

光酸化反応を用いるヒドロキシルアミンのフローインジェクション分析

小寺孝佳, 大島光子, 本水昌二
岡山大学理学部：〒700 岡山市津島中3-1-1

Flow injection analysis for the determination of hydroxylamine using photo-oxidation reaction

Takayoshi Kodera, Mitsuko Oshima and Shoji Motomizu
Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University,
3-1-1 Tsushimanaka, Okayama 700, Japan

In this paper, we describe a flow injection analysis for the determination of hydroxylamine on the basis of a photo-oxidation reaction and a diazotization / coupling reaction. Hydroxylamine was oxidized to nitrite by irradiation of ultra-violet light using a photo-reactor and detected at 540 nm as the azo dye formed with sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine in the proposed flow system. Photo-oxidation reaction was accelerated when the tubing in the photo-reactor was packed with TiO_2 -adsorbed glass beads. By using this packed column, a calibration graph was rectilinear up to $2 \times 10^{-5} \text{M}$ of hydroxylamine, and the detection limit was $1 \times 10^{-6} \text{M}$. Sampling rate was 20 samples per hour.

1 緒言

ヒドロキシルアミンは、還元剤の一つとして工業的に重要な化学物質である。また、ヒドロキシルアミンは微生物による硝酸イオンの還元反応や¹⁾、アンモニア酸化反応の中間体として生成することが知られており²⁾、生物学的にも興味深い物質であり、湖沼などの天然水中にも存在することが報告されている³⁾。ヒドロキシルアミンの定量に当たっては、一般に他の無機態窒素が共存する場合が多いため、これらとの分別定量が要求される。Korasaら⁴⁾の総説には容量法、電気化学法、吸光光度法があげられているが、ヒドロキシルアミンの存在量は一般に微量であるので、吸光光度法が有利であると報告されている。吸光光度定量法としては、ヒドロキシルアミンを亜硝酸イオンに酸化した後、亜硝酸のジアゾ化-カップリング反応を利用する方法、ヒドロキシルアミンと8-ヒドロキシキノリンとの反応による生成物を直接測定する方法、ニンヒドリンやN-ヒドロキシ尿素との反応生成物を測定する方法などが紹介されている。亜硝酸イオンへの酸化方法では、反応後過剰の酸化剤を取り除く操作が必要であり、簡便な方法とは言えない。試薬と直接反応させる方法も、他の無機態窒素の影響を受ける。DiasらはFe(III)に対する還元反応速度の違いを利用したヒドラジンとの分別定量法を報告しており⁵⁾、Bourkeらはこの反応を用いて $10^{-4} \text{M} \sim 10^{-5} \text{M}$ オーダーのヒドロキシルアミンの吸光検出FIAについて述べている⁶⁾。しかし、この方法は試薬空試験値が高く、低濃度試料の定量は困難である。

Takedaら⁷⁾は硝酸イオンを紫外線照射によって亜硝酸イオンに還元し、海水中の硝酸イオンを定量している。この方法は還元反応にCu-Cdカラムを使用しないため、有害な廃液を発生しないクリーンな方法である。Motomizuら⁸⁾は新しい反応促進剤を用いることによりこの方法を改良し、河川水中の硝酸イオン、亜硝酸イオンの同時定量への応用について報告している。この紫外線照射還元反応を検討中、硝酸イオンから亜硝酸イオンへの還元は平衡反応であり、還元のみならず酸化も同時に生じていることが分かった。そこで、本研究ではヒドロキシルアミンのオンライン酸化-FIAについて検討した。まず、ヒドロキシルアミンを紫外線照射によって亜硝酸イオンに酸化し、生成した亜硝酸イオンをジアゾ化、カップリング反応を利用して吸光光度定量することによりヒドロキシルアミンを定量した。

2 実験

2.1 装置

2.1.1 流路系 ヒドロキシルアミンの定量に用いたFIAの流路系をFig.1に示す。ポンプはサヌキ工業製ダブルプランジャー型ポンプ (DM2M-1024型) を使用し、キャリア液、試薬液共に流量 0.8ml min^{-1} で送液した。流路配管には、紫外線照射装置 (フォトリアクター) の部分を除いて、内径 0.5mm のPTFEチューブを使用した。吸光度の測定には相馬光学製の波長可変可視検出器S-3250を使用し、波長 540nm を用いた。サンプル注入量は $100\mu\text{l}$ とし、ループ付き六方バルブを用いてキャリア流れに導入した。光酸化生成物の生成量を直接測定する場合には、Fig.1の紫外線照射装置の直後に相馬光学製波長可変可視、紫外検出器S-3702を組み込み、波長 220nm で亜硝酸と硝酸の含量を測定した。

