

流れ分析法の規格化の現状

横浜国立大学 中村 栄子

1. 流れ分析法の JIS 化の経緯

流れ分析に関する JIS としては、1989 年に JIS K 0126 「フローインジェクション分析通則」が制定され、2001 年の改正を経て 2009 年に連続流れ分析を含めたものに改正された現行の JIS K 0126 「流れ分析通則」(2009)¹⁾がある。この JIS では、フローインジェクション分析法(以下、FIA と記す)及び連続流れ分析法(以下、CFA と記す)における用語の定義、装置、操作、定量法及びデータの質の管理などが規格されている。一方、環境分析の現場においては、FIA や CFA が種々の分析対象成分の測定に実際に用いられ、これらの JIS 化の要望が強い。これに対して現在、個別の分析対象成分に対する流れ分析法の JIS 化が以下のような経緯で進められている。

2007 年 10 月に日本環境測定分析協会(社)に自動吸光光度法標準化検討委員会が設置され、流れ分析法による水質試験方法の素案作成が検討された。その後、当協会が日本規格協会の JIS 原案作成公募に応募し、この規格原案作成の委託を受け、2009 年 1 月に原案作成委員会(宮崎 章委員長)が設置された。委員会は流れ分析による 9 項目の定量法の原案を検討、作成し、これを 2009 年 10 月に日本規格協会に提出し、現在、規格協会での審議が終了している。これらの原案は、この後、日本工業標準調査会の審査を経て、JIS 規格として公表される。

2. 個別の分析対象成分の流れ分析法の JIS 化にあたっての原則

(1) 取り上げる項目について

JIS K 0102 「工場排水試験方法」(2008)²⁾での測定項目のうち、発色反応に基づく吸光光度法が用いられているアンモニア体窒素、亜硝酸体窒素及び硝酸体窒素、全窒素、りん酸イオン及び全りん、フェノール類、ふっ素化合物、クロム(VI)、陰イオン界面活性剤、全シアン及びシアン化物の 9 項目についての原案を作成する。

(2) JIS 規格の体裁

9 項目の JIS 番号は、JIS K ○○○○とし、その後に 1~9 の枝番号を入れ、これらが JIS K 0102 へも引用できるようにする。

(3) 原案作成の基本方針

原案は以下の基本方針に基づいて作成する。

- ① FIA と CFA の両方を併記する。
- ② 分析原理、試薬、条件などが JIS K 0102 の条件であることが望ましい。
- ③ 分析原理、試薬、条件などが JIS K 0102 と異なる ISO 規格の流れ分析法も取り上げる。
- ④ JIS や ISO の規格がなく、環境分析での現場で多用されている流れ分析法も取り上げる。

3. 9 項目の原案

9 項目に関して作成された原案のタイトル、その概要及び JIS K 0102 「工場排水試験方法」(2008)(以下、JIS と記す)との相違点などをそれぞれ以下に示す。また、原案では全ての項目で「懸濁物の多い試料には適用しない。」ことが記されている。

(1) アンモニア体窒素

試料の前処理に関しては、「試料は前処理(蒸留法)してアンモニウムイオンを共存物から分離した後、適用する。ただし、妨害物質を含まない試料は蒸留操作を省略してもよい。」とされている。

流れ分析の方法として①~④の原案が作成されている。

- ① ガス拡散・pH 指示薬変色 FIA 法：定量範囲 N：0.1~10 mg/L
- ② フェノール試薬によるインドフェノール青発色 FIA 法：定量範囲 N：0.05~10 mg/L
- ③ サリチル酸試薬によるインドフェノール青発色 CFA 法：定量範囲 N：0.05~10 mg/L
- ④ フェノール試薬によるインドフェノール青発色 CFA 法：定量範囲 N：0.05~10 mg/L

①は ISO 11732³⁾に規格化されている方法と同じであり、次のような測定原理による。細管中を連続して流れているキャリアー液(水)に試料を注入し、この流れとアルカリ反応溶液(pH13、EDTA、ほう酸を含む)との流れを混合して、試料中のアンモニウムイオンをアンモニアとし、これをガス透過膜によって分離して pH 指示薬(ブロモクレゾールパープル、ブロモチモールブルー、クレゾールレッドの混合指示薬)を含む吸収液の流れに吸収させる。このときの吸収液の pH 変化によって生じる指示薬の色調の変化を 580 nm 付近の吸光度として測定する。

