

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19750066

研究課題名（和文） ニトロソアミン類の高感度分析システムの開発

研究課題名（英文） Development of highly sensitive determination method for measurement of N-nitrosamines

研究代表者

児玉谷 仁（KODAMATANI HITOSHI）

鹿児島大学・理学部・助教

研究者番号：30434468

研究成果の概要：

近年、強い発がん性を持つことで知られるニトロソアミン類が水の塩素消毒副生成物として発生することが確認され、その監視技術が求められている。申請者はこのような現状を踏まえ、ニトロソアミン類の高感度分析法の開発を進めた。その結果、高速液体クロマトグラフィーに紫外線照射とルミノール化学発光検出法を組み合わせることで、前濃縮や誘導体化等の前処理なしで水試料からニトロソアミンを数 ppt レベルで直接測定可能な測定法を開発した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ニトロソアミン、紫外線照射、ルミノール、化学発光、HPLC

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ニトロソアミン類が水の塩素消毒副生成物として発生することが確認され、飲料水等における規制対象物となりはじめた。その測定には、ppt レベルの測定感度が要求されるため、現在用いられている LC-MS 法などでは 1000 倍もの濃縮が必要であり、より簡易で高感度な測定法が開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

ニトロソアミン類の測定には、非常に高い測定感度を必要とし、また日常的な監視が必要

となるため安価かつ簡便な方法が必要である。そこでこれらの条件を満たす新規測定法を開発することを目的に研究を進めた。

## 3. 研究の方法

ニトロソアミン類に紫外線照射を行うと一酸化窒素(NO)と第二アミンに分解することが知られている。また NO は過酸化水素と反応することでペルオキシナイトライトとなり、ルミノール化学発光検出法で高感度検出できることが報告されている。そこで紫外線照射により生成した NO をルミノール化学発

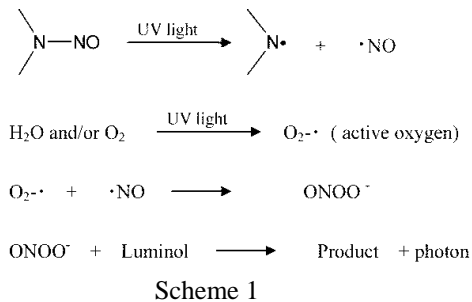
光法で検出することでニトロソアミンを検出することを目指した。そのための各種溶液条件・装置条件等を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)ニトロソアミン分析法の開発

###### ①反応機構の解明

ニトロソアミン類は紫外線照射により、N-NO 結合が切断され、第二アミンと NO が生成することが知られている。そこで実験開始時は、紫外線照射により発生した NO と過酸化水素を混合することにより、ペルオキシナイトライト(ONOO)を発生させ、ルミノールにより化学発光検出する予定であった。しかし予想に反し、ニトロソアミン類に紫外線を照射するだけでルミノールと発光反応を起こすことが確認された。そこで、この発光反応機構の解明をおこなった。後述する②で得られた結果などを基に反応機構を推測し、その確認実験をおこなった。



Scheme 1 に推測された発光反応機構を示す。この反応機構の確認のため下記の実験をおこなった

<ONOO<sup>•</sup>の確認>ONOO<sup>•</sup>が 302nm に特異的吸収波長を持ち、更に酸性条件下では直ちに、塩基性条件下では徐々に分解していくことを利用し、バッチ法でニトロソアミン類に紫外線を照射した後、302nm の吸光度を追跡することで ONOO<sup>•</sup>の発生を確認した。また、ルミノールと ONOO<sup>•</sup>の発光反応において、重炭酸イオンがエンハンサーとなることが報告されている。本研究においても重炭酸イオンにより発光の増大が確認された。

<O<sub>2</sub><sup>••</sup>の確認>O<sub>2</sub><sup>••</sup>はルミノールや CLA などと発光反応を起こすことが知られている。②で検討した UV 照射時間の最適化実験などにおいて、塩基性水溶液への紫外線照射によりルミノールの発光反応が確認された。またルミノールの代わりに CLA を発光試薬とした場合においても発光が確認された。これらのことから O<sub>2</sub><sup>••</sup>が発生しているものと確認された。

