

〈研究発表〉

リン酸イオンの簡易な高感度測定法の開発

木曾祥秋¹⁾, 仁木圭三¹⁾, 三浦 晃¹⁾, Yong-Jun Jung²⁾

豊橋技術科学大学エコロジー工学系 (441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1, E-mail: kiso@eco.tut.ac.jp)¹⁾
Catholic University of Pusan (9, Bugok 3-dong, Keumjeong-gu, Pusan, 609-757, Korea)²⁾

概要

リン酸イオンの高感度測定は、水環境のモニタリングだけでなく物理化学的なリン除去プロセスの解析においても必要性が高い。本研究では、従来のフローインジェクション法によるリン酸イオンの定量限界より低濃度のリン酸イオンを簡易に定量できるメンブレン抽出法を開発を行った。本法は、特別な測定機器を必要としないことが特長である。リン酸イオンは、従来から用いられているモリブデンブルーとして発色させた。3 価の陰イオンであるモリブデンブルーと dodecyltrimethylammonium (DTMA) イオンのイオン会合体を形成し、これをメンブレンフィルターでろ過してフィルター上に捕捉した。このフィルターをアセトニトリルで抽出して吸光度を測定した。100 mL の試料を用いて 10 mL のアセトニトリル溶液として抽出した場合、検出限界は $0.3 \mu\text{g-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ であった。

キーワード: リン酸イオン, 微量分析, メンブレン抽出, イオン対形成, 四級アンモニウム

1. はじめに

窒素とともにリンは富栄養化の制限物質であり、水質管理のためには基本的なモニタリング対象物質である。自然水中でのリンの動態を検討するためには微量のリンを検出する必要がある¹⁻⁴⁾。また、リン酸塩除去技術の開発においても高感度測定が必要である⁵⁾。低濃度レベルのリン酸は、溶媒抽出法 ($3 \mu\text{g-P L}^{-1}$) やフローインジェクション (FIA) 法による自動分析装置⁶⁾ (約 $1 \mu\text{g-P L}^{-1}$) によって測定されているが、より簡易でかつ安価な方法で微量分析が可能となれば、広範なリン制御技術の開発研究において有用といえる。

リン酸イオンの分析は、Murphy and Riley⁷⁾が開発したモリブデンブルー法を基礎としており、FIA による測定においてもその基礎となっている⁸⁾。また、モリブデンブルーはアニオンであることから、カチオン染料や四級アンモニウムイオン等の有機カチオンとイオン対を形成するので、このイオン対形成を用いた分析方法も開発されている⁹⁾。また、著者ら^{9,10)}は、イオン対形成反応を用いたリン酸イオン測定用検知管の開発を行ってきた。ここでは、四級アンモニウム塩を担持したカラム充填剤にモリブデンブルーが捕捉されて着色帯を形成し、着色帯長さからリン酸イオンが定量できる。近年、FIA によるリン酸イオンの超微量分析法にもイオン対形成手法が利用されている¹¹⁾。

これら超微量分析に用いられている FIA システムは特別に設計されたものであり、一般に利用することができない。特別な装置を使用せずにリン酸イオンの微量分析を行うためには、モリブデンブルーもしくはモリブデンブルーと有機カチオンのイオン対のいずれかを濃縮す

る方法が必要となる。このイオン対は極性有機溶媒で抽出可能であり、またメンブレンフィルター¹²⁾やポリウレタンフォーム¹³⁾で捕捉が可能である。メンブレン抽出は、最も簡易な方法の一つであるが、Taguchi ら¹²⁾はセルロースアセテートのメンブレンフィルターを用い、メンブレンフィルターもジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させたが、イオン対のみを抽出できる方が望ましい。

本研究ではメンブレン抽出法に着目し、イオン対形成試薬として無色のドデシルトリメチルアンモニウム (DTMA) 塩を用いた。モリブデンブルーと DTMA のイオン対を形成させ、それを親水性 PTFE 膜でろ過することによりイオン対を捕捉し、捕捉したイオン対をアセトニトリル (CH_3CN) で抽出して吸光度を測定した。イオン対形成反応の条件、イオン対の抽出条件、検出限界等について検討を行った。