②及び④はフェノール試薬によるインドフェノール青の発色に基づいており、その原理は、JIS の 42.2 のインドフェノール青吸光光度法のそれと同じである。②では細管中のキャリアー液(水)の流れに試料を注入し、これにフェノール・ペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム溶液及び次亜塩素酸ナトリウム溶液の流れを混合させて反応させる。反応によって生成する青い色の化合物の 660 nm 付近の吸光度を測定する。④では細管中の試料の流れに、空気で分節したシクロヘキサンジアミン四酢酸-ペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウム混合溶液、フェノール溶液、次亜塩素酸ナトリウム溶液の流れを順次混合させて、生成する青い色の化合物の 630 nm 付近の吸光度を測定する。

③は ISO 11732³⁾に規格化されている方法と同じであり、②や④の発色試薬であるフェノールの代わりにサリチル酸ナトリウムを、次亜塩素酸ナトリウムの代わりにジクロロイソシアヌル酸を用いる。これらの試薬によるインドフェノール青発色の原理は、JIS の付属書 1(参考)の X のそれと同じである²⁾。

(2) 亜硝酸体窒素及び硝酸体窒素

(2)の 1 亜硝酸体窒素

次の①～④の原案が作成されている。いずれも定量範囲は N : 0.01～1 mg/L である。

- ①りん酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 FIA 法
- ②塩酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 FIA 法
- ③りん酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 CFA 法
- ④塩酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 CFA 法

塩酸酸性あるいはりん酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色の原理は、JIS の 43.1.1 のナフチルエチレンジアミン吸光光度法と同じである。①、②では、細管中のキャリアー液(水)の流れに試料を注入し、これとスルファニルアミド及び N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩を含む発色試薬溶液の流れとを混合させて生成する赤い色のアゾ化合物の 540 nm 付近の吸光度を測定する。③、④では細管中の試料の流れに、空気で分節した緩衝液、スルファニルアミド溶液、N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩溶液を混合し、①、②と同様にアゾ色素を生成させる。①及び③は ISO 13395⁴⁾に規格化されている方法と同じである。

(2)の 2 硝酸体窒素

次の①～④の原案が作成されている。いずれも定量範囲は N : 0.02～20 mg/L である。

- ①カドミウム還元・りん酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 FIA 法
- ②カドミウム還元・塩酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 FIA 法
- ③カドミウム還元・りん酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 CFA 法
- ④カドミウム還元・塩酸酸性ナフチルエチレンジアミン発色 CFA 法

カドミウムカラムを用いて硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する方法の原理は、JIS の 43.2.3 の銅・カドミウムカラム還元-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法と同じである。また、①及び③は ISO 13395⁴⁾に規格化されている方法と同じである。

①及び②では、細管中のキャリアー溶液の流れに試料を注入し、カドミウムを充てんした還元カラムを通過させ、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する。キャリアー溶液として①ではイミダゾール緩衝液(pH7.5)あるいはアンモニウム塩緩衝液(pH7.5)が、②ではアンモニウム塩緩衝液(pH8.0～8.5)が用いられている。③及び④では、細管中の試料の流れに、空気で分節した緩衝液を混合して、還元カラムを通過させ、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する。還元カラムを通過した溶液中の亜硝酸イオンは、(2)の 1 の方法と同様にしてアゾ色素とし、その 540 nm 付近の吸光度を測定して試料中の硝酸イオン及び亜硝酸イオンの含量を定量する。別に求めた亜硝酸イオンの濃度を差し引いて、硝酸体窒素の濃度を計算に

よって求める。

(3) 全窒素

次の①～④の原案が作成されている。

①ペルオキシ二硫酸カリウム分解・紫外検出 FIA 法：定量範囲 N：1～20 mg/L

②ペルオキシ二硫酸カリウム分解・カドミウム還元吸光光度 FIA 法：定量範囲 N：0.1～2.0 mg/L

③ペルオキシ二硫酸カリウム分解・紫外検出 CFA 法：定量範囲 N：1～20 mg/L

④ペルオキシ二硫酸カリウム分解・カドミウム還元吸光光度 CFA 法：定量範囲 N：0.1～2.0 mg/L

①では、細管中のキャリア液(水)の流れに試料を注入し、アルカリ性ペルオキシ二硫酸カリウム溶液の流れと混合した後、加熱して(145℃)試料中の窒素化合物を酸化分解し、硝酸イオンとする。酸化分解後の流れに塩酸の流れを混合して pH を調整した後、波長 220 nm 付近の吸光度を測定し、全窒素を定量する。②では、①と同様に酸化分解した後、カドミウム還元カラムを通過させ、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する。カドミウム還元カラムを通過した溶液中の亜硝酸イオンは、(2)の 1 の方法と同様にしてアゾ色素とし、その 540 nm 付近の吸光度を測定し全窒素を定量する。③及び④では、細管中の試料の流れに、空気で分節したアルカリ性ペルオキシ二硫酸カリウム溶液の流れを混合した後、③は①と、④は②と同様な原理で全窒素を定量する。①及び③の原理は JIS の 45.2 の紫外吸光光度法と②及び④は JIS の 45.4 の銅・カドミウムカラム還元法と同じであり、これらの方法について ISO では、現在、規格化されていない。

