

Brucine에 의한 窒酸이온의 吸光光度定量法

韓 南 植

嶺南大學校 藥學大學 藥學科
(1974. 8. 21 접수)

Spectrophotometric Determination of Nitrate with Brucine

Bo Shik Han

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Yeungnam

University, Taegu, Korea

(Received Aug. 21, 1974)

要 約. 特別한 裝置나 複雜한 操作없이 簡單하고 迅速한 brucine 法에 의한 窒酸이온의 吸光光度 定量法을 定하였다.

檢液을 brucine 試液과 30 N 黃酸으로 60 °C에서 30 分間 反應시키면 安定하고 再現性이 좋은 發色을 얻을 수 있으며, 410 nm에서 窒酸性窒素의 濃도가 0.07 ppm 부터 0.6 ppm 까지 吸光도와 直線의 關係가 있다. 또 反應系에서 吸光種의 數는 단 하나임을 確認하였다.

妨害이온들중 亞窒酸이온은 메탄올로서 除去할 수 있다.

Abstract. A simple and rapid spectrophotometric method has been found for the determination of nitrate content in natural water according to brucine method by means of neither particular apparatus nor troublesome procedures.

Brucine reacted with nitrate in the presence of 30 N sulfuric acid to develop stable color with good reproducibility after 30 minutes reaction at 60 °C.

An essentially linear relationship to the nitrate concentration was observed in the range of 0.07~0.6 ppm at 410 nm, and it was established that the number of absorbing species in the reaction system was only one between 400 and 490 nm.

Among the interferences, nitrite could be removed by the addition of methanol.

序 論

窒酸이온의 定量法으로는 phenoldisulfonic acid 法¹, 還元法², xylenol 法³ 및 brucine 法 등이 있다. Brucine 法은 Winkler, Haase⁴가 開發한 것을 Peech⁵, Noll⁶ 등 여러 사람이 改良하였다.

이 法은 窒酸이온에 黃酸과 brucine 을 作用시켜 發色하는 黃色을 比色定量하는 것인데 Green-

berg⁷, Jenkins⁸는 Standard Methods⁹를 包含한 大部分의 brucine 法이 誤차가 크고 再現性이 적다고 報告하였다.

Noll⁶은 brucine 試液으로서 2% brucine-chloroform 을 使用하였고, Fisher¹⁰는 檢液, brucine 試液, 黃酸의 順序로 加하고 30 °C로 冷却하여 吸光도를 測定하였고, Jenkins⁸는 檢液, 85% 黃酸, 少量의 sulfanilic acid 를 包含한 brucine

試液의 順序로 찬물중탕에서 加한 後 끓는 물중탕에서 加熱하였고 齋藤¹¹는 얼음물중탕에서 진한 黃酸을 加한 後 60°C로 加熱하였다. 以上과 같은操作으로 진한 黃酸을 加할 때 發生하는 熱의 影響을 제거한 다음 물중탕에서 加熱하여 熱의 供給을 均一하게 함으로써 發色을 一定하게 할수 있다고 하였다. Standard Methods⁹에서는 90% 黃酸을 使用하여 檢液, brucine 試液, 黃酸의 順序로 加하고 있으나, 이 方法으로는 熱의 調節이 不可能하여 結果가 不良하여 진다고 Jenkins⁸는 報告하였다. Greenberg⁷는 檢液에 brucine 試液과 90% 黃酸을 加한 後 10分間 어두운 곳에 放置한 다음 물로 稀釋하고, 다시 어두운 곳에 20~30分間 放置하였다가 吸光度를 測定하였다. 한편 brucine 과 窒酸이온間의 反應生成物에 對한 研究은 Deyl¹²의 報告가 있으나 아직 그 反應機構는 不明한 點도 있다. 以上의 方法들이 (1) brucine 試液의 調製法이 一定하지 않고, (2) 黃酸의 濃도와 使用量을 決定한 理由를 밝히지 않았으며, (3) 黃酸을 加할 때의 溫度 및 加한 後의 加熱溫度 및 時間이 서로 다르고, (4) 試藥을 加하는 順序가 一定하지 않으며, 또 (5) 吸光種의 數를 究明하지 않았으므로, 이 主題의 研究에 여러가지 困難을 주고 있다. 著者는 以上의 여러가지 條件을 檢討하여 特別한 裝置나 複雜한 操作없이 簡單하고 迅速한 brucine 法에 依한 天然水中의 窒酸이온의 定量法을 改良하였다.