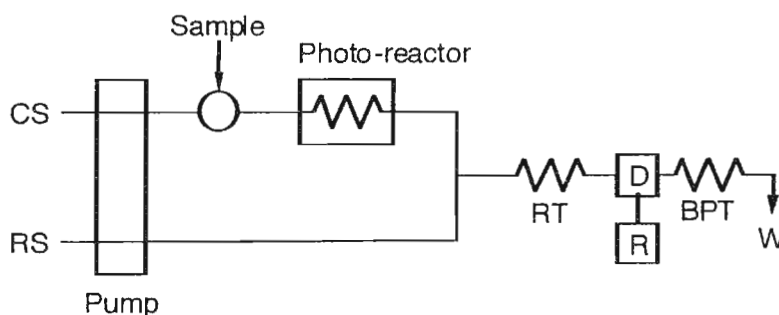


Fig.1 Schematic diagram for the determination of hydroxylamine

CS: 10^{-1}M phosphate buffer solution (pH 8.0); sample: $100\mu\text{l}$; RS: $2 \times 10^{-3}\text{M}$ N-1-naphthylethylenediamine + $2 \times 10^{-3}\text{M}$ sulfanilamide + 0.6M HCl; photo-reactor: Hg lamp + 0.8mm i.d. x 6m PTFE clear tubing; RT: reaction tubing (0.5mm i.d. x 2.5m); BPT: back-pressure tubing: (0.25mm i.d. x 0.85m); D: spectrophotometer ($\lambda=540\text{nm}$); R: recorder; W: waste.

2・1・2 紫外線照射装置 紫外線照射装置には既報⁸⁾と同様の性能を有する相馬光学製S-3900を使用した。照射装置には照射ランプが6本まで取り付けられるが、本研究では系の簡略化のために、ランプは1本または2本を取り付けて使用した。Fig.2に示すように照射ランプ（低圧水銀ランプ，4W）に直接PTFEチューブまたは光酸化カラムを巻き、その外側にアルミ箔を巻いて照射装置とした。ランプに巻く照射コイルとして、中空のPTFEチューブ（内径0.8mm x 6m）と、PTFEチューブの中に酸化触媒を充填した光酸化カラム（内径1.0mm x 1m）を検討した。中空のチューブの場合、効果的な酸化のためには長さが6m必要であり、ランプ1本に巻けなかったため2本に巻いた。光酸化カラムを用いる場合はカラム長が1mと短いので1本のランプに巻きつけることができたので、ランプはこの1本のみを用い、周りにアルミ箔を巻いて照射装置に取り付け、検討を行った。

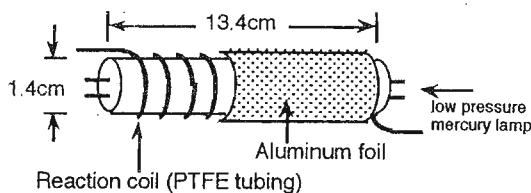


Fig.2 Photo-reactor using low pressure mercury lamp

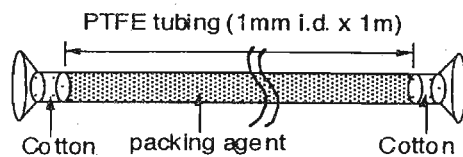


Fig.3 Photo-oxidation column
Packing material: silica gel, glass beads or TiO_2 -adsorbed glass beads.