(4) リン酸イオン及び全りん

(4)の 1 リン酸イオン

次の①～③の原案が作成されている。いずれも定量範囲は P：0.01～1 mg/L である。

①モリブデン青発色 3 流路 FIA 法

②モリブデン青発色 2 流路 FIA 法

③モリブデン青発色 CFA 法：定量範囲

①～③の発色原理は、JIS の 46.1.1 のモリブデン青吸光光度法と同じで、細管中の試料を含むキャリア液(水)あるいは試料の流れにタルトラトアンチモン(III)酸カリウムを含む硫酸酸性-モリブデン酸アンモニウム溶液とアスコルビン酸溶液の流れとを混合して生成するモリブデン青の 880 nm 付近の吸光度を測定する。

(4)の 2 全りん

次の①～④の原案が作成されている。いずれも定量範囲は P：0.1～10 mg/L である。

①UV 照射酸化分解前処理モリブデン青発色 FIA 法

②酸化分解前処理モリブデン青発色 FIA 法

③UV 照射酸化分解前処理モリブデン青発色 CFA 法

④酸化分解前処理モリブデン青発色 CFA 法

①～④では、試料にペルオキシ二硫酸塩を加えて UV 照射あるいは加熱して、試料中のポリりん酸及び有機りんを加水分解又は酸化してりん酸イオンとした後、(4)の 1 と同様にしてモリブデン青を生成させ、吸光度を測定し、全りんを定量する。①及び③は ISO15681-1⁵⁾及び 15681-2⁶⁾の規格と同じであり、硫酸酸性のペルオキシ二硫酸塩を加えて UV 照射してりん化合物を酸化分解している。一方、②及び④は JIS の 46.3.1 のペルオキシ二硫酸カリウム分解法と同様に中性のペルオキシ二硫酸塩を加えて加熱酸化分解している。両者でのりん化合物の分解率の比較データが必要と思われる。

(5) フェノール類

次の①～③の原案が作成されている。いずれも定量範囲は C₆H₅OH：0.01～1 mg/L である。

①りん酸蒸留・4-アミノアンチピリン発色 FIA 法

②りん酸蒸留・4-アミノアンチピリン発色 CFA 法

③くえん酸蒸留・4-アミノアンチピリン発色 CFA 法

細管中を流れている試料と蒸留用試薬溶液の流れとを混合し、流れの中で蒸留を行い、留出したフェ

ノール化合物を含む留分の流れと、4-アミノアンチピリン溶液、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液の流れとを混合して、生成するアミノアンチピリン色素の 510 nm 付近の吸光度を測定する。りん酸蒸留・4-アミノアンチピリン発色法の原理は、JIS の 28.1.1 の前処理(蒸留法)及び 28.1.2 の 4-アミノアンチピリン吸光度法と同じである。②は ISO 14402⁷⁾に規格化されている方法と同じである。③のくえん酸蒸留・4-アミノアンチピリン発色法は、国内でも用いられていることや JIS の 28.1.1 と 28.1.2 での結果と整合性があることから原案に採用された。

(6) ふっ素化合物

次の①、②の原案が作成されている。いずれも定量範囲は F^- : 0.08~10 mg/L である。

①ランタン-アリザリンコンプレキソン発色 FIA 法

②蒸留・ランタン-アリザリンコンプレキソン発色 CFA 法

①では細管中を流れているキャリアー液(水)中に、手分析等で蒸留前処理した試料を注入し、この流れとランタン-アリザリンコンプレキソン溶液の流れとを混合し、反応によって生成する青色の化合物の 620 nm 付近の吸光度を測定してふっ素化合物を定量する。②では細管中の試料の流れに、空気で分節した蒸留試薬溶液の流れを混合して蒸留し、蒸留した留分の流れとランタン-アリザリンコンプレキソン溶液の流れとを混合して①と同様に青色の化合物を生成して測定する。ランタン-アリザリンコンプレキソンを用いる発色の原理は JIS の 34.1 のランタン-アリザリンコンプレキソン吸光度法と同じであるが、②での蒸留が単純蒸留なのに対して JIS の 34.1 では水蒸気蒸留が規格されている。両者の蒸留でのふっ素化合物の留出データの比較検証が必要と思われる。また、ふっ素化合物の流れ分析法は ISO の規格にない。