2. 實 驗

2.1. 裝 置

Spectrophotometer. Beckman Model DB-G, 吸光 cell 은 10 mm 의 glass cell 을 使用하였다.

2.2. 試 藥

本實驗에서 使用한 모든 試藥은 市販分析用 試藥을 使用하였다.

Brucine 試液. Brucine 2水化物 1g 을 진한 黃酸 1 ml 를 加한 適當量의 물에 녹여 100 ml 로 하였다.

窒酸이온標準溶液. 窒酸칼륨 0.7218 g 을 물에 녹여 1000 ml 로 하였다. 이 溶液은 100 ppm 의

窒酸性窒素($\text{NO}_3^- - \text{N}$)를 含有한다. 이것을 適當히 稀釋하여 標準溶液으로 하였다.

黃酸溶液. 진한 黃酸을 稀釋하여 30 N 黃酸 (83%)으로 만들었다.

2.3. 標準操作

檢液 1 ml (1.25 ppm~10 ppm $\text{NO}_3^- - \text{N}$)를 50 ml 의 유리마개 플라스크에 取하여 brucine 試液 2 ml 를 混合하고 30 N 黃酸 15 ml 를 加하여 잘 흔들어 주고 마개를 한 다음 60°C 의 恒溫槽에서 30分間 유지한 다음 흐르는 물에서 5分間 室溫으로 冷却한 것을 即時 波長 410 nm 에서 蒸溜水를 對照로 하여 吸光度를 測定한다.

3. 結果 및 考察

3.1. 吸收曲線. 黃酸酸性에서 窒酸이온과 brucine 과의 反應生成物의 吸收曲線은 Fig. 1과 같다. 曲線 A와 B는 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 의 濃도가 各各 0.42 ppm, 0.28 ppm 인 것을 標準操作 2.3에 따라 蒸溜水를 對照로 하여 作成한 것이고 吸收極大波長은 410 nm 이며 曲線 C는 試藥 blank 이다.

試藥을 加하는 順序가 標準操作 2.3의 順序와

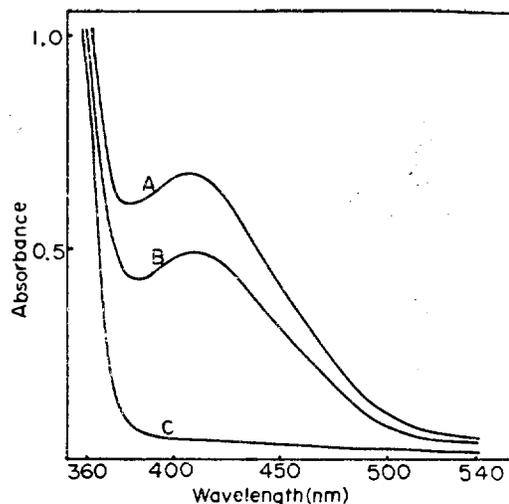


Fig. 1. Absorption spectra of the reaction product of nitrate with brucine.

A: 0.42 ppm $\text{NO}_3^- - \text{N}$; B: 0.28 ppm $\text{NO}_3^- - \text{N}$; C: Reagent blank

달라도 吸光度의 變化는 없었다.

3.2. 黃酸量의 影響. Brucine 이 黃酸酸性에서 窒酸이온과 反應하여 나타나는 黃色의 安定性과 強度는 黃酸의 濃度 및 使用量과 깊은 關係가 있다.⁵⁻¹¹ 그리고 大多數가 진한 黃酸을 그대로 使用하고 있지만 本實驗에서는 標定한 30 N 黃酸을 使用하였다.

