

報 文

指示薬法で得られた浴槽水等の pH 測定結果における水温の影響についての考察

大島 詔

A Study on the Effect of Water Temperature on the pH Measurement of Hot Bath Water Measured by the Indicator Method

OSHIMA Akira

Abstract

The pH is measured using the indicator method during on-site inspections of water supply facilities and bathhouses in Osaka city. Using the values measured by the electrode method as a reference, 73.1% of the pH values measured by the indicator method out of 119 comparable bath water samples were within ± 0.5 error, which was generally a good result, however, the results tended to be biased toward the acidic side. Assuming that this acidic bias is due to the difference in water temperature at the time of measurement, the molar extinction coefficients of phenol red (PR) and bromothymol blue (BTB) were measured at 25°C and 40°C to compare. The difference in molar extinction coefficients observed in PR explained 44% of the detected bias toward the acidic side when the glass electrode method was as the reference, while no difference in molar extinction coefficients itself was observed in BTB. Factors other than the difference of water temperature should be examined in future studies.

Key words: Bromothymol Blue, Phenol Red, Glass Electrode Method, pH, Molar Extinction Coefficient

I はじめに

大阪市の水道施設や浴場施設等への立入検査は大阪市保健所の職員(環境衛生監視員)により実施され、採水される水道水や浴槽水等といった試料は、まずは現場にて指示薬法により pH が測定される。具体的にはフェノールレッド(phenol red, 以下 PR とする)、又はブロモチモールブルー(bromothymol blue, 以下 BTB とする)のいずれかの指示薬と、それに対応する比色板を用いての測定である。ここで浴槽水の pH に関し、浴槽に直接注入される原湯や、原湯の原料となり、又は水温調整の目的で浴槽に直接注入される原水等については pH の水質基準が定められているが、浴槽水自体の pH については規定がない[1]。しかしながら pH は浴槽水の基本的な性状を把握するために必要なため測定され続けてきた。

この指示薬法による pH 測定は器材等を含めても非常に安価であり、それらの試薬にさしたる毒性もなく短時間で測定可能であるので安全簡便であるが、肉眼による比色のために計測値はやや主観的な側面がある。そして現場で採取され、pH が測定された試料は必要に応じて著者の所属する大阪市立環境科学研究センターに搬入され、例えば濁度や全有機炭素(TOC)量、一般細菌数や大腸菌群数といった行政検査が実施されるが、こ

でも現場と同様に参考としてガラス電極法(以下電極法と称す)により pH が並行測定されてきた。電極法は機械本体と脆いガラス薄膜を有する電極を必要とすることから指示薬法よりもややコストを要し、水道施設や浴場施設等の現場で使用し、万が一破損した場合は危険であるが、計測値は数値で得られるので機器が適切に管理されている限り個人差は生じないと考えられる。

これらの特性を踏まえ、2020 年から 2023 年までに測定された浴槽水の pH を電極法による測定値を基準として比較したところ、指示薬法で得られた値の大半は ± 0.5 の誤差範囲に収まり両者の対応関係は比較的良好であったが、詳細に見比べると指示薬法では若干酸性側に偏って計測される傾向にあることがわかった。本研究ではこの酸性側へ偏向する原因は現場において試料が 40°C 程度の高水温下で指示薬法により測定された値と、25°C へ温度補正されたガラス電極法での計測値と比較したことによる影響ではないかと考え、pH を 6.0 から 8.5 まで段階的に変化させたリン酸緩衝液に PR、又は BTB を滴下し、水温 25°C と 40°C の場合でモル吸光係数を観測し、その差分による説明を試みた。その結果、部分的ではあるものの指示薬法で酸性側へ偏向する原因を水温による影響として説明することができたため、ここで報告するものである。