2・2 光酸化カラム

今回使用した光酸化カラムは、次の手順で作製した。まず、内径1.0mm、長さ1mのPTFEチューブの一端に綿を詰め内部に蒸留水を満たす。充填剤をパスツールピペットを用いて流し込み、次にプランジャーポンプで蒸留水を流し均一に詰め込んだ。この作業を繰り返して光酸化カラムを作製した。Fig.3に本研究において使用した光酸化カラムを示す。プランジャーポンプで詰めるとき蒸留水を流すことで、カラム内に残留しているチタニア (TiO_2) の洗浄も行うことができる。

2・3 試薬

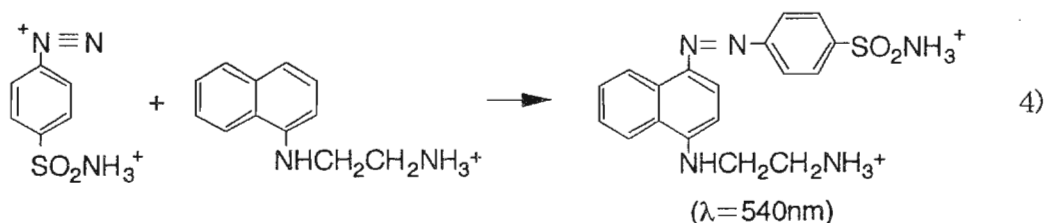
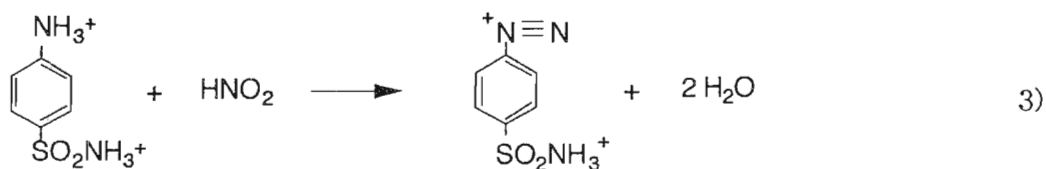
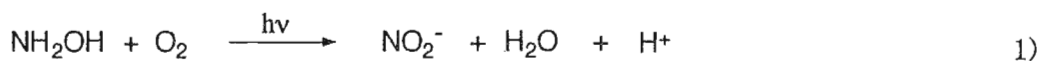
キャリアー液に使用したリン酸緩衝液はリン酸二水素カリウム（和光純薬，特級）17gを水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液を添加してpH8.0とし、全量250ml (0.5M)にしたものを調製し、貯蔵液とした。この溶液を5倍に希釈してキャリアー液 (10^{-1}M)として使用した。また、試薬液はスルファニルアミド（和光純薬，特級）1.3gを塩酸 (3M)に溶かし、N-1-ナフチルエチレンジアミン（東京化成，特級）0.15gを蒸留水に溶かしたものと混合した後、蒸留水で全量250mlとした。試薬液中では、スルファニルアミド、N-1-ナフチルエチレンジアミン、塩酸の濃度はそれぞれ $2 \times 10^{-3}\text{M}$ 、 $2 \times 10^{-3}\text{M}$ 、0.6Mである。この試薬溶液は用時調製した。標準溶液は、亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、ヒ

ドロキシルアミン塩酸塩（和光純薬，特級）を用いて調製し，貯蔵液の濃度は亜硝酸イオン，硝酸イオンの場合にはそれぞれ $10^{-3}M$ ，ヒドロキシルアミンの場合には $10^{-1}M$ とした．溶液調製にはすべて蒸留水を使用した．光酸化カラムの充填剤としては，カラムクロマトグラフィー用の70～230メッシュのシリカゲル，粒径0.2mmのガラスビーズ及びチタニア吸着ガラスビーズを用いた．チタニアとしては石原産業製STS-01（X線粒径7nmのアナターズ型 TiO_2 を30%含むゾル溶液）を使用した．

3 結果及び考察

3・1 反応

紫外線照射によってヒドロキシルアミンは次式(1)，(2)に示すように，まず亜硝酸イオンに酸化され，さらに硝酸イオンにまで酸化されるものと考えられる．生じた亜硝酸イオンは酸性条件下で式(3)に従いスルファニルアミドをジアゾ化し，つぎに式(4)のようにN-



1-ナフチルエチレンジアミンとカップリングされる⁹⁾．生成したアゾ染料の極大吸収波長は540nmにあり，測定にはこの波長を用いた．なお，以下の実験において，ヒドロキシルアミンから亜硝酸への酸化の割合は，変換率で表した．変換率は，あらかじめ紫外線照射をしないで求めた亜硝酸塩溶液のピーク高に対して，紫外線照射によって得られた同濃度のヒドロキシルアミン溶液のピーク高の割合(%)で示した．

3・2 キャリヤー溶液の検討

PTFEチューブを酸化反应用コイルとする系を用いてキャリヤー液として以前効果のみられたリン酸緩衝液を用い⁸⁾，pHの検討をした．pH7から10まで変化させたところpHが