著者의 經驗에 依하면 진한 黃酸을 使用하던 發生하는 熱을 放散시키기 爲하여 淸물이나 열을물 속에서 操作하여야 함은 물론이고 粘度가 크므로 測定이 끝난 cell 에 다음 測定液을 넣을 때 不便하고 또 繼續 使用하면 glass cell 이 損傷되므로 黃酸의 濃度를 낮추어 發熱을 적게하고 cell 에 粘着하는 不便을 덜고 또한 cell 의 損傷을 防止하였다. 한편 50 % 以下의 黃酸으로는 充分히 發色되지 않으므로⁵⁻¹¹ 50, 60 및 70 % 黃酸을 使用해 보았으나 良好한 結果를 얻지 못하였다. 이들 濃度에서는 發色은 되지만 보다 높은 溫度로 加熱하여야 하며 安定性, 再現性도 不良하였다.

30 N 黃酸의 使用量을 決定하기 爲하여 NO₃⁻-N 의 濃度가 5 ppm 인 標準溶液 1 ml 에 30 N 黃酸을 5 ml 부터 20 ml 까지 1 ml 間隔으로 加하고 50, 60 및 70 °C 에서 各各 標準操作 2.3에

따라 實驗한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 60 °C 에서는 黃酸의 量이 6 ml 일때 吸光度는 最高로 되고 그 以上에는 黃酸量의 增加로 因한 NO₃⁻-N 의 濃度의 減少로 吸光度가 떨어져서 11~18 ml 사이에서 거의 直線의 으로 變化하고 있다.

即 6 ml 일 때 發色은 限界에 到達하고 차차 安定化되어 11~18 ml 에서 가장 安定化되며 그 中間點은 15 ml 이었다. 또 50 및 70 °C 의 경우에도 安定되는 範圍는 短縮되나 그 中間點은 역시 15 ml 이었다. 그러므로 黃酸의 量을 15 ml 로 決定하였다.

3.3. 加熱溫度와 加熱時間의 影響. 標準操作 2.3에서 黃酸을 加하고 난 다음 加熱溫度와 加熱時間의 最適條件을 알기 爲하여 NO₃⁻-N 의 濃度를 0.28 ppm 으로 하고 加熱溫度를 50, 60 및 70 °C 로 하였을 때 加熱時間에 따라 吸光度가 變化하는 모양은 Fig. 3과 같다.

加熱溫度가 60 °C 일 때 加熱時間 20 分 以上에서 吸光度가 一定하였으므로 本實驗에서는 加熱時間을 30分으로 定하였다. 加熱溫度가 50 및 70 °C 일 때는 加熱時間 60 分 以內에서는 吸光度가 一定해지는 條件은 없었다. 그러므로 實驗 3.2 및 3.3의 結果를 綜合하여 加熱溫度는 60 °C

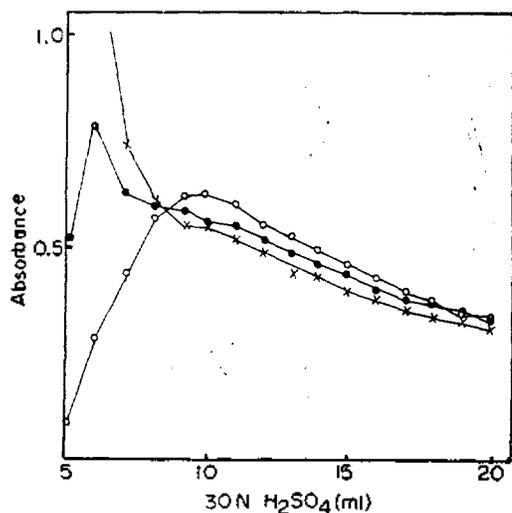


Fig. 2. Effect of amounts of H₂SO₄ added on absorbance.
○: 59 °C; ●: 60 °C; ×: 70 °C

