環境中の N-ニトロソ化合物の分析法に関する研究 (Ⅱ)

— HPLC によるジアゾ化法を用いた環境中の亜硝酸の分析 —

松居 正巳

株式会社島津製作所 応用技術部
(〒305 つくば市吾妻 3-17-1)

石橋 亨・水野 竹美

財団法人日本医療食協会附属研究所
(〒203 東京都東久留米市前沢 5-3-11)

西川 雅高

国立環境研究所
(〒305 つくば市小野川 16-2)

[平成 4 年 8 月 25 日受理]

Study on Analysis of N-Nitroso Compounds in the Environment (Ⅱ)

— Determination of Nitrite in Environmental Samples by HPLC using Diazotization Reaction —

Masami MATSUI

Tsukuba Analytical Applications Laboratory, Shimadzu Corporation
(3-17-1 Azuma, Tsukuba 305)

Tohru ISHIBASHI and Takemi MIZUNO

Japan Medical Foods Association, Research Laboratory
(5-3-11 Maezawa, Higashikurume, Tokyo 203)

Masataka NISHIKAWA

National Institute for Environmental Studies
(16-2 Onogawa, Tsukuba 305)

[Received August, 25, 1992]

Summary

A new methods have been developped for the determination of nitrite in the environmental water samples by HPLC with post-column and the flow injection analysis(FIA) using diazotization reaction.

The optimum temperature and reaction time were investigated on the diazotization reaction of nitrite.

We could detect 0.001 ppm of nitrite by HPLC and FIA using diazotization reaction and spectrophotometric detection where 540 nm of wave length was used. But it was observed in this method that some interferences existed.

Finally, we determined successfully nitrite in samples containing high concentration of chloride such as tap and sea water by post-column HPLC using derivarization with diazonium salt.

Key words: Nitrite in water, Ion chromatograh, HPLC, Post-column, Flow injection analysis.

1. はじめに

環境における亜硝酸は動植物や鉱物などに起因するものと工業生産に伴って生成する人為的なものに分類される。自然界では亜硝酸と硝酸の形態が可逆的な変化をすることから同一のものとして考えられている。

亜硝酸は生体内や環境中において第2級および第3級アミン類やアミド類などと化学的な条件で強い発がん物質であるN-ニトロソ化合物^{1)~2)}を生成することが知られている^{3)~4)}。また、この物質が湖沼、河川、内海などの富栄養化の指標物質の一つであると考えられていることから環境中の亜硝酸の存在を調べることは重要である。

一般に、亜硝酸の分析はジアゾ化法⁵⁾やイオンクロマトグラフ法⁶⁾で行われている。ジアゾ化法は操作が簡単であるが、反応時間を必要とするばかりではなく、フッ素、塩素、硝酸、硫酸イオンなどの成分との同時分析ができない。また、この反応を利用したフローインジェクション分析法(FIA)がある。亜硝酸以外にフッ素、塩素、硝酸、硫酸イオンなどの成分を同時に分析するイオンクロマトグラフ法は塩素イオンが多量に含まれ、亜硝酸が微量な場合は分析できない。いずれにしても両者の分析法は環境中の0.1ppm以下の微量な亜硝酸を分析することが困難である。

そこで、本研究は環境中の亜硝酸を正確に分析するために、ジアゾ化法を用いたポストカラムHPLC法におけるジアゾ化誘導体の反応時間や反応温度などについて検討し、環境中の亜硝酸分析法に適用した。さらに、海水、水道水、雨水および湖沼水などの試料を用いて本方法と従来のFIAやイオンクロマトグラフ法などで亜硝酸の分析精度を比較し、本法が環境中の亜硝酸分析において従来の分析法よりも優れていたことで報告する。

2. 実験法

2.1 反応試薬の調製

① スルファニルアミド溶液

スルファニルアミド0.5gと12N塩酸5mlを100mlのメスフラスコに入れ、蒸留水で100mlにした。

② ナフチルエチレンジアミン溶液

N-(1-ナフチル)エチレンジアミン塩酸塩0.12gを100mlの蒸留水に溶解した。

③ ジアゾ化反応試薬

スルファニルアミド溶液25mlとナフチルエチレンジアミン溶液25mlを混合し、これを蒸留水で200mlになるように調整し、亜硝酸のジアゾ化反応試薬とした。

2. 2 装 置

① HPLC用ポンプLC-9A

② HPLC用可視・紫外分光光度検出器SPD-6AV

③ HPLC用電気伝導度検出器CDD-6A

2. 3 分析条件

① 装 置: HIC-9A System + Chromatopac C-R4A

② カ ラ ム: Shim-pack IC-A1 (5mm I.D., 100mm L.)

