生活環境の身心に及ぼす影響に関する公衆衛生学的研究（第2報）

Infant-Methemoglobinemia に関与する飲料水中の nitrate の brucine 定量法について

Studies on the effect of environmental reactions on the physical and mental conditions. (Part 2)

Determination of nitrate in drinking water using brucine sulfate.

岡　田　重　敏

Shigetoshi Okada
(Hokkaido Institute of Public Health)

緒　　言

我々の生活環境には常にわずかの硝酸塩が存在するが，下水，地下水，土壌中には比較的多量に存在する。この硝酸塩は通常はいわゆる窒素サイクルの最終酸化物として表わされるものであるが，我々がこれを重要視するのはこの硝酸塩が飲料水中に多量に含有されると，乳幼児メトヘモグロビン血症(Infant-Methemo-globinemia[1])として知られている乳幼児特有の疾病の原因物質となる危険性があるからである。従って各国では飲料水中の硝酸塩の許容量をそれぞれ規定している。この硝酸塩の定量については古くから種々の方法が研究されているが，現在では主としてフェノールジスルホン酸法が用いられている。この方法は硝酸塩の低濃度特に1ppm以下には適するが高濃度には不適当であり，塩素イオンによる妨害もあり，その操作も複雑で多くの時間を要するなどの欠点がある。またブルシン法はその取扱いが比較的容易であり短時間で操作が完了するなどの利点があるので古くから多くの研究があるが，取扱い方によっては，測定誤差が大きく決定的な方法とならず一時放置されていた。しかしブルシン法は操作が比較的簡易で測定が迅速に行なわれること，妨害物質が少ない等の利点からその後再び多くの研究者によってその定量法が検討され報告されるにいたった。しかし簡易，迅速かつ正確という点について従来の方法には必ずしも満足すべきものがないので著者はこれらの要求を満たし得るブルシン法について検討しよい結果を得たのでここに報告する。

ブルシンによる硝酸塩の定量法は古くは Winker, L. N.[2] によって提唱され，Yoe, J. H.[3] Snell, F. D. and Snell, C. F.[4] 等によって改良され，1926年 Haase[5]，1945年 Nall[6] 等の研究によって概ねその基礎がつくられた。その原理はブルシンが硫酸の存在下において硝酸塩と反応して生ずる黄色化合物を比色定量するのである。その発色機構は明らかでないが，この発色の黄色化合物はブルシンの酸化生成物と考えられている。

この黄色化合物の吸収極大は 405～420mμ の間にあるといわれているが調査の結果は概ね 410mμ 附近にあった。

実　　験

(1) 試　　薬

a．硝酸標準液

市販の特級 KNO_3 を用い，nitrate-nitrogen 100 mg/ℓ の保存液から濃度1，2，5，8，10ppm の標準液を調製する。

b．硫　酸

市販の特級品を用い 64% (V/V) 硫酸を調製する。

c．ブルシン試薬

市販の硫酸ブルシンを用い3%ブルシンの醋酸溶液を調製する。

d．醋　酸

市販の特級氷醋酸を用い30%醋酸を調製する。

e．スルファニル酸

市販の塩酸1mℓを添加した 0.1%溶液（蒸溜水）を調製する。

f．塩　酸

市販の特級品を用いる。

(2) 比　色　法

試料1 mlを正確に試験管にとり（試料中の HNO_3 －Nは1－8 ppm range に在る如くする）安全ピペットを用いてブルシン試薬 0.1mlを加え，次いで自動ビュレットより64%硫酸溶液5 mlを徐々に注入し，試験管を冷水に浸しつつよく混合し，これを70℃の水浴中で時々振盪し30分間加温する。次いで試験管を水浴中より取出し流水中で冷却し室温に10～20分放置した後比色計を用い蒸溜水を対照液として吸光度を測定し検量線より試料中の HNO_3－N 濃度を求める。

検量線はそのつど作成する必要がある。

また本法による検量線は Beer's Law には従わないが HNO_3－Nが1－8 ppm の範囲で強い直線性を示し検量線として十分に利用出来る。

（Fig. 1 参照）

結果と考察

(1) ブルシン濃度とその溶媒による影響

硝酸塩とブルシンの反応による発色のブルシン濃度に対する影響についてはFig. 2 の如く3%と5%濃度が1%濃度に比してその吸光度が大きく，また3%濃度は5%濃度よりわずかであるがその吸光度は良好であった。

