アンモニアの吸光光度定量法 (第2報¹⁾)   グアヤコールを用いた
アンモニアの新吸光光度定量法²⁾

山口良二, 町田孝夫

星薬科大学³⁾

Colorimetric Determination of Ammonia. II.¹⁾   A New Spectrophotometric
Method for the Determination of Ammonia with Guaiacol²⁾

RYOJI YAMAGUCHI and TAKAO MACHIDA

Hoshi College of Pharmacy³⁾

(Received November 4, 1968)

A new colorimetric method for the determination of ammonia with guaiacol and sodium hypochlorite was studied and a recommended procedure was proposed. This method gave remarkably lower absorbance of blank and better reproducibility than the previously reported *o*-phenylphenol method.¹⁾ With considerations on the occurrence of side reaction and the reaction rate, suitable concentrations of hypochlorite and nitroprusside were determined. Almost all the variables influencing the color reaction were examined.

Coefficient of variance at 20 μ g/ml ammonium sulfate solution and apparent molar extinction coefficient (based on N atom) at 680 $m\mu$ were found to be *ca.* 2.3% and 1.92×10^4 , respectively. These values indicate sufficient sensitivity for estimating the quantity of ammonia and correspond to absorbance of 1.36 per μ g·N/ml of the final colored solution. The probable reasons for the better reproducibility and low blank value were also briefly discussed.

アンモニア定量法としては高感度なフェノール・次亜塩素酸塩法がよく用いられているが、再現性に乏しい難点がある。著者等は、この高感度を保ちながら精度を高める一方法としてフェノール誘導体をスクリーニングしアンモニア測定に使用可能なものを選び、その定量法の諸条件を検討している。第1報¹⁾として*o*-フェニルフェノールを用いた定量法を報告したが、今回グアヤコール (*o*-メトキシフェノール) を用いた定量法を検討し、再現性の改善、ブランク値の低下などの知見を得た。

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) 3% (w/v) グアヤコール・エタノール⁴⁾ 液 (以下 Pg と略記), 2) 0.3 M ホウ酸緩衝液 (pH 11.50): 0.3 M ホウ酸・塩化カリウム液に 1 N 水酸化ナトリウムを加え, pH メーターで pH 11.50 に調製, 3) 0.5% ニトロプルシッドナトリウム水溶液 (以下 NP), 4) 0.15% 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: 硫酸アンモニウム⁵⁾ 10 mg を正確に秤とり精製水⁶⁾ で 100 ml とした貯蔵用原液を用時精製水で希釈して標準液とする。

定量法 共栓試験管に検体 (または標準液) 0.5 ml, 3% Pg 0.5 ml, 0.3 M ホウ酸緩衝液 1.0 ml, 0.5% NP 0.1 ml および 0.15% HC 1.0 ml を順次添加してよく混合したのち, $45 \pm 0.5^\circ$ で 40 min 加温する。反応後流水で冷しエタノール 2.0 ml を加え, 振盪後, 試薬ブランクを対照にして波長 680 $m\mu$ で吸光度を測定する。

1) 第1報: 山口良二, 町田孝夫, 薬誌, 88, 1383 (1968).

2) 日本分析化学会第17年会で発表, 広島, 1968年10月, 要旨集 B 300.

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

4) 市販1級エタノールにアルカリ性 KMnO_4 数 ml を加え, 蒸留し bp 78.5° の留分を使用した。

5) 精製法は第1報注 11) 参照。

6) 本法のすべての水溶液には Dowex-50w-X16 で脱アンモニアした精製水を用いた。

定量条件の検討⁷⁾ 1. 吸収スペクトル——発色液の吸収スペクトルを自記分光光度計で測定し、Fig. 1 に示した。波長 680 m μ に極大吸収をもった吸収曲線が得られた。以後の定量条件の検討にあたっては、すべて波長 680 m μ を使用した。