高くなるにつれて変換率は25%から54%まで直線的に増加した。しかし、pHが高くなるにつれて緩衝能が小さくなりpHの調整が難しくなった。また、反応の促進、測定の迅速化のために用いる光酸化カラムの充填剤はアルカリ性領域で不安定であるので、pHは8とされた。

キヤリヤー液のpH緩衝液の濃度について、 10^{-3} Mから 0.5 Mまで変化させて検討した。その結果、濃度が濃くなるにつれて変換率は上昇し、 10^{-3} Mで18%、 0.1 Mで35%であった。これは、緩衝能が大きくなっていくためと思われる。0.1Mから0.5M付近ではほぼ変換率は頭打ちとなり、0.5Mの場合に変換率は37%となったが、ポンプのフラッシュ部分にpH緩衝液の結晶が析出しやすくなり、流量の安定性が悪くなった。従って、緩衝液の濃度は0.1Mとした。また、キヤリヤー溶液に用いる緩衝液の種類についても検討した。

pH8.0で検討した結果をFig.4に示す。これらの緩衝液の中には低濃度で比較的高い変換率を示すもの(CyDTA, EDTA)もみられる。しかし、高濃度のpH緩衝液の方が高い変換率を示したため、キヤリヤー液にはpH緩衝液を用いた。

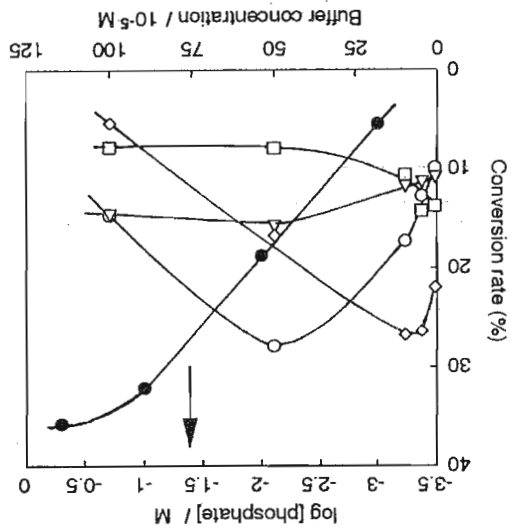


Fig.4 Effect of buffer components in the carrier solution on conversion rate
 □ Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid; ◇ Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EDTA); △ N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; ○ trans-1,2-Cyclohexanediamine-N,N,N',N'-tetra-acetic acid (CyDTA); ● phosphate; pH : 8.0; Sample: 5×10^{-5} M NH_2OH , 5×10^{-5} M NO_2^- .

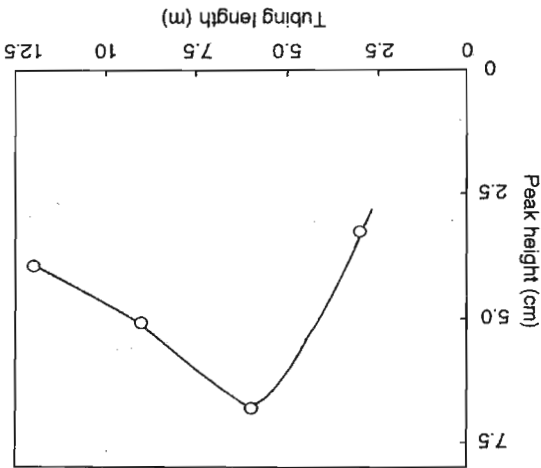


Fig.5 Effect of tubing length in photo-reactor on peak height
 Sample : 5×10^{-5} M NH_2OH
 CS: 10^{-1} M phosphate buffer (pH 8.0).
 Photo-reactor: 0.8mm i.d x 6m PTFE clear tubing

3・3 紫外線照射用チューブ長の検討

紫外線照射用コイルとして、PTFEチューブ（内径0.8mm、外径1.58mm）を用いて3mから12mまでコイル長を検討した結果をFig.5に示す。一本の水銀ランプには約3mのコイルを巻くことができる。2本のランプを用い、6mを用いた時にピーク高は最大となった。3mの場合には、照射時間が短く酸化反応が十分に進んでいないため、また、6mを超えると生成した亜硝酸イオンがランプで発生する熱のためにさらに酸化されて硝酸イオンになってしまうため、ピークが小さくなったと思われる。また、分散によるピークの低下も影響している。これらの結果より、以後の実験の反応チューブ長は6mとした。

