くなるとともにバックグラウンド発光が上昇する傾向が認められた。このため、OPA 試薬溶液の pH を 10.5 に設定した。この最適 pH はこれまでの報告^{14)~18)}とほぼ一致している。なお、緩衝剤としては、溶解度やバックグラウンド発光の点で、炭酸塩やホウ酸塩よりもリン酸塩が適していた。

Fig. 2 Effect of the pH of OPA reagent solution on CL intensity

The OPA reagent contains 8 mM *o*-phthalaldehyde, 16 mM 2-mercaptoethanol, and 10 mM phosphate buffer (pH was adjusted with NaOH solution). Sample, $8.5 \mu\text{g NH}_3 \text{ ml}^{-1}$. Flow rates of TCPO (0.5 mM in acetone), 0.5% H_2O_2 , OPA reagent and sample solutions are 2.10, 0.24, 0.24 and 0.48 ml min^{-1} , respectively.

OPA 試薬溶液中の ME 及び OPA 濃度の発光強度に及ぼす影響を Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。これまでの蛍光定量では、一定濃度以上の ME 及び OPA を用いた場合に、最大一定の蛍光が得られているが⁽¹⁴⁾⁽¹⁸⁾、本実験では後段に CL 系があるために、最適濃度が生じたものと考えられる。又、これらの試薬濃度とともにバックグラウンド蛍光が上昇するとされているが⁽¹⁴⁾⁽¹⁸⁾、CL 検出の場合は顕著な影響は認められなかった。Fig. 3 及び Fig. 4 の極大から、ME 及び OPA の最適濃度をそれぞれ、15 mM 及び 10 mM と決定した。

3.3 NH_4^+ の定量

本法におけるバックグラウンド発光 (I_B) は約 $1500 \text{ counts s}^{-1}$ であり、試料測定時の発光強度 (I_s) から I_B を差し引いたものを正味の発光強度 (I_{CL}) とした。 I_B

Fig. 3 Effect of 2-mercaptoethanol concentration in the OPA reagent on CL intensity

The OPA reagent (pH 10.5) contains 10 mM *o*-phthalaldehyde and 10 mM phosphate. Sample, $3.4 \mu\text{g NH}_3 \text{ ml}^{-1}$. Other experimental conditions are given in Fig. 2.

の時間的変動から計算した S/N 比 3 における検出限界は $2.9 \text{ ng NH}_3 \text{ ml}^{-1}$ と計算された。化学発光強度は $6 \mu\text{g}$ までアンモニア濃度に直線的に比例した。 $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ レベルの NH_4^+ を繰り返し定量した場合 ($n=6$) の相対標準偏差は 5.5% であった。同時に検討したインドフェノール青法及びイオンクロマトグラフ法では、それぞれ 12.2 及び 2.1% であった。

3.4 共存物質の影響

各種の無機イオンや有機化合物が本法に及ぼす影響を調べた。 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} の各イオン ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$)、メタノール、エタノール、ギ酸、酢酸、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) は単独で存在した場合、全く化学発光を与えなかった。しかし、 NO_2^- ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) は消光作用が強く、バックグラウンド発光もほぼゼロとなった。また、アミン類はアンモニアと同様

OPA 試薬と反応するので、妨害となる可能性がある。第三アミン（トリエチルアミン、トリエタノールアミン、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ）はほとんど化学発光を与えなかったが、エチルアミンはほぼアンモニアと同等、メチルアミンは約 7 割の相対発光強度を与えた。反応速度の差が関係しているものと考えられる。

Fig. 4 Effect of *o*-phthalaldehyde concentration in the OPA reagent on CL intensity

The OPA reagent (pH 10.5) contains 16 mM 2-mercaptoethanol and 10 mM phosphate. Sample, $3.4 \mu\text{g NH}_3 \text{ ml}^{-1}$. Other experimental conditions are given in Fig. 2.

次にこれらの物質が NH_4^+ と共存した場合の影響を Table 1 に示す。ほぼ定量的に反応する第一アミン類は除外した。これらの物質の共存により、 NH_4^+ に対する化学発光が減少する場合と増強される場合があった。その原因として、誘導体化反応の速度変化、緩衝能の変化、消光、塩類効果による増光などが考えられるが、明らかではない。 NH_4^+ 標準試料 ($0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$) に対する発光強度を 100% として、これをそれぞれ 10% 減少又は増加させる共存物質の濃度 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) を $C_{90\%}$ 及び $C_{110\%}$ として示した。これらの値は NH_4^+ 定量における許容濃度と考えてよい。いずれも雨水中の濃度と比

Table 1 Effect of coexisting substances on the determination of ammonium ion

Substance	$C_{90\%}$	$C_{110\%}$
Na^+	660	
K^+		120
Ca^{2+}		4
Mg^{2+}		800
Cl^-	>1000	
NO_3^-	>1000	
HCO_3^-	720	
SO_4^{2-}	>2000	
HPO_4^{2-}		50
NO_2^-	1.2	
CH_3OH	>100	
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$		>100
HCOOH		4
CH_3COOH	18	
HCHO	>100	
CH_3CHO	>100	
$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	>10	
$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_3$		4

$C_{90\%}$ and $C_{100\%}$ denote the concentration of the coexisting species ($\mu\text{g ml}^{-1}$) which decrease or increase the CL intensity for NH_3 ($0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$) by 10%, respectively.