(7) クロム(VI)

次の①~③の原案が作成されている。いずれも定量範囲は $Cr(VI)$: 5 μ g/L~5 mg/L である。

①ジフェニルカルバジド発色 3 流路 FIA 法

②ジフェニルカルバジド発色 2 流路 FIA 法

③ジフェニルカルバジド発色 CFA 法

細管を流れている試料に 1,5-ジフェニルカルバジド溶液を混合し、反応させて生成する赤紫の錯体の 540 nm 付近の吸光度を測定する。発色反応の原理は JIS の 65.2.1 のジフェニルカルバジド吸光度法と同じである。また、①及び③は ISO 23913⁸⁾に規格化されている方法と同じである。

(8) 陰イオン界面活性剤

次の①~③の原案が作成されている。いずれも定量範囲は $NaO_3SO(CH_2)_{11}CH_3$: 0.02~5 mg/L である。

①1,2-ジクロロエタン抽出 FIA 法

②非分節型クロロホルム抽出 CFA 法

③クロロホルム抽出 CFA 法

①では細管中キャリアー液(水)の流れに試料を注入し、この流れとメチレンブルー溶液とを混合し、生成する陰イオン界面活性剤とメチレンブルーとのイオン対を 1,2-ジクロロエタンに抽出する。相分離器で 1,2-ジクロロエタン相を分離した後 650 nm 付近の吸光度を測定する。②では細管中の試料の流れにアルカリ性のメチレンブルー溶液を混合し、生成する陰イオン界面活性剤とメチレンブルーとのイオン対をクロロホルムに抽出する。このクロロホルム相を相分離器で分離した後、酸性のメチレンブルー溶液で洗浄し、再び相分離器でクロロホルム相を分離し、650 nm 付近の吸光度を測定する。③では試料の流れを空気で分節して②と同様に定量する。

①~③のいずれにおいても陰イオン界面活性剤とメチレンブルーとのイオン対を溶媒抽出する方法であり、その原理は JIS の 30.1.1 のメチレンブルー吸光度法と同じである。しかし、①では、イオン対抽出後の酸洗浄がないため、硝酸イオン、シアン化物イオン、チオシアン酸イオンなどメチレンブルーとイオン対を生成する共存物が多い試料への適用は困難と思われる。また、②は ISO 16265⁹⁾で規格化されている方法と同じである。

(9) 全シアン及びシアン化物

この規格原案では、全シアンを紫外線照射・蒸留(pH3.8)又は加熱蒸留(pH2.0 以下)によってシアン化合物イオンとなるもの、シアン化合物をシアン化合物イオン及び pH3.8 又は pH5.5 の酢酸亜鉛存在下での加熱蒸留、pH3.8 のガス拡散、pH5.0 の通気法によってシアン化合物イオンとなるものと定義している。

(9)の1 全シアン

次の①、②の原案が作成されている。いずれも定量範囲は CN^- : 0.01~1 mg/L である。

①紫外線照射・蒸留(pH 3.8)-4-ピリジンカルボン酸・ジメチルバルビツール酸発色 CFA 法

②加熱・蒸留(pH 2 以下)-4-ピリジンカルボン酸・ピラゾロン発色 CFA 法

①は ISO 14403¹⁰⁾で規格化されている方法と同じであり、試料の流れに、空気中で分節した pH3.8 のくえん酸緩衝液を混合し、流れの中で紫外線照射・蒸留する。得られた留出分の流れを空気中で再度分節し、これに pH5.2 のフタル酸塩緩衝液、クロラミン T 溶液、4-ピリジンカルボン酸-ジメチルバルビツール酸溶液を混合して生成する青い色の化合物の 600~640 nm の吸光度を測定し、全シアンを定量する。②では試料の流れに、空気中で分節した pH2 のりん酸塩溶液を混合し、流れの中で加熱蒸留する。以下、①と同様にして定量するが、緩衝液に pH7.2 のりん酸塩緩衝液、発色溶液に 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液を用いる。②の蒸留条件は JIS の 38.1.2 の全シアン(pH2 以下で発生するシアン化水素)と同じであるが、①の蒸留条件とは異なる。環境基本法や水質汚濁防止法での全シアンの定義は pH2 のりん酸酸性下での蒸留により留出するシアン化合物になっており、蒸留の条件の違いにより、分解・留出するシアン化合物に相違があるかの検討が必要と考える。また、①と②で異なる発色溶液を用いているが、生成する青い色の化合物の吸光度に大きな違いは見られない。なお、①の発色溶液は ISO 14403¹⁰⁾、②のそれは JIS の 38.3 の 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法と同じである。