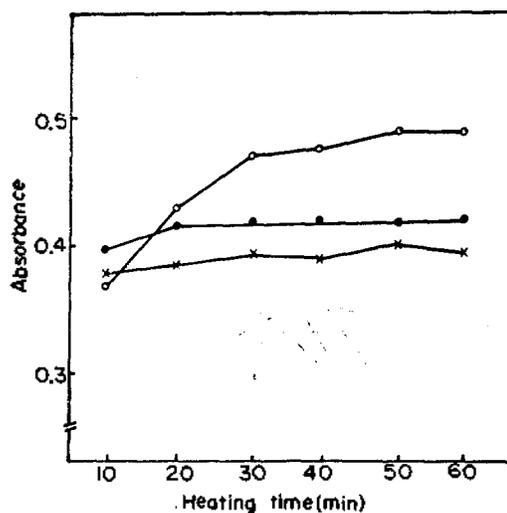


Fig. 3. Effect of heating time and temperature on absorbance.
○: 50 °C; ●: 60 °C; ×: 70 °C

로 결정하였다.

3.4. Brucine 量의 影響. 標準操作 2.3 中에서 brucine 試藥의 量을 變化시켜 brucine 量과 吸光度와의 關係를 調査하였다. 그結果를 Fig. 4 에 圖示하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 brucine 試液 1.5 ml 以上에서 吸光度는 一定함으로 brucine 試液의 使用量을 便宜上 2 ml 로 하였다.

3.5. 吸光度의 經時變化. 加熱操作이 끝난 것을 흐르는 물에서 5 分間 冷却한 다음 吸光度를 測定할 때까지의 經時變化를 實驗하여 보니 70 分 經過해도 吸光度의 變化는 거의 없었으나 即時 吸光度를 測定하기로 定하였다.

3.6. 檢量線. 以上の 여러 條件을 檢討한 結果 標準操作 2.3을 決定하였고, NO_3^- -N의 濃度를 變化시켜 蒸溜水를 對照로 하여 檢量線을 作成한 것이 Fig. 5이다. NO_3^- -N의 濃度가 0.07~0.6 ppm의 範圍에서 吸光度와 檢液中的 NO_3^- -N의 濃度는 直線關係에 있고 再現性이 良好함으로 이 範圍에서 NO_3^- -N의 定量이 可能하다.

그리고 本法의 精密度를 調査하기 爲하여 NO_3^- -N의 濃度를 0.28 ppm으로 一定하게 하고 12 回 實驗한 結果 平均吸光度 0.433에 있어서 標準偏差는 0.005이고 相對誤差는 1.2%이었다.

3.7. 吸光種의 數. 吸光種의 數를 確認하는 여

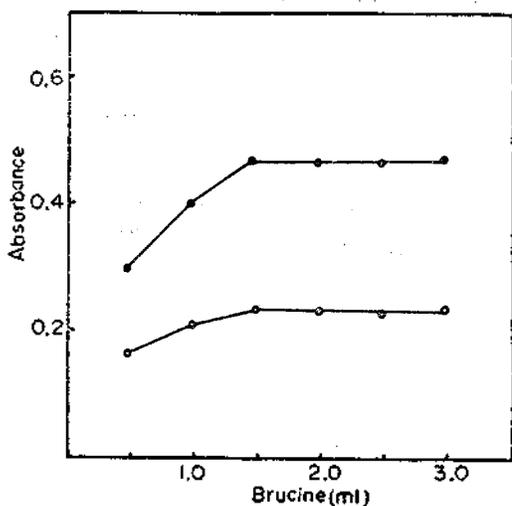


Fig. 4. Effect of amounts of brucine reagent added on absorbance.

●: 0.28 ppm NO_3^- -N; ○: 0.14 ppm NO_3^- -N

러가지 方法^{15~17} 中 簡單한 J. S. Coleman¹⁸의 graphical method를 本法에 適用하였다.