3・4 光酸化カラムの検討

紫外線照射コイルとして中空のPTFEチューブを使用した場合には、試料注入後、ピーク出現までに約6分間必要であり、あまり迅速な方法とはいえず、またピークもブロードであった。そこで測定の迅速化と変換率向上のため光触媒作用をもつ充填剤を詰めた光酸化カラムについて検討した。これにより流路を短縮することができ、分散の低下による高感度化が図れる。光酸化カラムの充填剤としては、シリカゲル、ガラスビーズ、チタニアを吸着させたガラスビーズを用いて検討した。Fig.6にカラムを用いて得られたヒドロキシルアミンのシグナル例を示す。シリカゲル、チタニアを吸着したガラスビーズを充填した場合にはシャープなピークが得られたが、ガラスビーズのみを用いたときにはほとんどピークが得られなかった。ガラスビーズにチタニアを吸着させると高いピークが得られたことより、チタニアには光酸化反応の触媒効果があることが分かる。また、シリカゲルを用いた場合にもチタニアを吸着させたガラス

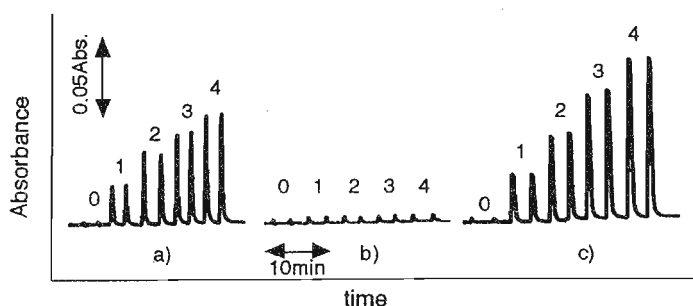


Fig.6 Effect of packing materials in the photo-oxidation column

Packing materials: a) TiO_2 -adsorbed glass beads; b) glass beads; c) silica gel; Sample: (0~4) $\times 10^{-5}\text{M}$ hydroxylamine.

ビーズとほぼ同じ照射時間でピークが得られたので、シリカゲルにも同様の触媒効果があると思われる。シリカゲルを使用したときが、一番良好な結果が得られたが、これを充填剤に用いた場合、シリカゲルが徐々に溶けだし、充填剤がカラム先端部に詰まっていき、チューブに高圧がかかりすぎて破裂してしまうという問題があった。そこで、光酸化カラムには、チタニアを吸着させたガラスビーズを使用することにした。このカラムを用いた場合、Fig.7に示すように硝酸イオンやヒドラジンはほとんど反応せず、ヒドロキシルア

ミンを選択的に酸化することが分かった。特に硝酸イオンについては、中空チューブの場合には変換率で約6.3%のピークが現れ、妨害となったが、光酸化カラムを用いれば影響がないことが

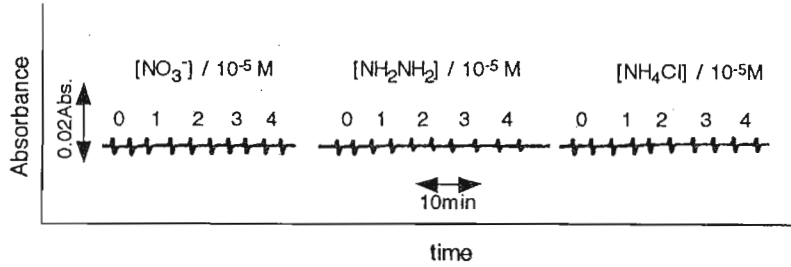


Fig.7 Effect of TiO_2 -adsorbed glass beads column on the oxidation of other nitrogen compounds

分かった。これらの光酸化カラムを使用した場合、流路の短縮によって試料の分散が抑えられ、ピークがシャープになった。また、試料注入後3分で測定が可能となった。また、連続して使用すると少なくとも一日間は再現性のある結果が得られたが、数日間使用すると変換率は徐々に低下していった。本研究では念のため、一日ごとに充填剤を交換した。