(9)の2 シアン化合物イオン

次の①~④の原案が作成されている。いずれも定量範囲は CN^- : 0.01~1 mg/L である。

①4-ピリジンカルボン酸・ピラゾロン発色 FIA 法

②蒸留(pH 3.8)-4-ピリジンカルボン酸・ジメチルバルビツール酸発色 CFA 法

③ガス拡散(pH 3.8)-4-ピリジンカルボン酸ジメチルバルビツール酸発色 CFA 法

④4-ピリジンカルボン酸・ピラゾロン発色 CFA 法

①及び④では JIS の 38.1.1.1 の通気法(pH5.0 で発生するシアン化水素)又は 38.1.1.2 の加熱蒸留法(pH5.5 の酢酸亜鉛存在下で発生するシアン化水素)で前処理した試料に適用する。①では細管中を流れているキャリアー溶液(りん酸塩緩衝液)に前処理した試料を注入し、この流れとクロラミン T 溶液とを流れの中で混合し、シアン化水素を塩化シアンとする。これと 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液とを混合させて生成する青い色の化合物の 600~640 nm 付近の吸光度を測定する。④では空気中で分節した pH7.2 のりん酸塩緩衝液の流れと前処理した試料の流れとを混合し、以下①と同様にして定量する。②では試料の流れに空気中で分節した pH3.8 のくえん酸緩衝液、酢酸亜鉛溶液を混合し、流れの中で加熱蒸留する。ただし、9 の(1)の①とは異なり、蒸留時の紫外線照射は行わない。以下 (9)の1 の①と同様に定量する。③では空気中で分節した試料の流れに pH3.8 のくえん酸緩衝液を混合し、発生するシアン化水素をガス拡散膜により分離し、水酸化ナトリウム吸収液中に捕集する。吸収液を空気中で分節し、この流れと pH5.2 のフタル酸塩緩衝液、クロラミン T 溶液、4-ピリジンカルボン酸-ジメチルバルビツール酸溶液を混合して生成する青い色の化合物の 600~640 nm の吸光度を測定する。

①及び④の発色原理は、JIS の 38.3 の 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法と同じである。

②及び③は ISO 14403¹⁰⁾で規格化されている方法と同じである。

前述したように、この規格原案の用語及び定義の箇条で全シアン及びシアン化合物が定義されており、これが環境基本法や水質汚濁防止法での全シアンの定義 pH2 のりん酸酸性下での蒸留により留出するシアン化合物と異なっている。従って蒸留条件などの違いにより、分解・留出するシアン化合物に相違があるかの検討が必要と考える。

4. まとめ

JIS 原案が作成され、規格化の審査中であるアンモニア体窒素、亜硝酸体窒素及び硝酸体窒素、全窒素、りん酸イオン及び全りん、フェノール類、ふっ素化合物、クロム(VI)、陰イオン界面活性剤、全

シアン及びシアン化物の9項目の内容の概要と考えられる問題点について記した。これらの9項目の流れ分析に関する報告も多数見られるが、ここでは個々の文献をあげることは省略しており、最近出されたFIA¹¹⁾及びCFA¹²⁾の本を参照いただきたい。

参考文献

- 1) JIS K 0126 流れ分析通則(2009)
- 2) JIS K 0102 工場排水試験方法(2008)
- 3) ISO 11732 Water quality—Determination of ammonium nitrogen—Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection(2005)
- 4) ISO 13395 Water quality—Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection(1996)
- 5) ISO 15681-1 Water quality—Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA)—Part 1: Method by flow injection analysis (FIA)(2003)
- 6) ISO 15681-2 Water quality—Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA)—Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA)(2003)
- 7) ISO 14402 Water quality—Determination of phenol index by flow analysis (FIA and CFA)(1999)
- 8) ISO 23913 Water quality—Determination of chromium (VI)—Method using flow analysis (FIA and CFA) and spectrometric detection(2006)
- 9) ISO 16265 Water quality—Determination of the methylene blue active substances (MBAS) index—method using continuous flow analysis (CFA)(2009)
- 10) ISO14403 Water quality—Determination of total cyanide and free cyanide by continuous flow analysis(2002)
- 11)小熊幸一, 本水昌二, 酒井忠雄監修; 日本分析化学会フローインジェクション分析研究懇談会編:「役に立つフローインジェクション分析」: みみずく社(2009)
- 12)ビーエルテック社編:「連続流れ分析法—自動化学分析 CFA の基礎から環境分析まで-」: 環境新聞社(2009)