また硫酸ブルシンの溶媒に蒸溜水，醋酸（30%），硫酸（0.1N）を用い，それぞれの3%ブルシン溶液を作りその発色に対する影響を調べた。その結果はFig.3の如くで，この三種の溶媒による差異は特に認められなかったが，醋酸，硫酸溶媒が蒸溜水に比し僅かにまさっていた。なを硫酸ブルシンの醋酸に対する溶解度は硫酸に比しはるかに良好であった。

(2) 硫酸濃度とその使用容量の吸光度に対する影響

硫酸の存在において硝酸塩はブルシンと反応して発色するがその硫酸濃度がこの発色に影響することはよく知られている。その適正濃度については研究者によってそれぞれ異っている。本法における硫酸の適正濃度はFig. 4，Fig. 5 の如く64%（V/V）であった。この図からわかる如く硫酸濃度は明らかに影響している。また硫酸濃度75%（V/V）が最も強度の発色をするが直線性は悪い，また発色度は75%硫酸に比して若干低いがその直線性の良好なのは硫酸濃度64%（V/V）であっ

Fig. 1 Calibration curve for nitrate according to the proposed procedure

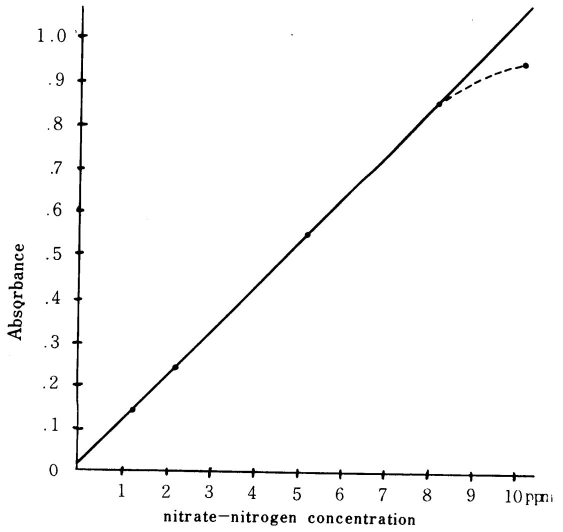


Fig. 2 Influence of brucine solution concentration

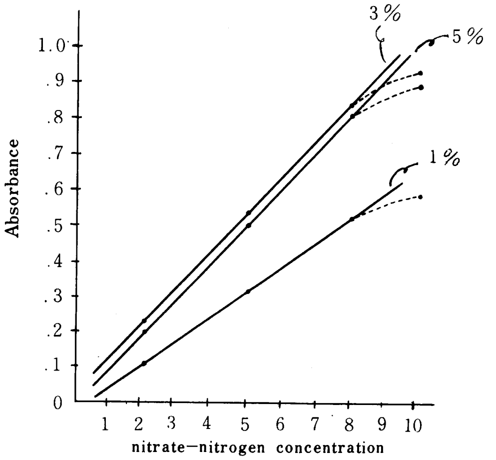


Fig. 3 Influence of solvent of the brucine

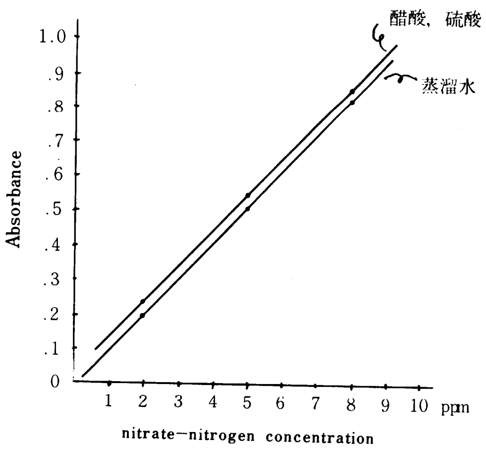


Fig. 4 Influence of the amount of sulfuric acid

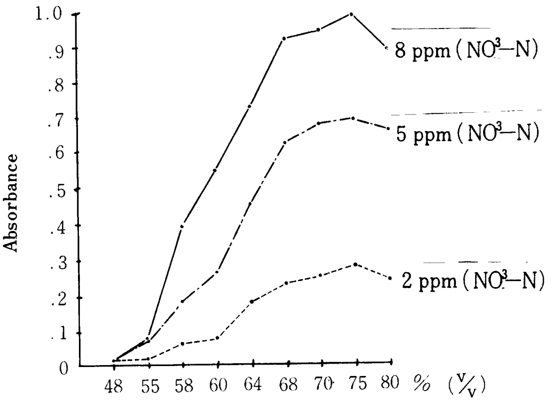


Fig. 5 Calibration curve for nitrate according to the various sulfuric acid concntration