③ 移 動 相: 2.5mM Phthalic acid, 2.4mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane

④ 移動相流速: 1.0ml/min.

⑤ カラム温度: 40℃

⑥ 検 出 器: CDD-6A (Range 1)

SPD-6AV (Abs. 0.01, 0.005)

⑦ 反応液流速: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0ml/min.

⑧ 試料注入量: 20 μ l, 200 μ l

2. 4. 試 料

① 標準試料: フッ素、塩素、亜硝酸、臭素、硝酸、硫酸イオンの成分が各々20, 2.0, 0.2, 0.02ppmになるように調整した。

② 分析試料: 水道水、湖沼水、雨水、雪水、海水

3. 結果および考察

3.1 亜硝酸分析装置

微量な亜硝酸の分析はジアゾ化反応を利用した方法で行われている。この反応は有機化学の教科書によれば、Fig. 1の化学反応式で説明される。

すなわち、亜硝酸イオンはスルファニルアミドによってジアゾニウム塩を、さらにN-(1-ナフチル)エチレンジアミンがアゾ色素を生成する。この生成した化合物を分光光度計の波長540nmにおける吸光度から亜硝酸濃度を求めている。

ここではFig. 1の反応をもとにFig. 2のシステムの装置を考案した。ここで亜硝酸の濃度と吸光度において定量的な関係が求められることができるならば、HPLCとFIAによる亜硝酸の分析に適用できる。

Fig. 1 Chemical formula of diazotization.

Fig. 2 Flow diagram of HPLC and FIA using diazotization reaction for nitrite analysis.

1. Mobile phase, 2. Reagent for diazotization, 3. Liquid pump, 4. Sample injector for HPLC, 5. Column, 6. Column oven, 7. Conductivity detector, 8. Reactor oven, 9. Reaction coil, 10. Spectrophotometric detector, 11. Drain, 12. Sample injector for FIA, 13. Reagent pump

Fig. 2 に示した装置の概略は次のように説明される。すなわち、インジェクター (4) に導入された試料は、容器内の移動相のキャリアー液 (1) によってポンプ (3) を介してカラム槽 (6) 内のカラム (5) に導かれ、そこで亜硝酸と他の成分に分離される。分離された亜硝酸は電気伝導度検出器 (7) で検出される。

しかし、電気伝導度検出器では微量な亜硝酸が選択的に検出されないため、電気伝導度検出器 (7) の出口にポンプ (13) を経た反応試薬 (2) を、反応槽 (8) 内の反応コイル (9) で亜硝酸と反応させ、分光光度検出器 (10) で検出する。

一方、FIA ではポンプ (3)、インジェクター (4)、カラム (5) を経た移動相 (1) をキャリアー液とし、試料はインジェクター (12) から導入される。ポンプ (13) を経た反応試薬 (2) を、反応槽 (8) 内の反応コイル (9) で亜硝酸と反応させ、分光光度検出器 (10) で検出する。

3. 2 ジアゾ化反応試薬の流量と亜硝酸のピーク面積

ジアゾ化反応が亜硝酸イオンの定量分析に及ぼす反応試薬の流速について検討した。

本実験では亜硝酸の濃度が 0.1ppm の試料を用い、キャリアー液の流量を 1 ml/min とし、反応試薬の流速が 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml/min、反応温度を 40℃ に設定し、反応コイルの長さが 2.0m の条件で検討した。

その結果は Fig. 3 に示したが、亜硝酸濃度が 0.1ppm の試料でピーク面積は反応試薬の流量 1.0 ml/min 以上が亜硝酸の定量分析に適応できることがわかった。

3. 3 反応コイル長とジアゾ化反応の検討

反応コイルの長さや亜硝酸の感度の関係を調べるために内径が 0.1mm、長さが 0.5, 1.0, 1.8, 2.0, 2.5, 3.0m のステンレス鋼管の反応コイルを用いた。

