アンモニアの吸光光度定量法 (第 3 報¹⁾) m -クレゾールを用いた新吸光光度定量法²⁾

山口良二, 町田孝夫, 植木美知子

星薬科大学³⁾

Colorimetric Determination of Ammonia. III.¹⁾ A New Spectrophotometric Method with m -Cresol²⁾

RYOJI YAMAGUCHI, TAKAO MACHIDA and MICHIKO UEKI

Hoshi College of Pharmacy³⁾

(Received April 22, 1969)

Use of m -cresol improved the reproducibility of data and lowering of blank value from any other method for the determination of ammonia through indophenol formation.

The present method demonstrated a straight linearity between the concentration of ammonium sulfate, from 0 to 30 $\mu\text{g/ml}$, and the absorbance. Apparent molar extinction coefficient on the basis of N atom and coefficient of variance at 20 $\mu\text{g/ml}$ ammonium sulfate were 2.48×10^4 and 1.60%, respectively. Absorbance of blank solution was satisfactorily as low as 0.012 ± 0.003 . Reagents used remained stable only for three days.

New informations concerning reaction mechanism were also obtained. First, the absorbance was dependent not only on the order or the interval of the addition of hypochlorite and m -cresol but also concurrently on the concentration of the former (Fig. 2).

Secondly, the decrease in the concentration of monochloramine, which had formed at the early stage of the reaction, resulted in lowering of absorbance that declined exponentially as a function of addition interval of the two reagents.

著者等は前報¹⁾までに主としてオルト置換フェノールを用いたアンモニアの定量法を報告してきたが、置換基の種類と位置とがインドフェノール色素形成反応の機構に強く関係していると考えられる。事実、オルト位置置換基が $-\text{C}_6\text{H}_5$,⁴⁾ $-\text{OCH}_3$,¹⁾ $-\text{Cl}$,⁵⁾ $-\text{CH}_3$,⁶⁾ $-\text{COOH}$ ⁷⁾ のときはいずれも青く鋭敏に呈色するが、 $-\text{NO}_2$, 2,6-di Cl, 2,6-di NO_2 , $-\text{OH}$ ではまったく青色を与えない。

一方、ナフトール⁸⁾ およびチモール⁹⁾ では、試薬の添加順序が上述のオルト置換体類とまったく正反対のときにだけ強い青色を呈する。著者等はこの事実に興味をもち、今回は m -クレゾールについて主としてこの添加順序および定量分析法として何らかの利点をもつ可能性を重点として検討した。添加順序では次亜塩素酸塩が 0.2% 前後の低濃度ではナフトール型,¹⁰⁾ $1.2 \pm 0.2\%$ の高濃度では o -フェニルフェノール型¹⁰⁾ を示し、かつこれらの最適添加順序がさらに次亜塩素酸塩濃度によって変動するという新知見を得た (Fig. 2 参照)。また、インドフェノール形成によるアンモニア定量法としては、ブランク値がいまままでの諸方法中最低値 (吸光度 0.012 ± 0.003) を示し、感度および再現性もそれぞれ $\Delta A_s/\mu\text{gN/ml}$ 単位¹¹⁾ で 1.64 および 20 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸アンモニウム標準液での変動係数 1.60% を示し、従来のフェノール・次亜塩素酸塩法よりもすぐれていることがわかった。

1) 第 2 報: 山口良二, 町田孝夫, 薬誌, **89**, 804 (1969).

2) 日本薬学会第 89 年会で発表, 名古屋, 1969 年 4 月, 要旨集 p. 390.

3) Location: 41-4-2 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo.

4) 山口良二, 町田孝夫, 薬誌, **88**, 1383 (1968).

5) 山口良二, 町田孝夫, 鈴木はな, 日本分析化学会第 17 年会講演要旨集, B 299.

6) 山口良二, 町田孝夫, 三山敬二, 未発表.

7) J. Reardon, J.A. Foreman, R.L. Searcy, *Clin. Chim. Acta*, **14**, 403 (1966).