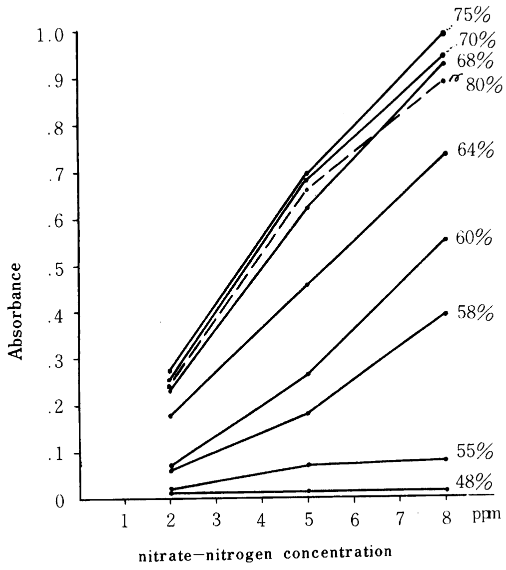
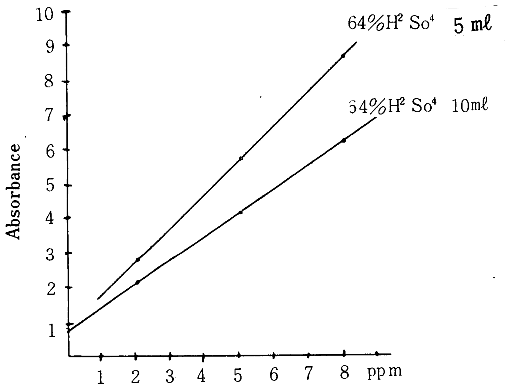


Fig. 6 Influence of sulfuric acid solution volumes

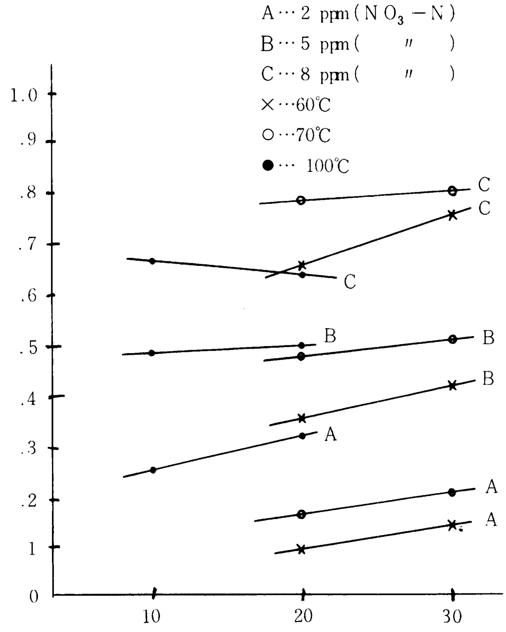


た。発色のために用いる硫酸の使用量はFig. 6 の如く5 mℓが良好であった。

(3) 硫酸添加後の加熱温度と加熱時間の影響

本法による発色を一層よくするために加熱法を用いた。その加熱温度を60℃，70℃，100℃とし，その加熱時間は60℃，70℃の場合は各20分，30分とし，100℃の場合は10分，20分としてその吸光度を測定した。結果はFig. 7 の如く，70℃，30分の吸光度が大きく，直線性もFig. 5に示す如く最も良好であった。

Fig. 7 Influence of temperature



(4) 妨害物質

本法に与える妨害物質は強酸化剤，還元剤，亜硝酸を除き次の如き共存イオンはその限度量以内では特に測定に影響を及ぼすことはなかった。

Cl′ ……妨害せず，	Fe¨ ……3 ppm
Fe¨¨ ……3 ppm,	Mn¨ ……5 ppm,
Mg¨ ……100ppm,	Ca¨ ……100ppm

(5) 亜　硝　酸

亜硝酸は一般にはその存在量は少なく下水処理場の放流水も水でも地着水，地下水も亜硝酸の含有量は硝酸塩の量に比しはるかに微量で0.1mg/ℓ[7] 以下の場合が多い。しかし共存亜硝酸は本法でな妨害物質なのでこれを除去する必要がある。この目的のためにはズルファニル亜硝酸が多く用いられている。これは亜硝酸が塩酸の存在においてズルファニル酸をジアゾ化するときに消費される原理を応用したものであるが，著者の経験によればある一定量以上のスルファニル酸は硝酸塩にも影響を与えるのでその添加量については