2. 測定方法

2.1 試薬

US Standard method⁶⁾に従って、硫酸、酒石酸アンチモニルカリウム、モリブデン酸アンモニウム、アスコルビン酸を用いて混合試薬を調製した。リン酸塩溶液は、 $1000 \text{ mg-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ の原液を調製し、所定の濃度に希釈した標準溶液を調製した。イオン対形成試薬として、dodecyltrimethylammonium bromide (DTMA-Br) を用い、0.1w/v%のメタノール溶液を調製した。

2.2 発色, イオン対形成, 抽出

標準溶液 100 mL にモリブデン酸混合試薬 16 mL を加えて室温 (約 20°C) で 10 分間反応させてモリブデンブルーを形成させた。ここに、DTMA-Br 溶液 (3 mL) を

加えて、1～30 分間超音波を照射してイオン対を形成させた。その後、この溶液の全量を親水性 PTFE メンブレンフィルター (H-PTFE; 直径: 47mm; 細孔径: 0.2 μm) で吸引ろ過した後、H-PTFE を 10 mL の CH_3CN に浸漬し、氷水中で超音波照射して抽出を行った。この抽出液を用いて波長 690 nm における吸光度を測定した。基本的な分析操作を、Fig.1 に示す。

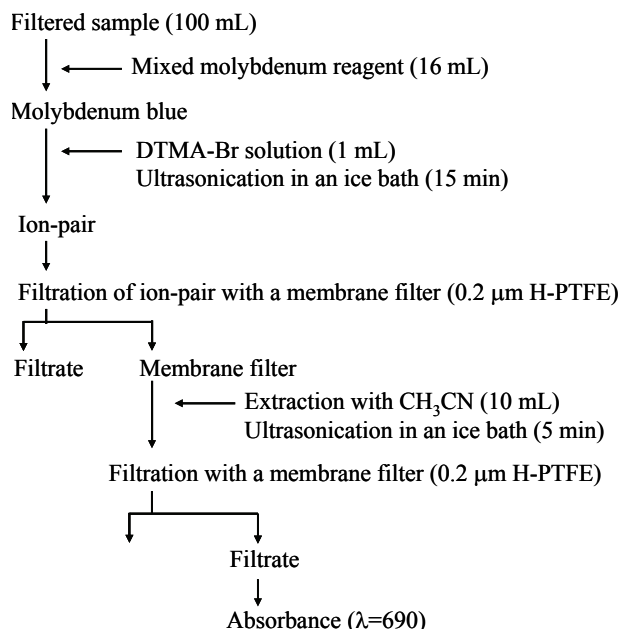


Fig.1: Proposed analysis procedure for trace-level aqueous phosphate

3. 結果と考察

3.1 DTMA-Br 溶液の至適添加量

本法においては、効率的なイオン対形成とイオン対抽出が測定精度を支配する重要な因子である。イオン対形成を利用した検知管測定法^{9,10}では、イオン対形成試薬として benzylcetyldimethylammonium (BCDMA) 塩を用いたが、溶解度が低いため未反応の BCDMA 塩も H-PTFE 膜に捕捉され、 CH_3CN 抽出液が白濁する場合が認められた。Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTMA-Br) 溶液 (0.1w/v% のメタノール溶液) と DTMA-Br 溶液を用いて検討を行った。標準溶液 200mL に対してこれら溶液の添加量を変化させた場合の抽出液の吸光度を Fig.2 に示す。HTMA-Br 溶液添加系では、不溶性の沈殿物が認められ、添加量の相加に伴って吸光度も増加した。一方、DTMA-Br 溶液添加系では、安定した吸光度が得られ、本測定法に適切なイオン対形成試薬であった。したがって、標準溶液 100 mL に対して DTMA-Br 溶液を 3 mL 添加する条件とした。