以上の確認実験から提案した発光反応機構が確かなものであると考えられる。

###### ②最適条件の検討

Fig.1 に示す装置構成を用い HPLC 実験をおこなった。(効率よく実験を進めるため最適条件の検討にはカラムを取り外した構成を使用した。)移動相の組成,ルミノール溶液の組成,紫外線照射時間,紫外線照射時の pH,発光反応時の pH,流速について検討した。

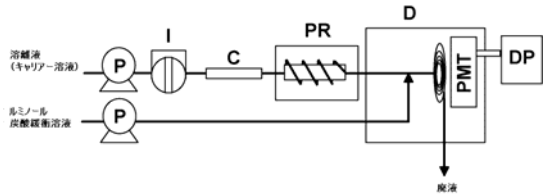


Fig.1 使用装置概略図

P, ポンプ; I, インジェクター; C, ODS カラム; PR, 光化学反応器; D, 化学発光検出器; DP, データ処理装置。

結果として、最適条件下でのニトロソアミン類の測定範囲は、5-2000 ng/L となった。

検討した項目の中で、特に紫外線照射時の pH とルミノール溶液の組成が発光強度に特に大きく影響を与えた。Fig.2 に紫外線照射時の pH と発光強度の関係を示す。中性付近ではほとんど発光は得られないが塩基性になるに従い発光の増大が確認された。特に塩基性になるに従いバックグラウンドの発光が大きくなることが確認された。このことから塩基性水溶液への紫外線照射によりルミノールと発光反応を起こす活性酸素種が発生する可能性が示唆された。

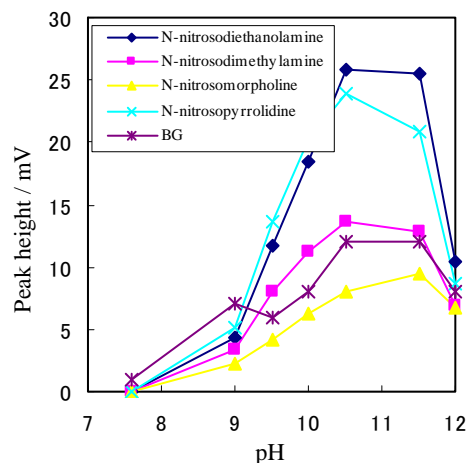


Fig. 2 紫外線照射時の pH 依存性

またルミノール溶液を調製する緩衝溶液に炭酸緩衝液を用いたとき、ホウ酸やリン酸緩衝液と比べ 10 倍以上高い発光が確認された。特に発光反応時の pH が 10 付近であるときその効果が顕著であった。最終的な発光反応種

と推定される ONOO<sup>-</sup>は重炭酸イオン共存下でルミノール発光を増大させることが報告されている。これらの結果から Scheme 1 の発光反応機構を推測した。

### ③環境水分析への応用

得られた測定可能範囲から濃縮操作なしで環境水中のニトロソアミンを測定できると考えられたため、Fig.1 の装置を用い環境水の測定をおこなった。河川、水道水、井戸水、工場排水などについて測定をおこなったところ、河川水や工場排水から数 ppt から数十 ppt の *N*-nitrosodimethylamine と *N*-nitrosomorpholine が検出された(Fig. 3)。

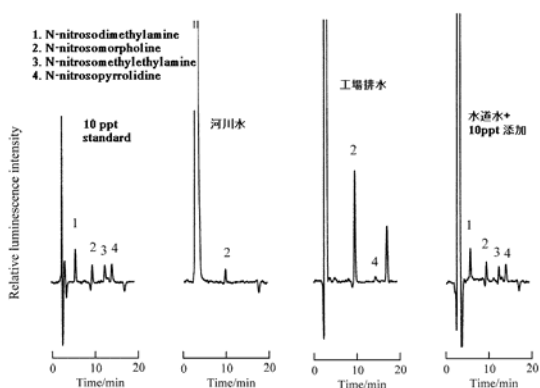


Fig. 3 実試料のクロマトグラム

本研究課題により開発されたニトロソアミン測定法は、環境水測定に十分応用できることが確認された。特に濃縮操作なしで日本の河川水中モニタリング目標値や米国・カリフォルニア州やカナダ・オンタリオ州で定められている飲料水中ニトロソアミン基準値も測定可能であるため有用な測定法になると期待される。