反応温度 40℃、反応試薬およびキャリアーの送液量を 1.0 ml/min に設定し、亜硝酸の濃度が 0.1ppm の試料を用いた。Fig. 4 に亜硝酸濃度が 0.1ppm の試料における反応コイルの長さや生成したアゾ化合物のピーク面積の関係について示した。

反応コイルの長さは 2.0m 以上であればジアゾ化反応は一定となり、亜硝酸を定量的に分析できることがわかった。

3. 4 ジアゾ化の反応温度と亜硝酸のピーク面積

反応コイルの温度と亜硝酸のピーク面積の関係を求めるために、反応コイルの長さを 2.0m、温度を 20~99℃ に設定し、亜硝酸濃度が 0.1ppm の試料を用いて検討した。

Fig. 5 はその結果を示したが、反応温度が高くなるにつれて亜硝酸のピーク面積が大きくなった。反応温度が 90℃ でピーク面積は極大値を示した。反応温度が 99℃ では減少し、その効率は 72℃ とほぼ同じであった。

これは反応温度が 90℃ 以上になると、反応試薬のスルファニルアミドや N-(1-ナフチル) エチレンジアミン、あるいは亜硝酸との反応によって生成したアゾ化合物が分解したと考えられた。

したがって、ジアゾ化反応を利用したポストカラム HPLC 法における亜硝酸の条件は反応カラムが 2.0m 以上、反応試薬の流速が 1.0 ml/min 以上、反応温度が 90℃ などの条件が最適であった。しかし、反応温度が 60℃ 以上になると反応槽から検出器出口に至る流路が加熱され、気泡の発生が起こりやすい。このためにノイズの原因となったので、反応槽から検出器の流路を冷却することで解決できた。本実験ではカラムを 40℃ に設定して分析しているので、実験の簡便性を考慮し、カラム恒温槽内に反応コイルを設置した。

反応温度が 40℃ において、亜硝酸の感度は 90℃ に比べ

Fig. 3 Effect of nitrite peak area on reagent flow rate.

Fig. 4 Effect of nitrite peak area on length of reaction coil.

Fig. 5 Relationship of temperature and peak area of nitrite.

て約 1/2 なるが、濃度 0.005ppm の亜硝酸試料を十分に分析できたので、今回の実験では反応温度を 40℃ に設定して行った。

3. 5 亜硝酸濃度とピーク面積の関係

本法で亜硝酸を定量するために亜硝酸濃度とピーク面積の関係について調べた。亜硝酸濃度が 0.005~100ppm の範囲の試料を測定し、そのピーク面積を求めた。

Fig. 6 は亜硝酸の濃度を横軸に、ピーク面積を縦軸に対数グラフ上にプロットした。その結果、亜硝酸の濃度とピーク面積の関係において直線領域は 0.005~10ppm であり、この領域が本方法における亜硝酸の定量分析が可能な濃度範囲であると判断した。

3. 6 HPLC および FIA による亜硝酸の分析精度

本法における分析精度については亜硝酸の濃度が 0.005~1.00ppm の試料で行った。その精度の判定はそれぞれの試料を 10 回測定し、変動係数 (RSD 値) から判断した。

Table 1 はその結果を示したが、亜硝酸の濃度が 1 ppm では RSD 値が小さい。0.005ppm でも RSD 値は 5 % 以下であった。なお、この分析条件では亜硝酸の検出限界は 0.0005ppm であった。

3. 7 環境試料における亜硝酸分析法の比較

本法とジアゾ化法を利用した FIA やイオンクロマトグラフ法で環境試料中の亜硝酸分析について比較した。

FIA 法では Fig. 7 に雨水と湖沼水の試料を分析した測定例を示したが、分析時間が短いことが特徴である。試料 1 検体につき 1 分以内に分析が完了し、同一試料を

Fig. 6 Calibration curve of nitrite.

Table 1 Accuracy of nitrite on FIA and HPLC (n=10)

Concentration of nitrite (ppm)	F I A		H P L C	
	A. V.	RSD (%)	A. V.	RSD (%)
1.00	0.9961	0.837	0.9978	0.438
0.10	0.0998	1.027	0.1014	0.781
0.01	0.0105	2.791	0.0099	2.176
0.005	0.0054	4.925	0.0049	3.904

It used FIA and HPLC with Spectrophotometric detector,
nitrite detected as azo compound.