2. 試薬添加順序——本法の試薬添加順序を検討し、Table I に示した。挙動は前報¹⁾と同様の傾向を示すが、HC を P_G の前に添加した際の吸光度は前報¹⁾にくらべ発色阻止が少なくなっている。この点では *o*-フェニルフェノール型⁸⁾とは少し異なっている。また、NP を加えないと発色強度が低下する。以上のことから、本法は、*o*-フェニルフェノール型とナフトール型との中間に位置しているものと思われるが、各添加順序における発色強度、NP 添加の必要性などからみて *o*-フェニルフェノール型に

Fig. 1. Absorption Spectra of the Reaction Product

—: sample (NH₄)₂SO₄, 0.42 μgN/ml
 ----: reagent blank

TABLE I. Effect of Addition Order of Reagents

	Addition order (from left to right)	Absorbance at 680 m μ	Blank	Difference (Δ As)
①	S-P _G -BU-HC-NP	0.756	0.156	0.600
②	S-P _G -BU-NP-HC	0.764	0.184	0.580
③	S-HC-P _G -BU-NP	0.576	0.101	0.475
④	S-HC-NP-P _G -BU	0.459	0.116	0.343
⑤	S-NP-P _G -BU-HC	0.755	0.187	0.568
⑥	S-NP-HC-P _G -BU	0.581	0.120	0.461

S: sample solution (20 μg/ml ammonium sulfate)

P_G: 3% (W/V) guaiacol/ethanol

BU: 0.3M borate buffer (pH=11.50)

HC: 0.15% sodium hypochlorite

NP: 0.5% sodium nitroprusside

0.5 ml

0.5 ml

1.0 ml

1.0 ml

0.1 ml

Fig. 2. Effect of Reaction Time (at 45°)

—○—: gained (G)   —●—: (G)-(B)
 ---○---: blank (B)

帰属される。Table I で ①, ②, ⑤ はほぼ同程度の吸光度を示すが、このうち再現性をもっともよい②の順序を本法では採用した。

3. 反応温度と時間——45±0.5° でこの反応時間を検討し、Fig. 2 に示した。図のように、20 min ではほぼ最大発色に達し、以後わずかな吸光度を増し 35 min から 50 min までは一定となる。したがって、40 min 加温を採用した。

4. 試薬濃度の検討——1) 至適 pH: 0.3M ホウ酸-塩化カリウム-1N 水酸化ナトリウム緩衝液で 9 点の pH 系列を調製し、本法の pH 依存性を調べた結果を Fig. 3 に示した。pH 10.50—12.50 までは一定の吸光度を示すので、pH 11.50 の緩衝液 1.0 ml を用いることにした。なお、本法では pH が重要な吸光度変動因子の 1 つとなっており、長期にわたる試薬保存の際には pH 変動による吸光度の減少が認められるので、保存方法に留意することと、使用前に pH をチェックしておくことが望ましい。

2) HC 濃度: HC の濃度を変えて 680 m μ の吸光度を測り結果を Fig. 4 に示した。図のように、試料とブランクとの吸光度差は 0.1—0.3% の間で一定値を示す。「考察」で後述する理由からこのうちできるかぎり低濃度の 0.15% を採用した。

3) NP 濃度: NP の濃度を変えて発色させ吸光度をプロットし Fig. 5 に図示した。図のように、0.4—0.6% の間で

7) (NH₄)₂SO₄ 20 μg/ml を使用。最終窒素濃度は 0.42 μgN/ml に相当する。

8) ここでいう *o*-フェニルフェノール型、ナフトール型とは著者等がつぎの観点から分類したものである。*o*-フェニルフェノール型とは、添加順序が試料→フェノール類→次亜塩素酸ナトリウムの場合、発色強度が最大で、NP が感度上不可欠のもの。ナフトール型とは、これが試料→次亜塩素酸ナトリウム→フェノール類で NP を必ずしも必要としないもの。

は一定の吸光度を示す。NP 濃度を高めていくとわずかずサンプルの吸光度が低下し、ブランク値は逆に上昇する傾向があり、これは前報¹⁾の *o*-フェニルフェノールの場合の挙動とはことなっている。