NO_3^- -N의 濃度가 0.07, 0.14, 0.28 및 0.42 ppm인 溶液을 標準操作 2.3의 方法으로 波長

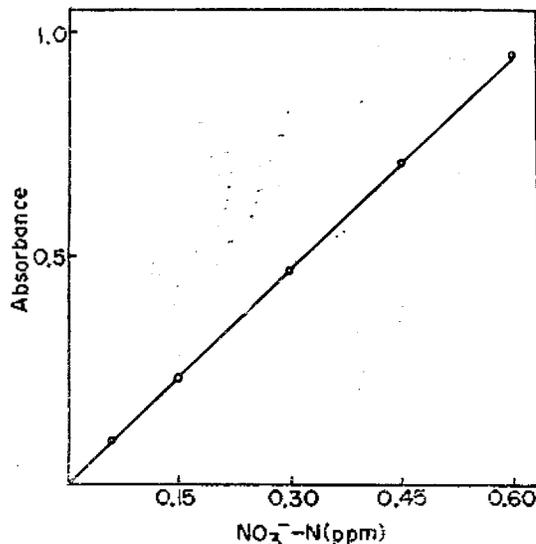


Fig. 5. Calibration curve for nitrate nitrogen according to procedure 2.3.

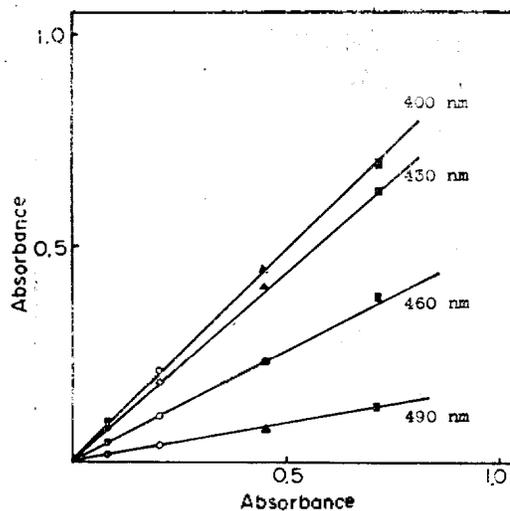


Fig. 6. Identification of existence of only one absorbing species by J. S. Coleman's graphical method. The absorbance at 400, 430, 460, and 490 nm is plotted against the absorbance at 410 nm of each solution of 0.07 (●), 0.14(○), 0.28(▲), and 0.42(■)ppm NO_3^- -N

Table 1. Tolerance limit for diverse ions.

Ion added	Addedas	Tolerance limit(ppm)
Na ⁺	Na ₂ SO ₄	>5000
K ⁺	KCl	2000
Mg ²⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	>5000
Ca ²⁺	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1000
Fe ²⁺	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5
Fe ³⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·xH ₂ O	5
Cu ²⁺	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2000
Zn ²⁺	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	>5000
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O	100
HCO ₃ ⁻	KHCO ₃	>5000
F ⁻	NaF	>5000
Cl ⁻	NaCl	2000
Br ⁻	KBr	10
I ⁻	KI	5

400, 430, 460 및 490 nm 에서 各各 吸光度를 測定한 것을 縱軸으로 하고 410 nm 의 吸光度를 橫軸으로 한 것이 Fig. 6 이다. Fig. 6 에서 보는 바와 같이 直線들이 原點에 모임으로 이 反應系의 吸光物質의 數는 하나임이 確實하다.

3.8. 共存이온의 影響. 檢液中の NO₃⁻-N 의 濃도가 0.28 ppm 일 때 吸光度에 ±3% 以內의 誤差를 주는 共存이온들의 許容限界를 Table 1 에 表示하였다.

Na⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, HCO₃⁻ 및 F⁻ 등은 正誤差를, K⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Cl⁻, Br⁻ 및 I⁻ 등은 負誤差를 주며 Fe²⁺, Fe³⁺ 및 I⁻ 가 가장 큰 誤差를 준다.

우리나라 天然水中의 HCO₃⁻ 의 濃도는 대략 100 ppm 以下¹⁹, Cl⁻ 은 20 ppm 以下¹⁹⁻²¹, F⁻ 은 1 ppm 以下²¹, Br⁻ 은 0.1 ppm 以下²¹ 이고 I⁻ 은 0.01 ppm 以下²¹ 임으로 本法에서는 妨害가 되지 않는다.