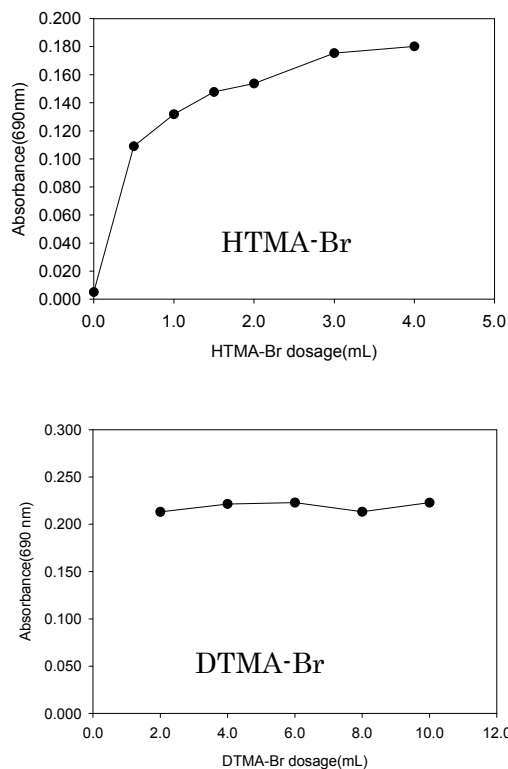


Fig.2: Effects of dosage of HTMA-Br or DTMA-Br

3.2 イオン対形成の反応条件

50 $\mu\text{g-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ の標準溶液 100 mL を用いてイオン対形成条件について、室温あるいは氷水中で超音波照射し、反応時間の検討を行った。最終の CH_3CN 抽出液の吸光度と反応時間の関係を Fig.3 に示す。氷水中での反応の方が高い吸光度を示し、反応時間が 5～30 min において吸光度は安定していた。

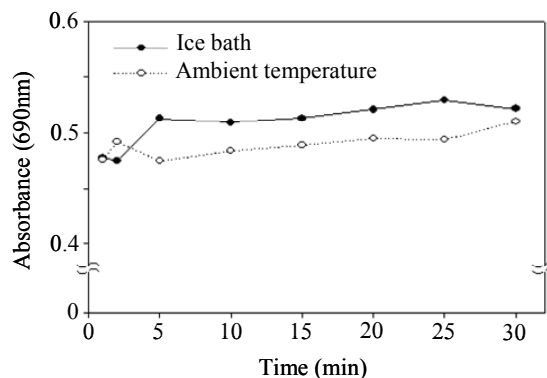


Fig.3: Effects of extraction time
Standard solution: 100 mL; 50 $\mu\text{g-PO}_4 \text{ L}^{-1}$

3.3 検量線

リン酸イオン濃度 0.2～50 $\mu\text{g-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ の標準溶液 100 mL を用いて、Fig. 1 に示した方法で測定した。こ

のとき、10mLのCH₃CNで抽出しており、濃縮率(CF)は10倍である。それぞれの標準溶液について5回測定した平均値を用いて得られた検量線をFig.4に示す。ブランクの相対標準偏差(RSD)は16.95%、また、0.2 μg-PO₄ L⁻¹のRSDは12.08%であったが、濃度範囲が0.4~1.0 μg-PO₄ L⁻¹およびそれ以上におけるRSDはそれぞれ10%以下および2.07%~5.29%であり、安定した測定が可能であった。Fig.4には、オートアナライザー(FIA:BRAN+LUEBBE, AutoAnalyzer 3)で同じ標準溶液を測定した結果も示すが、本法の方が低濃度領域においても直線的な関係が得られている。相関係数およびS/N比=3とした場合の検出限界(LOD)をTable 1に示す。メンブレン抽出法でのLODとして0.3 μg-PO₄ L⁻¹が得られ、オートアナライザーより検出感度が優れていることが示された。