4) P_G 濃度: P_G の濃度を変化させて吸光度をとった結果を Fig. 6 に示した。図のように、 P_G 濃度 2.5—4% の間ではほぼ一定の吸光度となるので、3% を採用した。なお、この濃度を 1—10% と変化させた結果によると、3% までは極大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) が最高 12 $m\mu$ まで漸次短波長にシフトし、3% から 10% まででは $\lambda_{\max}$ のシフトはなかった。

5. 発色液の安定性——45° で 40 min 反応させた発色液を室温に 60 min 放置しても吸光度の減少はなく、むしろほんの少し上昇することがある。この上昇分も 1 hr で飽和に達し、20 $\mu\text{g/ml}$ サンプルで 0.008, ブランクで 0.004 ほどの微少にすぎず無視できる。また、20 hr 放置しても退色はまったくみとめられなかった。

Fig. 3. Effect of pH

—○—: gained (G)   —●—: (G)-(B)
 ---○---: blank (B)

Fig. 4. Effect of Sodium Hypochlorite

—○—: gained (G)   —●—: (G)-(B)
 ---○---: blank (B)

Fig. 5. Effect of Sodium Nitroprusside

—○—: gained (G)   —●—: (G)-(B)
 ---○---: blank (B)

Fig. 6. Effect of Guaiacol

—○—: gained (G)   —●—: (G)-(B)
 ---○---: blank (B)

検量線と感度 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g/ml}$ の標準液を調製し, その各 0.5 ml をとり, 定量法に準じて操作した結果を Table II に示した. 30 $\mu\text{g/ml}$ までは Beer 則が成立した. このデーターから求めた見かけのモル吸光係数 (ϵ') は 1.92×10^4 で, 前報¹⁾ の *o*-フェニルフェノール法の 3.36×10^4 ⁹⁾ より低い, 通常のフェノール法¹⁰⁾ より約 10% 高感度であった.

TABLE II. Calibration Data

$\mu\text{g (NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$	$\mu\text{gN/ml}$	Absorbance at 680 $m\mu$
0	0	0.143
5.0	0.10	0.285
10.0	0.21	0.427
15.0	0.31	0.570
20.0	0.42	0.713
25.0	0.52	0.855
30.0	0.63	0.995

本法の精度および他法との比較 本法による 17 例の標準偏差 (σ), 変動係数および感度を, 著者等が行なった他法による数値とともに Table III に示した. 本法の変動係数は *o*-フェニルフェノール法の 70%, フェノール法の約 22% に相当するよい精度を与えた. また, 本法のブランク値は *o*-フェニルフェノール法の吸光度 0.35 内外よりは低い 0.14 を示したが, フェノール法の 0.03 より高かった.

TABLE III. Comparison with Other Methods

	Present method	<i>o</i> -Phenylphenol method	Phenol method
Number of measurement	17	19	19
Final concn. of ammonium sulfate (c , $\mu\text{gN/ml}$)	0.42	0.27	0.64
Mean value of absorbance ($\bar{X}$)	0.567	0.607	0.783
σ	0.013	0.019	0.083
$\sigma/\bar{X} \times 100$ (%)	2.3	3.3	10.6
Sensitivity ^{a)}	1.36	2.23	1.23

a) Read out from each calibration curve (dimension agree to $\bar{X}/c$).

考 察

本法の特徴として下の 4 項をあげることができる.

- 1) インドフェノール形成反応以外の副反応が肉眼的に認められること.
- 2) NP 濃度が高くなるにつれて吸光度が極大を経て減少すること.
- 3) 添加順序は *o*-フェニルフェノール型であり NP の共存は発色強度を大きく強めること.
- 4) 再現性は *o*-フェニルフェノール法よりややまさり, 感度は 60% ほどであり, ブランク値は低い.

1) に関しては, インドフェノール形成反応以外の副反応が存在していることが呈色挙動から指摘できる. すなわち, HC 添加直後赤褐色が反応液に現われ, これは脱アンモニウム精製水を用いたブランクでもサンプルと同程度の強度で現われることおよび P_g と HC のみでも同じ現象が起きることから明らかである. しかも, HC 添加直後に呈色することから主反応であるインドフェノール形成反応よりも反応速度が速いと推定される. この現象はフェノールでは肉眼的に認められないことから, オルト位のメトキシ基の置換基効果と思われインドフェノール形成反応の反応機構の 1 部を示唆するものと推測される. 副反応の本体はまだ不明であるが, 2,6-ジメチルフ

9) 前報の 6.72×10^4 は硫酸アンモニウム濃度での値であり, 窒素濃度では, この値となる.