Table 2 Determination of ammonium ion in rainwater

Date	Rainfall/mm	<i>n</i>	NH_4^+ found ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
			CL	IC	IB
Nov. 9, 1989	0.6	4	0.145	—	0.217
Nov. 17, 1989	—	6	0.323	—	0.350
Feb. 14, 1990	7.7	4	0.266	0.267	—
Feb. 16, 1990	2.6	6	0.189	0.188	—

n: number of determination; CL: chemiluminescence; IC: ion chromatography; IB: Indophenol Blue spectrophotometry

較して本法の適用に問題がないと考えられる。

3・5 雨水試料への適用

当研究所内において直径 300 mm のポリエチレン製漏斗及びポリエチレン製容器を用いて降水を採取し、直ちに本法により NH_4^+ 濃度を測定した。Table 2 に示すように、同時に検討したインドフェノール青法又は IC 法⁹⁾による定量値とほぼ一致する結果が得られた。本法により降水中の NH_4^+ を連続的に定量できることから、これまでに開発した方法と併せ、CL 法による降水中の多成分逐次連続測定が可能となった。

文 献

- 1) 大寺多敏一: “大気汚染物質の動態”, 磯野謙治編, p. 45 (1979), (東京大学出版会)。
- 2) 指宿亮嗣: “大気の化学” (季刊化学総説 No. 10), 日本化学会編, p. 99 (1990), (学会出版センター)。
- 3) 村野健太郎: 気象研究ノート, (158), 75 (1987)。
- 4) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1993)。
- 5) ASTM D 1426, Ammonia nitrogen in water, American Society for Testing and Materials (1979)。
- 6) K. Takeuchi, K. Nakamura, T. Ibusuki, S. Yoshihiro, S. Shimizu, H. Miura: *Proc. 2nd Int. Congr. Envir. Chem., Hawaii* (1990), pp. 63~73。
- 7) K. Takeuchi, T. Ibusuki: *Anal. Chim. Acta*, **174**, 359 (1985)。
- 8) K. Takeuchi, T. Ibusuki: *Anal. Chem.*, **61**, 619 (1989)。
- 9) K. Takeuchi, S. Kutsuna, T. Ibusuki: *Anal. Chim. Acta*, **230**, 183 (1990)。
- 10) 竹内浩士, 高橋 裕, 忽那周三, 指宿亮嗣: 分析化学, **42**, 439 (1993)。
- 11) M. M. Rauhut: *Acc. Chem. Res.*, **2**, 80 (1969)。
- 12) K. Honda, J. Sekino, K. Imai: *Anal. Chem.*, **55**, 940 (1983)。
- 13) K. Imai, H. Nawa, M. Tanaka, H. Ogata: *Analyst* (London), **111**, 209 (1986)。
- 14) M. Roth: *Anal. Chem.*, **43**, 880 (1971)。
- 15) P. Lindroth, K. Mopper: *Anal. Chem.*, **51**, 1667 (1979)。
- 16) M. H. Memon, P. J. Worsfold: *Anal. Chim. Acta*, **183**, 179 (1986)。
- 17) T. Aoki, M. Munemori: *Anal. Chem.*, **55**, 209 (1983)。
- 18) Z. Genfa, P. K. Dasgupta: *Anal. Chem.*, **61**, 408 (1989)。
- 19) P. A. Sherman, J. Holzbecher, D. E. Ryan: *Anal. Chim. Acta*, **97**, 21 (1978)。
- 20) S. S. Simons, Jr., D. F. Johnson: *J. Org. Chem.*, **43**, 2886 (1978)。

Determination of ammonia/ammonium ion in water by continuous-flow chemiluminescence after derivatization to an isoindole. Koji TAKEUCHI, Chiaki FUSHIMI, Keigo NAKAMURA and Takashi IBUSUKI (National Institute for Resources and Environment, 16-3, Onogawa, Tsukuba-shi, Ibaraki 305)

In order to determine ammonia (NH_3)/ammonium ion in water, a continuous-flow chemiluminescence (CL) system based on an aryl oxalate was developed using the conversion of NH_3 into a fluorescent isoindole derivative. On-line derivatization of NH_3 was carried out in a 200-s reaction coil by mixing with an OPA reagent containing 10 mM *o*-phthalaldehyde, 15 mM 2-mercaptoethanol and 10 mM phosphate (pH 10.5). A 0.5 mM bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) acetic solution and 0.5% hydrogen peroxide (H_2O_2) solution were used as an oxalate CL system. The flow rates of the sample, OPA reagent, TCPO and H_2O_2 solutions were 0.48, 0.24, 2.10 and 0.24 ml min⁻¹, respectively. The detection limit ($S/N=3$) was 2.9 ng ml⁻¹ and the CL intensity was linearly proportional to the NH_3 concentration up to 6 µg ml⁻¹. Although primary amines were derivatized and detected as well as NH_3 , the chemical species usually found in rainwater samples did not interfere with the measurement.

(Received June 11, 1993)

Keyword phrases

chemiluminescence detection; determination of ammonia/ammonium ion after derivatization; isoindole derivative; aryl oxalate; *o*-phthalaldehyde.