8) 森田弥左衛門, 木暮幸全, 日化, **84**, 816 (1963).

9) 橋谷 博, 吉田秀世, 分析化学, **17**, 1136 (1968).

10) 第 2 報¹⁾ 脚注 8) 参照.

11) サンプルとブランクとの吸光度差を最終発色液 1 ml あたりの $\mu\text{g N}$ 数で除した単位. 算出は検量線から行なった.

実験の部

装置および試薬 1. 装置——1) 島津製 QV-50 型分光光度計, 島津製 RS-27 型自記分光光度計, 2) 東亜電波製 HM-5 型 pH メーター.

2. 試薬——1) 4% (v/v) *m*-クレゾール・エタノール溶液 (以下 Pmc と略記), 2) 0.1 M ホウ砂緩衝液 (pH 11.40) (以下 BU), 1% ニトロプルシッドナトリウム水溶液 (以下 NP), 4) 0.2% (有効塩素 %) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (以下 HC), 5) 硫酸アンモニウム標準液 (以下 S)—2 回水から再結晶した硫酸アンモニウム 100 mg を正確に秤りとり, 精製水で 1000 ml とした貯蔵原液を用時精製水で正確にうすめて標準液とした.

定量法 共栓試験管に検液 0.5 ml をとり, これに 0.2% HC 1.0 ml を加え, 直ちに 4% Pmc 0.5 ml, 0.1 M BU 1.0 ml および 1% NP 0.1 ml を順次間をおかずに試験管をふりながら添加し, よく混和させ, 60±0.5° で 30 min 反応させる. 反応後流水で冷やし, エタノール 2.0 ml を加え均一になるまでふりまぜ, 同様に同時に操作した試薬ブランクを対照として波長 665 mμ で吸光度を測り, アンモニア濃度を検量線から読みとる. 必要ある時はサンプルとブランクとの吸光度を精製水を対照として別々に読みとる.

結果および考察

定量条件の検討 1. 吸収スペクトル——本定量法の最終発色液の吸収スペクトルを自記分光光度計で測り, Fig. 1 に示した. 665 mμ に極大吸収を示したので, 以後の定量条件の検討では, すべて 665 mμ における吸光度を用いた.

2. 試薬添加順序と HC 濃度——本法の試薬添加順序をパラメーターとし, HC 濃度を変えたときの吸光度変化を Fig. 2 に示した. この際, すべての試薬は“順次”直ちに加えられるように操作した. 図から解るように, サンプル値では, HC 濃度 0.2% で最高値を示す HC→Pmc 型の添加順序の群と HC 濃度 1.2±0.2% で最高値を示す Pmc→HC 型の群との 2 群に分れ, HC 濃度 0.6% 前後で両群の吸光度の大きい順位の逆転する. この両群の最大吸光度はほぼ等しいが, 前者にはプラトー部分がなく, 後者には HC 濃度 1.2±0.2% の範囲にプラトー部分がある. またブランク値は NP を最後に添加したとき最小値を与えた. これらの結果と後述する再現性の良

Fig. 1. Absorption Spectra of the Reaction Product

—: sample
-----: reagent blank

さとから, 著者等は 0.2% HC で S→HC→Pmc→BU→NP の添加順序を採用した. なお, NP を加えないと, この添加順序でも感度が約 1/7 (吸光度 0.113) に低下し, この点ナフトール⁸⁾ やチモール⁹⁾ とは異なっていた.

前述の順位逆転の事実のうち, HC→Pmc 型で HC 濃度増大とともに吸光度が低くなる原因としては, 3. で述べるように S と HC との反応生成物 (NH₂Cl) が次に Pmc が添加されるまでの間に分解されるが, その分解の速度が HC 濃度増大とともに早くなるためと考えられる. 他方 Pmc→HC 型の方は, 別種の反応機構による呈色反応と考えられ, 事実 NP 濃度とその添加の時期とで結果の呈色が左右されたが, 詳細は後報にゆずる.