10) 1% HC を用いた. 前報の Table II および日本分析化学会第15年会講演要旨集, B 231, 1966年, 福岡を参照.

フェノールと HC との反応で $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ や $\text{O}=\text{C}_6\text{H}_4=\text{C}_6\text{H}_4=\text{O}$ などが生成する¹¹⁾ ことから、これに類似した反応とも考えられる。本法の定量操作法を見いだす際この副反応に留意して試薬濃度 (特に HC) をできるかぎり低濃度にして副反応の進行を防ぐようにしたために、再現性を従来よりも良好になし得たと考えられる。

2) に関しては、前報¹⁾ の *o*-フェニルフェノール法では NP 濃度 0.5% 以上 3% までサンプル、ブランクとも平行的に吸光度が急上昇しその差は一定となったが、本法ではブランクの場合は NP 濃度に比例してやや増大するが、サンプルの吸光度はほぼ一定かむしろ下降きみである。これは NP 0.6% 以上では、サンプルの場合でのみ途中のある素反応段階で NP の関与する副反応が存在することを暗示する。この副反応は *o*-フェニルフェノールでは起こりにくいグアヤコールでは起こりやすいと解釈される。しかし一方、NP 濃度が高くなると最大発色にたつする時間も短かくてすむので、NP は主反応プロセスにも関与していると考えられる。そこでこの両効果の中間点として NP 濃度 0.5% がえられた。

3) に関しては、一般にフェノール類 (P) のあとに HC が加えられるときには、再現性がよく逆順では悪い。これは、ナフトール¹²⁾ やチモール¹³⁾ の場合のように HC 添加後の P を加える時期すなわち添加間隔時間の大小によって、呈色はかなり大きく変動する事実によると考えられる。著者等の研究によれば *o*-フェニルフェノール¹⁾ と *o*-クロロフェノール¹⁴⁾ とは、いずれも P→HC 型に属し、その再現性 (C.V.) はおのおの 3.3% および 1.5% と良好であり、呈色の安定性も十分によい。本法のグアヤコールでは、この 2 者の場合ほど明白ではないが Table I に示すようにどちらかといえば P→HC 型で、再現性も 2.28% とよい。これら 3 者の場合、P を加えたあと HC を加えるまでの間隔時間について留意する必要がある利点があり、本法でも 1 hr 間隔を置いても結果の呈色になんらの変化も認められなかった。ただ、溶液が均一であることが大切であるようで、HC 添加の直前、直後で十分に攪拌したときと、しなかったときとでは再現性に倍以上の差が認められた。

4) に関しては、本法の再現性がよくなっている理由については 1)—3) で前述した通りであるが、ブランク値が *o*-フェニルフェノール法¹⁾ よりも低値を示す理由について多少考察する。第 1 に *o*-フェニルフェノール法¹⁾ ではジメチルホルムアミド (DMF) を主溶媒としているが DMF の蒸留精製の有無と程度によって、ブランク値が大きく変動した。すなわち、DMF 中に本反応陽性物質が多少混在していたと考えられる。第 2 には、*o*-フェニルフェノール法¹⁾ では NP 濃度が 1% という高濃度を用いているので副反応による 690 mμ 吸光度分がブランクでも増大したものと考えられる。

感度比較については、次報の *o*-クロロフェノール法¹⁴⁾ において電子論的に考察する。

11) R.G.R. Bacon, A.R. Izzat, *J. Chem. Soc. (C)*, 1966, 791.

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

13) a) R. Th. Roskam, D. de Langen, *Anal. Chim. Acta*, **30**, 56 (1964); b) 橋谷 博, 吉田秀世, 分析化学, **17**, 1136 (1968).

14) 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, B299.