チタニアを吸着させたガラスビーズを使用する場合、チタニアを吸着させる条件によって変換率にばらつきが生じることが分かった。そこでガラスビーズに吸着させるときに用いるチタニア溶液の濃度について検討した。Fig.8にその結果を示す。チタニアの濃度が0.03%の場合、ピークの頭打ちは低濃度域で起こった。これは、ガラスビーズ表面にコーティングされるチタニア量が不十分であるために光酸化反応の効率が悪いからであると思われる。これより吸着させるときのチタニア溶液の濃度は0.3%以上とした。

3・5 光照射生成物の確認

ヒドロキシルアミンの光酸化反応によって生成する化合物は、亜硝酸イオンであると思われるが、ランプの熱によって亜硝酸イオンがさらに硝酸イオンに酸化され、生成物は亜硝酸イオンと硝酸イオンの平衡混合物になっていると思われる。波長220nmでは、亜硝酸イオンと硝酸イオンはほぼ同じモル吸光係数を示し、キャリアー液の吸収はほとんど見られない。そこで紫外線照射装置通過後に紫外分光光度計を組み込み、生成した硝酸イオン・亜硝酸イオンの含量を波長220nmで測定した。また波長540nmで検出されるピーク

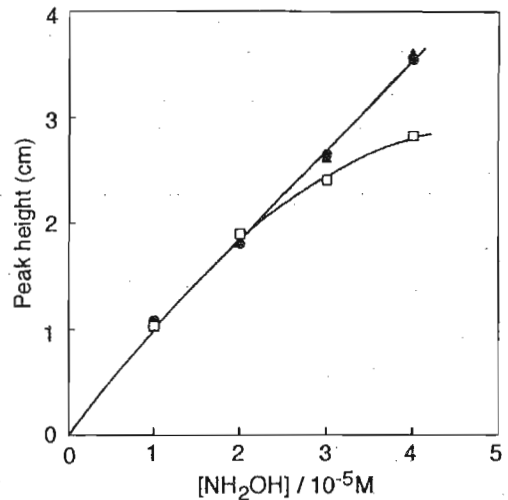


Fig.8 Effect of TiO_2 concentration
 TiO_2 (%): ● 3.0; ▲ 0.3; □ 0.03.
 TiO_2 stock solution (30% sol) was diluted with distilled water.

は、亜硝酸イオンのみに相当するものである。従って、このふたつのピーク高さより、光照射反応によってヒドロキシルアミンが酸化されてできる亜硝酸イオンと硝酸イオンのそれぞれの生成濃度を決定できる。Fig.9に、 $(0\sim4)\times 10^{-5}\text{M}$ のヒドロキシルアミン溶液を用い、紫外線照射反応により生じた亜硝酸イオンと硝酸イオンの生成濃度について調べた結果を示す。中空のPTFEチューブを用いた場合、特に硝酸イオンの生成割合が高いことが

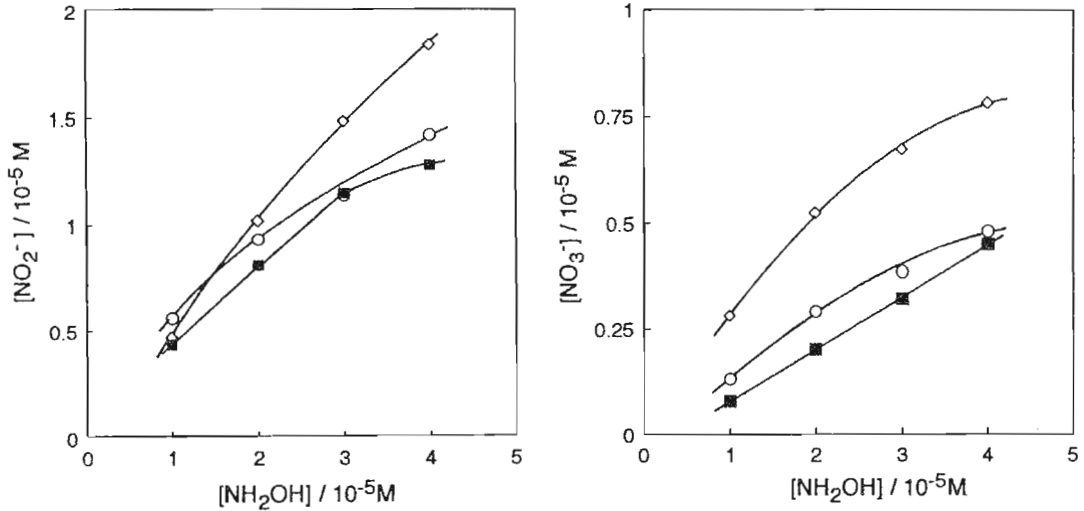


Fig.9 Yield of nitrate obtained by photo-oxidation of hydroxylamine
Packing materials: ■ TiO_2 -adsorbed glass beads; ○ silica gel; ◇ none.