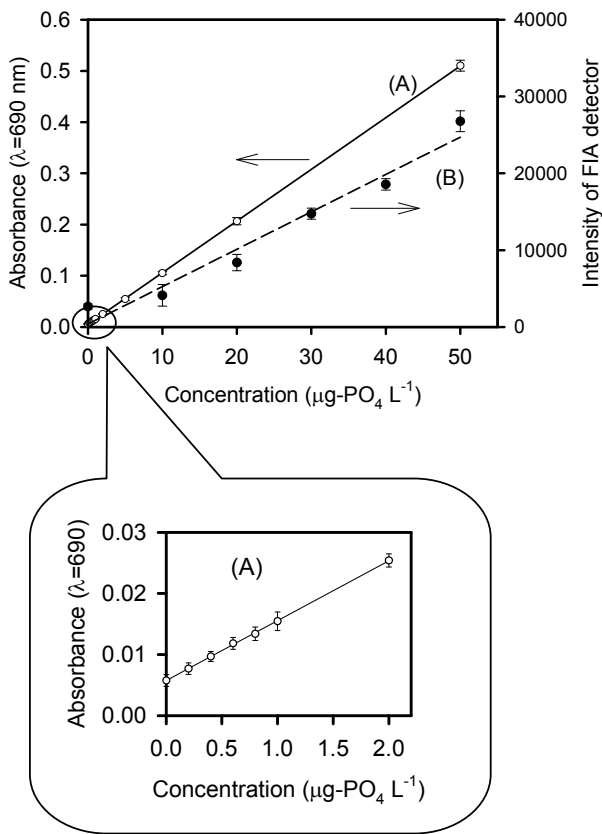


Fig.4: Calibration curves

(A): membrane extraction
(B): FIA

Table 1: Limit of detection (LOD)

method	Conc. range (μg-PO ₄ L ⁻¹)	LOD (μg-PO ₄ L ⁻¹)
Membrane extraction	0.2 -50	0.3
FIA	10 - 50	2.1

3.4 妨害物質

モリブデンブルー法では、ヒ素(As)とケイ素(Si)がリン酸イオンの測定を妨害することが知られているため、メンブレン抽出法に置いても検討を行った。ケイ素の影響については、モリブデン酸混合液の添加量に支配されたが、Fig.1に示す条件では最も妨害が低く、20 mg-Si L⁻¹までは妨害しなかった。

As(V)の妨害を除去する方法として、As(III)への還元法(13)が検討されているが、FIA分析法ではドデシル硫酸(SDS)によるマスキング法が用いられている。最終SDS濃度が0.075%になるようにSDSを標準溶液に添加して測定した場合、Table 2に示すようにマスキング効果が高いことが示された。

Table 2: Disturbance with As(V) and masking effect with SDS

As(□) (μg L ⁻¹)	without SDS Error (%)	with SDS Error (%)
100	+16	-2.6
250	+14.1	+7.0
500	+18.1	+6.0
1000	+138	+15.0

Phosphate: 500 μg-PO₄ L⁻¹

3.5 T-Pの測定

T-Pをペルオキシ硫酸カリウムで分解した後、メンブレン抽出法によって測定した場合の検量線をFig.5に示す。ここでは50 mLの標準溶液を用い、5 mLのCH₃CNで抽出を行い、10 mmのセルで測定した。リン酸イオンの測定も、同じ溶液量とした。T-Pの測定ではblankの吸光度が高いが、直線性の高い検量線が得られ、本法でも低濃度のT-P測定が可能であることが示された。なお、検量線の傾きは20%小さくなったが、分解操作において1.2倍に希釈されたことに対応している。