3. 試薬の添加間隔時間の検討——ナフトール⁸⁾ とチモール⁹⁾ の場合, 検体に HC を加えたのちフェノール類を加えるまでの時間 (以下 τ と略記) が吸光度に多少変動を与えているので, 本法でもこれを検討し, 結果を Fig. 3 (a) に示した. なおこのとき, Fig. 2 の添加順序のうち (1), (3), (4) の 3 種の順序を選び出して比較検討した. (4) のような Pmc→HC 型の順序ではこの変動が小さいが, (1), (3) のような HC→Pmc 型では τ 増大とともに急激に低下した. しかし, ブランク値では両型でありちがいがなかった. (1), (3) の曲線はいずれも τ に対して指数関数関係になっていて, 吸光度を A_s と表わすと,

$$A_s = A_{s_0} e^{-a'\tau} = A_{s_0} \cdot 10^{-a'\tau}$$

なる式で表わされた. a' の値は Fig. 3 (b) の直線の勾配から求められ, それぞれ, 順序 (1) では, 0.17 min⁻¹, 順序 (3) では 0.21 min⁻¹ であった.

したがって本法のように順序 (1) を採用した場合, この τ を常に一定にして操作せねばならない. 本法では試料に HC 添加後“直ちに” Pmc を試験管をふりながら加えることにした. 本現象の原因としては, 秋山¹²⁾ が提

12) 秋山 高, 分析化学, 10, 1040 (1961).

Fig. 2. Cooperative Effect of Addition Order and Concentration of Sodium Hypochlorite

—: sample - - - - -: blank
 (1) S-HC-Pmc-BU-NP
 (2) S-HC-NP-Pmc-BU
 (3) S-NP-HC-Pmc-BU
 (4) S-NP-Pmc-BU-HC
 (5) S-Pmc-BU-NP-HC
 (6) S-Pmc-BU-HC-NP

示したように、S→HC 段階で生成した NH_2Cl が短寿命で擬一次反応様式に従って主反応系列からはずされていくためと考えられ、このとき NP が共存すると、その速度定数が大きくなると解釈される。

4. 各試薬濃度の検討—1) pH: 0.1M ホウ砂・1N 水酸化ナトリウム緩衝液で 9 点の pH 系列をつくり、pH 依存性を検討した。結果を Fig. 4 に示した。pH 11.2—12.5 の範囲では一定の吸光度差を与えたので、pH 11.4 の緩衝液 1.0 ml を用いることにした。

なお pH を 13.0 以上にしたときは白—淡黄の沈殿を与えた。

Fig. 4. Effect of pH

—○—: sample
 - - -○- - -: blank

Fig. 3. Effect of Addition Interval between *m*-Cresol and Sodium Hypochlorite (τ) (a) Absorbance vs. τ , (b) log (Absorbance) vs. τ

—: sample, - - - - -: blank
 (1) S-HC-Pmc-BU-NP
 (3) S-NP-HC-Pmc-BU
 (4) S-NP-Pmc-BU-HC

2) NP 濃度: NP 濃度を 0—5% まで変え吸光度をプロットし、Fig. 5 に示した。0% では吸光度 0.113, 0.75% で最大吸光度差 (約 0.63) になり、0.75—2% の間はそのまま一定値を示したが、5% ではわずかに低下した。本法では NP 濃度 1.0% を採用した。なお、この Fig. 5 のカーブは第 1 報の *o*-フェニルフェノールの平行上昇カーブとは異なり、第 2 報のグアヤコールのそれに似ている。また、前述の添加順序と NP 必須との点ではフェノール¹³⁾ に類似し、ナフトール型と *o*-フェニルフェノール型¹⁰⁾ との中間の性質を示している。

3) Pmc 濃度: Pmc の濃度を 0.5—5% (v/v) まで変え吸光度をプロットし、Fig. 6 に示した。4.0% で最高値を示したので、この濃度を採用した。

4) 発色液の安定性: 60°, 30 min 反応させた発色液を 23° の室温に 60 min および 24 hr 放置しても吸光度はまったく不変であ

13) a) M.W. Weatherburn, *Anal. Chem.*, **39**, 971 (1967); b) W.T. Bolleter, C.J. Bushman, P.W. Tidwell, *ibid.*, **33**, 592 (1961).