### ④他含窒素化合物との反応

ニトロソアミン以外の含窒素化合物が同様の発光反応を起こすか確認をおこなった。結果、窒素化合物構造を有する化合物についてのみ発光が得られた。特に *N*-ニトロソや *S*-ニトロソ化合物では強い発光が得られたが、ニトロベンゼンやニトロプロパン、硝酸イオン、亜硝酸イオンなどではニトロソ化合物に比べ弱い発光であった。しかしながら紫外線照射時間を長くすることでこれらの化合物の発光の増大が確認された。一方、アミン類やアンモニアなどでは紫外線照射時間に関わらず発光は確認されなかった。

これらのことから本検出法は、効率よく NO を発生させる条件を用いることで他の含窒素化合物構造を持つ物質でも選択的に検出できることが期待される。

## (2)硝酸・亜硝酸イオンの選択的同時分析法

ニトロソアミン類の測定法の開発過程で、硝酸イオン、亜硝酸イオンがニトロソアミンと同様の検出反応により測定できることが明らかになったのでその測定条件を検討した。

### ①最適条件の検討

ニトロソアミン分析法と同様の装置(Fig.1)からカラムを取り外した装置を用い硝酸・亜硝酸イオン検出のための最適条件を求めた。ほとんどの条件でニトロソアミンと同様の傾向が見られたが、紫外線照射時間と有機溶媒の影響では異なる結果が得られた。

紫外線照射時間はニトロソアミン類では 15 秒程度が最適であったが、硝酸・亜硝酸イオンにおいては 30~45 秒程度必要であった。これは、ニトロソアミン類が紫外線照射により *N*-NO 結合が分断され NO が生成するのに対し、硝酸イオンは亜硝酸への光還元、さらに亜硝酸イオンは NO への光還元を必要とするためであると考えられる。また紫外線照射時にメタノールを添加すると発光反応が増大することが確認された。メタノールは紫外線照射により、様々なラジカル種を生成することが知られている。このラジカル種により硝酸イオンや亜硝酸イオンの NO への反応が促進されたものと考えられる。この点について、今後より詳細な検討を行うことで更なる高感度化を達成できる可能性がある。

### ②環境水分析への応用

検討した最適条件を基に環境水中の硝酸・亜硝酸イオンの分析をおこなった。通常、環境水中の硝酸イオンは亜硝酸イオンに比べ 100 倍程度高濃度で存在する。そのため既存のイオンクロマトグラフィー-伝導度検出法などにおいてはこれら 2 つのイオンを効率良く同時測定することは困難であった。しかしながら、本研究により開発された硝酸イオン・亜硝酸イオン検出法は、亜硝酸イオンが硝酸イオンより約 10 倍高感度であるため、環境水中のこれらのイオンを効率よく同時測定できることが期待された。

Fig.1 に示される装置から分離カラムを陰イオン交換カラムに変更した装置を用いて分離条件を最適化したところ、Fig.4(a)に示されるように硝酸イオン、亜硝酸イオンの分離検出が可能であった。その測定範囲は亜硝酸イオンで  $2.0 \times 10^{-9} - 2.5 \times 10^{-6}$  M、硝酸イオンで  $2.0 \times 10^{-8} - 2.5 \times 10^{-5}$  M となった。

実試料として池水、河川水、雨水、水道水を測定したときのクロマトグラムを Fig.4(b)~(e)にそれぞれ示す。水道水を除く試料では硝酸イオン・亜硝酸イオン以外のピークは確認されず、開発された本法が高い選択性を有していることが確認された。水道水試料においては、保持時間 0 分付近にピークが

確認された。ルミノールは各種酸化剤と発光反応を起こすことから、これは残留塩素によるピークであると考えられる。

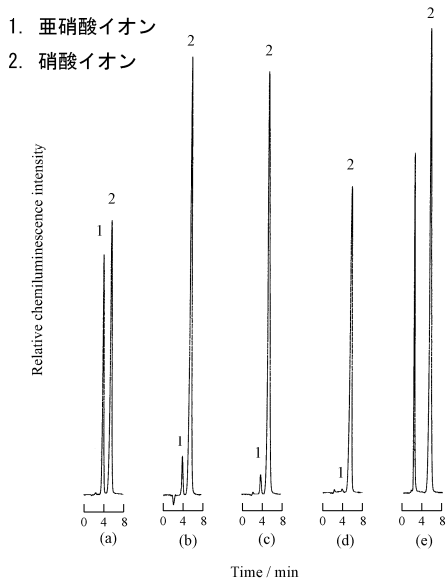


Fig. 4 実試料のクロマトグラム  
(a) 亜硝酸イオン(0.5  $\mu\text{M}$ )+硝酸イオン(5  $\mu\text{M}$ )標準液, (b) 池水, (c) 河川水, (d) 雨水, (e) 水道水.