Fig. 7 FIA signal of standard and water samples.

(I) ; Standard sample, (II) ; Water sample

No. 1 : Rain water (1), No. 2 : Rain water (2)

No. 3 : Lake water (1), No. 4 : Lake water (2)

5 回以上分析し、その平均値を求めたとしても 5 分以内には分析が完了できた。分析精度は別として、この方法は迅速分析として有効な手段である。

一方、イオンクロマトグラフ法では塩素濃度が比較的に高く、亜硝酸濃度が低い試料中の亜硝酸分析に適用できない。たとえば、湖沼水中の亜硝酸分析に従来の電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフ法で分析すると Fig. 8 (I) のイオンクロマトグラムが得られる。

(II)

Fig. 8 Chromatograms of nitrite in lake water.

(I) : Conductivity detector.

(II) : Spectrophotometric detector (540nm)

1 ; F^- , 2 ; Cl^- , 3 ; NO_2^- , 4 ; Br^- , 5 ; NO_3^- , 6 ; SO_4^{2-}

塩素イオンピークのテーリング上に亜硝酸イオンが痕跡程度に検出され、実際には定量分析が困難である。

このような試料に対して、イオンクロマトグラフ法では210～280nmの紫外吸収を測定する間接吸光度型検出法⁷⁾がある。本実験でこの方法を湖沼水試料の分析で試みたが、亜硝酸イオンが検出できなかった。

他方、本方法のジアゾカップリング反応を利用したHPLCの検出器は分光光度検出器を用い、波長を540nmに設定して測定するとFig. 8 (Ⅱ)のクロマトグラムが得られた。塩素イオンは検出されず、亜硝酸イオンのピークがはきりと検出され、亜硝酸濃度0.0005ppmが十分に検出できた。

特に、この方法は色素を含む試料では色素と亜硝酸が分離するので天然物や食品試料などに適用でき、亜硝酸の分析に有効な手段であると考えられた。

3. 8 各分析法による亜硝酸の分析精度

従来の電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフ法とジアゾ化反応を用いたポストカラムHPLCおよびFIA法による水道水、湖沼水、雨水、雪水および海水などの試料中の亜硝酸の分析し、その定量結果についてそれぞれの方法で比較した。

Table 2はその結果であるが、水道水、湖沼水および海水のように、塩素が多量に含まれ、さらに亜硝酸濃度が低い試料はイオンクロマトグラフ法で亜硝酸が分析で

きなかった。

また、ジアゾ化反応を用いたポストカラムHPLCとFIA法を比較するとFIA法はポストカラムHPLC法に比べて亜硝酸が高い値を示している。

これはポストカラムHPLCにより海水中の亜硝酸を分析したクロマトグラムFig. 9で説明できる。すなわち、Fig. 9 (Ⅱ)のクロマトグラム上では波長が540nmで亜硝酸のピーク以外の成分が検出されている。ジアゾ化反応を利用しFIA法は、亜硝酸以外の妨害成分も同時に検出されるので、HPLCに比べて亜硝酸濃度が高い値を示したと考えられる。FIA法による亜硝酸分析に影響を与えた成分は金属イオン、陽イオン、色素などが考えられるが、確認は行っていない。また、海水や水道水ように塩素を多量に含む試料は電気伝導度検出器を用いるとFig. 9 (Ⅰ)に示した如く、塩素が妨害となり、亜硝酸が分析できない。

したがって、FIA法では試料中に亜硝酸分析に対して妨害成分が存在しないことを確認してから、適用すべきである。また、イオンクロマトグラフ法による亜硝酸分析では塩素イオンが多量に含まれ、濃度が低い試料に適用できない。

それに対し、ジアゾ化反応を用いたポストカラムHPLCは亜硝酸分析に妨害する成分の考慮する必要がなく、亜硝酸が低濃度の試料に対しても正確な分析結果が得られることがわかった。また、この方法は電気伝導度