Fig. 5. Effect of Sodium Nitroprusside Concentration

—○—: sample
---○---: blank

Fig. 6. Effect of *m*-Cresol Concentration

—○—: sample
---○---: blank

った。

5) 反応温度と時間: $60 \pm 0.5^\circ$ の反応温度で加温時間を 5—60 min の間変化させて吸光度を測った結果を Fig. 7 に示した。

わずか 10 min で吸光度差が最高値に達し、以後 60 min まで一定であった。しかし、サンプル、ブランクともに 30 min までは飽和値に達していないので、反応時間を 30 min と定めた。なお、反応温度 30° では 2 hr 加温しないと飽和値に達せず、 45° では 20—30 min で最高値に達するが、35—60 min の間でそれより 10% ほど低いプラトーを示し、いずれも反応条件として不適当と考えられた。

検量線の作製 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5—30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準液 6 種類を調製し、各測定点ごとに 3 回ずつ測定した結果を Fig. 8 に示した。原点を通る直線関係が 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで成立った。この検量線から求めた最終発色液から見た見かけのモル吸光係数および $\mu\text{gN}/\text{ml}$ 単位の吸光度は、それぞれ 2.48×10^4 および 1.64 であった。この感度は *o*-フェニルフェノール法⁴⁾ のよりは小さいが、グアヤコール¹⁾、フェノール法¹³⁾ のよりは大きい。

本法の精度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度での 10 回のくり返し実験による精度検定の結果を Table I に示した。変動係数 (C.V.) 1.60% で、フェノール¹³⁾ やチモール⁹⁾ の 2—5% よりも、また *o*-フェニルフェノール⁴⁾ やグアヤコール¹⁾ の 2.4% や 2.3% よりも大きく改善された精度を示した。なお、他の添加順序の場合、い

ずれも 10 回のくり返し実験で、 $\text{S} \rightarrow \text{NP} \rightarrow \text{Pmc} \rightarrow 1.2\% \text{ HC}$ では C.V. 3.9%, $\text{S} \rightarrow \text{Pmc} \rightarrow 1.2\% \text{ HC} \rightarrow \text{NP}$ では 3.99%, $\text{S} \rightarrow \text{NP} \rightarrow 0.2\% \text{ HC} \rightarrow \text{Pmc}$ では 6.75% と、すべてより悪い精

Fig. 7. Variance with Reaction Time (at 60°)

—○—: sample
—x—: difference
---○---: blank

Fig. 8. Calibration Curve

TABLE I. Reproducibility of *m*-Cresol Method

No.	Absorbance at 665 m μ			Statistical values
	20 μ g/ml (NH ₄) ₂ SO ₄	Blank	Difference	
1	0.721	0.010	0.711	means of difference ($\bar{X}$) 0.706
2	0.730	0.010	0.720	
3	0.700	0.009	0.691	
4	0.697	0.010	0.687	standard deviation (σ) 1.133×10^{-2}
5	0.718	0.011	0.707	
6	0.720	0.010	0.710	
7	0.700	0.012	0.688	coefficient of variance (C.V.) ($\sigma/\bar{X} \times 100$) 1.60%
8	0.730	0.012	0.718	
9	0.723	0.011	0.712	
10	0.725	0.010	0.715	

度を示した。

本法の経日変化 1968年11月13日から同年12月11日までの29日間における本法の同一試薬による経日変化を検討した。試薬類はすべて冷蔵庫中に保存したが、わずか3日ほどしか安定でなくて、のち日数に関する2次方程式型で急速に吸光度が低下した。ただし、0.2% HC を用時必要な容量だけ共栓コルベンに取り出して用いた場合少なくとも1週間は同一吸光度を与えた。