開発した硝酸イオン・亜硝酸イオン同時分析法が正確にこれらイオンを測定できているか確認するため既存の測定法との比較をおこなった。硝酸イオンはイオンクロマトグラフィ-伝導度検出, 亜硝酸イオンはグリス法により測定をおこなった。横軸に既存の測定法による測定結果, 縦軸に開発した測定法による測定結果を示した図を Fig.5 に示す。この結果から開発した硝酸イオン・亜硝酸イオン同時分析法が、これらのイオンを効率よく正確に測定できることが確認された。

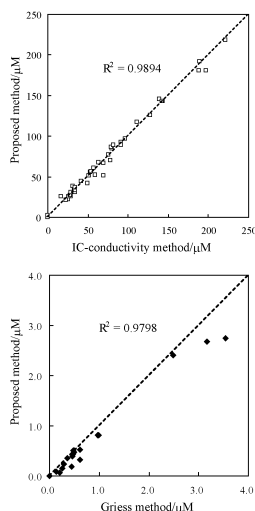


Fig. 5 既存の測定法との比較

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Hitoshi Kodamatani, Shigeo Yamazaki, Keiitsu Saito, Takashi Tomiyasu, Yu Komatsu, "Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples by ion chromatography with post-column photochemical reaction and luminol chemiluminescence detection", *Journal of Chromatography A*, **1216**, 3163-3167, 2009. (査読あり)
2. Hitoshi Kodamatani, Shigeo Yamazaki, Keiitsu Saito, Abena Amponsaa-Karikari, Naoya Kishikawa, Naotaka Kuroda, Takashi Tomiyasu, Yu Komatsu, "Highly sensitive method for determination of N-nitrosamines using high-performance liquid chromatography with online UV irradiation and luminol chemiluminescence detection", *Journal of Chromatography A* **1216**, 92-98, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) オンライン紫外線照射ルミノール化学発光検出法による亜硝酸・硝酸イオン分析法の開発(2), 児玉谷仁, 山崎重雄, 齊藤惠逸, 小松優, 穴澤活郎, 富安卓滋, 分析化学会第 57 年会 福岡大学(2008 年 9 月 12 日)
- 2) オンライン紫外線照射ルミノール化学発光法検出法による亜硝酸・硝酸イオン分析法の開発, 児玉谷仁, 山崎重雄, 齊藤惠逸, 渡辺雄二郎, 藤永薫, 小松優, 日本分析化学会第 56 年会 徳島大学 (2007 年 9 月 19 日)
- 3) オンライン紫外線照射ルミノール化学発光検出法を用いたニトロソアミン類の高感度 HPLC 分析法の開発, 児玉谷仁, 山崎重雄, 齊藤惠逸, 渡辺雄二郎, 藤永薫, 小松優, 第 68 回分析化学討論会 宇都宮大学(2007 年 5 月 19 日)
- 4) オンライン光化学反応-化学発光検出法によるニトロソアミン類の高感度 HPLC 分析法の開発, 児玉谷仁, 山崎重雄, 齊藤惠逸, 小松優, *Chromatography* **28** (Supplement 1), 61-62, 2007. 第 14 回クロマトグラフィ-シンポジウム, 富山県民共生センターサンフォルテ(2007 年 5 月 11 日)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 「窒素酸化物含有化合物の検出方法およびそれに用いる検出装置」 児玉谷 仁, 小

松 優, 渡辺 雄二郎, 藤永 薫, 齊籐 恵  
逸, 山崎 重雄 (特願 2007-282237)

[その他]

1. 日刊工業新聞 2007 年 6 月 26 日 p30.「ニトロソアミン類の高感度検出法の開発」に関する  
報道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉谷 仁 (KODAMATANI HITOSHI)

鹿児島大学・理学部・助教

研究者番号 : 30434468

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者