慎重を期す必要がある。その影響を与えることなく添加し得る限度量は table 1 の如く HNO_2-N 1 ppm 以下で0.05mgのズルファニル酸が概ね適量と考えられる。しかしこのズルファニル酸の添加量については研究者によって差異があり更に検討を要するものと思われる。本法では亜硝酸が共存するときに試料にブルシン試薬を加えた後に 0.1%ズルファニル酸0.05 mlをブルシン液に加えることとした。

(6)再　現　性

本法と在来のブルシン法並びにフェノールジスルホン酸法についてその再現性を比較した。その結果は table 2の如くで，在来法に比し再現性は若干良好であり，またフェノールジスルホン酸法とはほぼ同じ再現性を示した。

Table 1　Influence of sulfanilic acid content

NO_3-N, NO_2濃度	0.1% sulfanilic acid soluton 添加量	absorbance
	ml	
NO_3-N 5 ppm	—	0.550
〃 5	0.05	0.545
〃 5	0.1	0.440
NO_3-N 5, NO_2-N 1	—	0.630
〃 5, 1	0.05	0.550
〃 5, 1	0.1	0.400

注　0.1%sulfanilic acid solution には hydrocloric acid 1 ml添加

Table 2　Nitrate-nitrogen の定量法による recovery rate の比較

	Phenoldisulfonic acid method			在来のBrucine method			Proposed brucine method		
NO_3-N 添加量 mg/l	測定値 (平均値)ppm	計算値 ppm	recovery %	測定値 (平均値)ppm	計算値 ppm	recovery %	測定値 (平均値)ppm	計算値 ppm	recovery %
none	5.5			5.8			5.9		
2.0	6.9	7.5	92	7.6	7.8	97	8.1	7.9	102
5.0	11.2	10.5	107	10.3	10.8	95	10.5	10.9	97
none	4.0			3.9			3.8		
3.0	7.1	7.0	101	7.0	6.9	101	6.8	6.8	100
7.0	11.3	11.0	103	10.6	10.9	97	10.6	10.8	98
average			100.7			97.2			99.2

注　測定値は各々30～40回の測定結果の平均値である。
本測定は Filterphotometer（平間製）を用い 420mμの violet filter, light path 1 cmのセルを用いた。

結　　言

飲料水等に比較的多量に含有する硝酸塩を硫酸ブルシンを用いて簡易，迅速，正確に測定する方法を検討し次の結果を得た。

1．硝酸塩と反応するブルシン濃度は試料 1 ml, HNO_3-N 1～8 ppm で 3 %醋酸溶液が最も良好な吸光度を示した。

2．硝酸塩とブルシンの反応に関与する硫酸濃度は 64%（V/V）が最適であった。またその添加量は 5 mlが最も適量であった。

3．反応促進のための加熱法では加熱温度70℃，加熱時間30分が最も良好であった。

4．本法では HNO_3-N 1～8 ppm で直線性を示した。

5．本法は在来法に比しその再現性は良好であった。

6．本法は在来法より操作が簡易であり，比較的多量の硝酸塩を含む試料を短時間にかつ比較的正確に多数処理することが出来る。

擱筆に当り，本研究に協力と指導下さった本研究所橘高薬学部長に深謝します。

文　　献

1．岡田，向後外．：北海道衛生研究所報　第20集 213～222（1970）
2．Winker, L. N. : Chem . Ztg. 23, 454 (1899). 25, 586 (1901)
3．Yoe, J. H. : Photometric chemical analysis 1, 318 (1928)
4．Snell, F. D. and Snell, C. F. : Colorimetric method of analysis 2, 798－9 (1949)
5．Nall, C. A. : Ind. Eng. Chem. Analysis 17, 426 (1945)
6．Haase, L. W. : Chem. Ztg. 50, 372 (1926)
7．Clair N. Sawyer : Chemistry for Sanitary Engineers (1960)
8．Standard method for the examination of water and wastewater 12 Ed. (1965)
9．日本水道協会：上水試験法（1970）
10．A. D. Westland and R. R. Langford. : Analytical Chemistry 23, 1996 (1956)