亞窒酸이온은 少量이라도 妨害가 됨으로 除去하여야 한다. 이것을 除去하기 爲하여 Robinson 等²² 은 aminosulfonic acid 를 使用하고 있으나 本法에서는 檢液 10 ml 에 對하여 10% 黃酸 1 ml 및 메탄올 1 ml 를 加하고 生成되는 methylnitrite(CH₃ONO, bp. -12°C)를 除去하기 爲하여 約 3 分間 空氣를 通한다. 이 方法은 100 ppm

의 共存亞窒酸이온을 完全히 除去할 수 있는 效果의인 方法이다.

4. 結 論

30 N 黃酸을 使用하여 發熱로 因한 發色の 不安定性을 적게 함으로써 60°C 물중당中에서 30 分間 加熱할 때 安定된 發色을 얻을 수 있고 한시간 정도 安定하며 이 反應系에서 吸光種의 數는 하나이다.

다른 brucine 法들은 溫度條件이 까다롭다던지 經時變化가 크다던지 또는 眞한 黃酸을 使用하여야 하는 등의 缺點이 있어서 特別히 多數의 檢液을 一時에 定量할 때 큰 지장이 있다.

이에 反해서 本法은 黃酸의 濃度 30 N, 加熱溫度 60°C 및 加熱時間 30 分等 實驗條件이 適當하고 安定性, 再現性이 良好하며 또 妨害되는 陽이온들은 이온交換樹脂法으로, 亞窒酸이온은 메탄올로서 除去할 수 있음으로 天然水中의 窒酸이온을 定量하는데 適合한 方法이다.

References

1. E. M. Chamot and D. S. Pratt, *J. Amer. Chem. Soc.*, **32**, 630(1910).
2. B. Wolf, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **19**, 334 (1947).
3. A.C. Holler and R.V. Huch, *Anal. Chem.*, **21**, 1385(1949).
4. L. N. Winkler, *Chem. Zentr.*, **23**, 454(1899); L. W. Haase, *Chem. Ztg.*, **50**, 372(1926).
5. M. Peech and L. English, *Soil Sci.*, **57**, 167 (1944).
6. C. A. Noll, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 426(1945).
7. A. E. Greenberg, et al., *J. Amer. Water Works Assoc.*, **50**, 821(1958).
8. D. Jenkins and L.L. Medsker, *Anal. Chem.*, **36**, 610(1964).
9. "Standard Methods for the Examination of Water and Sewage," 11th Ed., p.175, American Public Health Association, Inc., New York, 1960.
10. F.L. Fisher, et al., *Anal. Chem.*, **30**, 1972

- (1958).
11. G. Saito, *et al.*, *Japan Analyst*, **20**, 542(1971).
 12. Z. Deyl and M. Effenberger, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **24**, 3763(1959)
 13. R. M. Wallace, *J. Phys. Chem.*, **64**, 899 (1960).
 14. J. C. Sternberg, *et al.*, *Anal. Chem.*, **32**, 84 (1960).
 15. S. Ainsworth, *J. Phys. Chem.*, **65**, 1968 (1961).
 16. R.M. Wallace and S.M. Katz, *J. Phys. Chem.*, **68**, 3890(1964).
 17. D. Katakis, *Anal. Chem.*, **37**, 876(1965).
 18. J. S. Coleman, *et al.*, *Inorg. Chem.*, **9**, 1015(1970).
 19. W.K. Park, *et al.*, *J. Korean Chem. Soc.*, **13**, 401(1969)
 20. K.J. Whang, *J. Korean Chem. Soc.*, **12**, 163 (1968).
 21. a) Y. K. Lee, *J. Korean Chem. Soc.*, **14**, 5 (1970);
b) Y. K. Lee, *ibid*, **16**, 219(1972).
 22. J. B. D. Robinson, *et al.*, *Analyst*, **84**, 635 (1959).