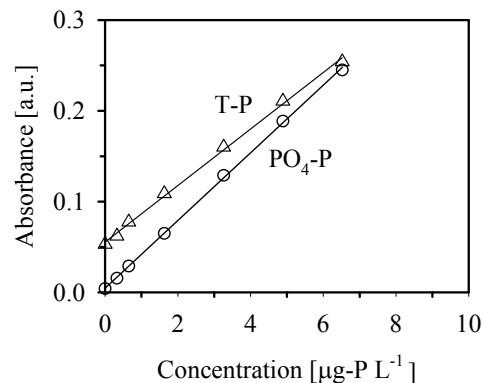


Fig.5: Calibration curves for T-P and PO₄-P

4. おわりに

本研究で示したメンブレン抽出法では、検出限界として $0.3 \mu\text{g-PO}_4 \text{ L}^{-1}$ が得られたが、100 mL の試料を必要としている。試料を 50 mL とすれば、小さなメンブレンフィルターを用いれば 5 mL の CH_3CN で抽出可能であるが、その場合吸光度測定には 10 mm のセルを用いる必要があり、検出感度は低下するものと考えられる。しかしながら、その場合でも本研究の結果からは、オートアナライザーと同程度の検出感度が得られるものと考えられ、今後の検討課題といえる。

[参考文献]

- 1) Q. Zhou, C.E. Gibson and Y. Zhu: Evaluation of phosphorus bioavailability in sediments of three contrasting lakes in China and the UK. *Chemosphere*, Vol.42, pp.221 (2001).
- 2) S.L. Lee, S. Y. Weon, C.W. Lee and B. Koop-man: Removal of nitrogen and phosphate from wastewater by addition of bittern. *Chemosphere*, Vol.51, pp.265 (2003).
- 3) J. Berkowitz, M.A. Anderson and C. Amrhein: Influence of aging on phosphorus sorption to alum floc in lake water. *Water Res.*, Vol.40, pp.911 (2006).
- 4) M. Filella, C. Deville, V. Chanudet, V. and D. Vignati: Variability of the colloidal molybdate reactive phosphorus concentrations in freshwaters, *Water Res.*, Vol.40, pp.3185 (2006).
- 5) K. Kuzawa, J.-Y. Jung, Y. Kiso, T. Yamada, M. Nagai and T.-G. Lee: Phosphate Removal and Recovery with a Synthetic Hydrotalcite as an Adsorbent, *Chemosphere*, Vol.62, pp.45 (2006).
- 6) American Public Health Association (APHA): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. 4500-P F (1992).
- 7) J. Murphy and J.P. Riley: A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, Vol.27, pp.31 (1962).
- 8) S. Motomizu, M. Oshima and A. Hirashima: Spectrophotometric determination of phosphorus in river water based on the reaction of vanado-molybdophosphate with malachite green. *Anal. Chim. Acta*, Vol.211, pp.119-127 (1988).
- 9) Y. Kiso, K. Kuzawa, Y. Saito, T. Yamada, M. Nagai, Y.J. Jung and K.S. Min: A Spot Test for Aqueous Phosphate by Color Band Formation. *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.347, pp.1212 (2002).
- 10) 木曾祥秋, 九澤和充, 佐藤剛志, 西村和之, 笠倉忠夫, 細谷卓也: 着色帯形成によるオルトリンおよび亜硝酸簡易測定法の開発, *環境システム計測制御学会誌 EICA*, Vol.7, No.1, pp.29 (2002)
- 11) M. Yaqoob, A. Nabi and P.J. Worsfold: Determination of nanomolar concentration of phosphate in freshwaters using flow injection with luminal chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, Vol.510, pp.213 (2004).
- 12) S. Taguchi, E. Ito-oka, K. Masuyama, I. Kasahara and K. Goto: Application of organic solvent-soluble membrane filters in the preconcentration and determination of trace elements: spectrophotometric determination of phosphorus as phosphomolybdenum blue. *Talanta*, Vol.32, pp.391 (1985).
- 13) D.L. Tsalev, M. Sperling and B. Welz: Flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometric study of the automated on-line pre-reduction of arsenate, methylarsenate and dimethylarsinate and high-performance liquid chromatographic separation of their L-cysteine complexes. *Talanta*, Vol.51, pp.1059 (2000).