Table 2 Comparison of nitrite contents in water samples by HPLC and FIA methods

Water sample	Nitrite content (ppm)		
	FIA*	HPLC**	HPLC*
Sea water (A)	1.047	ND	0.156
(B)	1.151	ND	0.139
(C)	2.211	ND	0.166
Tap water (A)	0.003	ND	0.002
(B)	0.003	ND	0.001
(C)	0.005	ND	0.002
Lake water (A)	0.993	0.674	0.666
(B)	1.020	0.815	0.771
(C)	2.254	0.502	1.019
Rain water (A)	0.111	0.222	0.231
(B)	0.136	0.102	0.127
(C)	0.417	0.401	0.411

*) Spectrophotometric detector
(Nitrite detected as azo compound)

**) Conductivity detector. (Ion chromatography)

Fig. 9 Chromatograms of nitrite in sea water

(I) : Conductivity detector.

(II) : Spectrophotometric detector (540nm)

1 ; F^- , 2 ; Cl^- , 3 ; NO_2^- , 4 ; Br^- , 5 ; NO_3^- , 6 ; SO_4^{2-}

検出器と併用して使用できるので、亜硝酸以外のフッ素、塩素、臭素、りん酸、硝酸、硫酸イオンなどの陰イオン成分も同時に分析が可能であった。

4. まとめ

本法は環境試料中の亜硝酸イオンを選択的に、かつ高感度で分析するためにジアゾ化法を用いたポストカラムHPLCの反応時間や反応温度などの分析条件について検討し、環境試料中の亜硝酸イオンの新しい分析法を見出した。

湖沼水、河川水、雨水、海水、水道水などを実験試料として用い、本方法とFIAやイオンクロマトグラフ法で亜硝酸分析の比較をした。FIAは亜硝酸イオン以外の成分も検出し、本方法に比べ高い値を示した。また、イオンクロマトグラフ法は塩素イオンが多量に含まれ、亜硝酸濃度が低い試料に適用できなかった。

以上の結果から、従来の環境水中の亜硝酸分析法には

試料によって分析が困難であったり、誤った分析値を示し、無意味な分析値を評価する結果となる。それに対し、本方法は妨害成分と亜硝酸イオンをHPLCのカラムによって分離した後、反応コイルでジアゾ化法を用いたポストカラム法で選択的に高感度で検出しているため、妨害成分の影響も受けずに亜硝酸イオンが分析できた。本方法が環境水中の亜硝酸を分析できる有効な手段であることがわかった。

要 約

ジアゾ化反応を利用したポストカラム法について検討し、HPLCとフローインジェクション分析法(FIA)を併用した環境中の亜硝酸を分析法を開発した。

ジアゾ誘導体の反応による亜硝酸の検出は分光光度検出器の波長が540nmで反応時間、温度、試薬の流速の影響などについて調べた。

FIAは水試料中の亜硝酸0.001ppmを検出することができた。しかし、ジアゾ誘導体化を利用したFIAでは亜硝酸以外に妨害成分があることがわかった。ジアゾ誘導体化を利用したポストカラムHPLC法では多量の塩素イオンを含む水道水や海水などの試料中の亜硝酸を測定することができた。

文 献

- 1) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. and Schmahl, D.: Organotrope carcinogene wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitroso-verbindungen an BD-ratten, *Z. Krebsforsch.*, **69**, 103~201 (1967)
- 2) Magee, P.N. and Barnes, J.M.: Carcinogenic N-nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, **10**, 164~246 (1967)
- 3) Cuello, C., Correa, P., Haensezel, W., Gordillo, G., Brown, C., Archer, M. and Tannenbaum, S.: Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents., *J. Natl Cancer Inst.*, **57**, 1015~1020 (1976)
- 4) Epstein, S.S., Iobal, Z.M. and Johnson, M.D.: in vivo nitrosation of morpholine in mice by inhaled NOx. pp.195~204. "N-nitroso compounds: Analysis, formation and occurrence" Edited by Walker, E.A., Griçute, L., Castegnaro, M., and Borzsonyi, M. IARC Scientific Publications No.31, Lyon, International Agency for Research on Cancer, (1980)
- 5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, p.81~82, 1990, 金原出版株式会社(東京)
- 6) 日本規格協会編：JISハンドブック10環境測定, p.131~140, 1992, 日本規格協会(東京)
- 7) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, p.11~15, 1990, 金原出版株式会社(東京)