分かる。これは亜硝酸、硝酸イオンの間で起こる酸化還元反応が平衡反応であり、また、硝酸イオンの方がより安定な化学種であるので、1mの光酸化カラムよりも6mの中空PTFEチューブの方が紫外線照射時間が長く、このため硝酸イオンが多く生成したものであると思われる。また、ランプからの熱によっても生成した亜硝酸イオンがさらに硝酸イオンに酸化されるものと思われる。シリカゲル、あるいはチタニアを吸着させたガラスビーズを充填したカラムの場合、中空のチューブに比べて照射時間が短い時間であるにもかかわらず、良好な変換率を示している。これらから充填剤に使用した物質に触媒作用のあることが分かる。以上の結果より、本法での反応は(3・1)に示したように、ヒドロキシルアミンはまず亜硝酸イオンに酸化され、さらにその一部が硝酸イオンに酸化される経路で進行すると思われる。また、中空のPTFEチューブの方が生じる亜硝酸イオン濃度が大きい、チューブ長が長いこと分散度が大きく、得られるピークはブロードとなる。

3・6 検量線の作成

Fig.10に 10^{-6}M オーダーの検量線のフローシグナルの例を示す。また、検量線の直線範囲は $(0\sim2)\times 10^{-5}\text{M}$ であった。この系の定量下限は $1\times 10^{-6}\text{M}$ であり、1時間で20試料の測定が可能であった。

以上、紫外線照射反応によるヒドロキシルアミンの高感度定量法について述べた。TiO₂をコーティングしたガラスビーズを充填剤とする光酸化カラムを用いることにより紫外線照射による酸化反応を促進することができ、分析の迅速化が可能となった。しかし、長時間の連続測定でガラスビーズ表面からTiO₂のコーティングがはがれ、カラムの性能が低下し易い。今後、より安定したコーティング法の検討により、本法の有用性が期待できる。

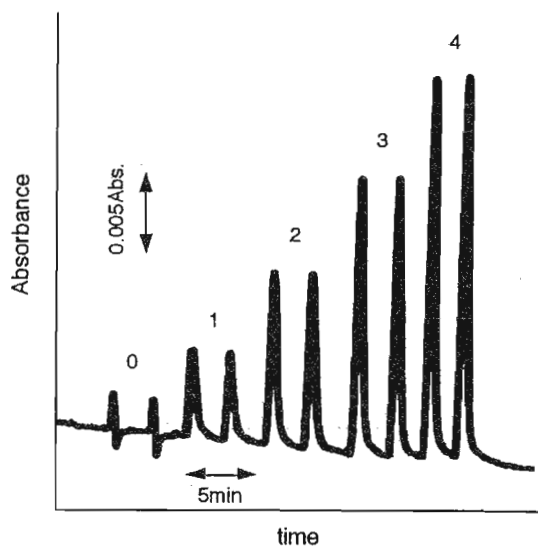


Fig.10 Flow signals for calibration graph
Hydroxylamine: (0~4) $\times 10^{-6}$ M.

参考文献

- 1) A.I. Virtanen and T.Z. Csaky: *Nature*, 161, 814 (1948).
- 2) D. Lewis: *Biochim J.*, 49, 149 (1951).
- 3) M. Tanaka: *Nature*, 171, 1141 (1953).
- 4) T. Kolasa and W. Wardencki: *Talanta*, 21, 845 (1974).
- 5) F. Dias, A.S. Olojola and B. Jaselskis: *Talanta*, 26, 47 (1979).
- 6) G.C.M. Bourke, G. Stedman and A.P. Wade: *Anal. Chim. Acta*, 153, 277 (1983).
- 7) K. Takeda and K. Fujiwara: *Anal. Chim. Acta*, 276, 25 (1993).
- 8) S. Motomizu and M. Sanada: *Anal. Chim. Acta*, 308, 406 (1995).
- 9) Y. Kobayashi: *Anal. Chem.*, 38, 917 (1966).

(Received May 16, 1996)

(Accepted May 27, 1996)