II 方法

1) 試料採取と pH 測定の方法

今回 pH 比較の対象とした試料は 2020 年 6 月から 2023 年 2 月までの間に大阪市保健所職員が採水し当研究センターに搬入された浴槽水試料のうち、現場において pH が測定され、かつ搬入された試料量が十分に電極法による pH 測定が可能であったものとした。試料は、遅くとも採水当日の午後 5 時頃までには搬入された。現場における pH 測定は指示薬法でなされ、スチロール樹脂製キュベットに 20 mL の試料を入れ、直ちに pH 指示薬である PR、又は BTB を適量滴下および混和し、周辺光を透過させた状態で比色板と比色し、肉眼で pH 値が読み取られた。比色板の pH 値の刻みは PR、BTB ともに 0.2 であった。現場では使用する指示薬が使い分けられていたが、聞き取りしたところ、まずは PR から試し、PR の測定可能下限値未満となる黄色となった場合に指示薬を BTB に切り替えて再測定する職員が多いとのことであった。当研究センターでは理化学項目用として試料が搬入された当日に速やかに pH を測定した。pH の測定方法は電極法で、試料をスターラーでゆっくりと攪拌しながら pH メータ(HM-26S, TOA DKK、又は MM-43X, TOA DKK)を用いて水温 25℃ への補正值を測定および記録した。なお、日々の測定前には市販の pH 7 と pH 9 標準液を用いて機器校正した。

2) pH 指示薬のモル吸光係数の測定方法

pH が 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 および 8.5 の 100 mM リン酸緩衝液を準備し、ここに最終濃度が 0.1 $\mu\text{g/L}$ となるように BTB、又は PR を添加してモル吸光係数測定用の試料を得た。これらの試料を 50 mL ポリスチレン製スピッツチューブに入れ、ウォーターバスで 25℃、又は 40℃ となるように温度調整した後、分光光度計(V-730, 日本分光)と光路長 50 mm のガラス製セルを用いて波長 750 nm から 360 nm の範囲を 0.5 nm 刻みで吸光度を測定し、各波長におけるモル吸光係数(ϵ)を求めた。その後試料の pH を pH メータ(MM-43X, TOA DKK)で測定し、25℃ に温度補正された pH 値を得た。なお、上述のリン酸緩衝液は目標とする pH に応じて最終濃度が 100 mM となるようにリン酸二水素ナトリウム二水和物とリン酸水素二カリウム十二水和物を適量混合し、前述の pH メータで測定しながら 10 N および 1 N の水酸化ナトリウム溶液を添加して pH 調整し、蒸留水でメスアップすることで調製した。

III 結果

1) 指示薬法と電極法の対応関係

2020 年 6 月から 2023 年 2 月にかけて当研究センターに搬入された検体のうち、現場において指示薬法で pH が測定され、かつ電極法で pH 測定の可能であったもの

は 133 検体であった。内訳は一般浴場 41 検体、温泉水利用施設 44 検体、その他の温泉施設 30 検体、簡易宿泊施設 18 検体である。これら 133 検体を解析対象の試料とし、指示薬法と電極法で得られた pH の関係を図 1 の散布図で示す。ここで現場での pH は 0.2 刻みの測定であり、同値となる結果を多く含むことから単純に描画しただけだと多くのデータが重複し、プロットの粗密が不明瞭となる恐れがある。この現象を緩和するために図 1 の作図にあたっては各データの X 軸、Y 軸の両方向にノイズとして平均 0、標準偏差 0.02 の正規分布にしたがう乱数を加え、プロットが重なりにくくしてある。指示薬法では pH 5.8 から 8.4 の範囲の値が計測され、平均と中央値はそれぞれ 7.74、7.80 であったが、pH 判定時に使用していた試薬については報告はなかった。PR の変色は pH 6.8 以下で黄色、pH 8.4 以上で赤色であり、BTB の変色は、pH 5.8 以下で黄色、pH 7.4 以上で青色、中間の 6.8 前後で緑色となる[2]。光条件にもよるが PR の pH 7.4 以下の部分は黄色の濃さ程度の変化しかなく判別にやや苦慮しがちなことや、現場での pH 指示薬の使用順序からすると pH 決定のために使用する指示薬を切り替える境界はおおむね pH 7.5 で、それより酸性側の値は BTB で、アルカリ性側では PR でそれぞれ測定されたであろうと考えられたので、図 1 には pH 測定に用いたと思われる試薬の境界を太破線で描き加えた。指示薬法では pH 7.5 以上と測定された試料は 103 あり、pH 7.5 未満のものは 30 試料であった。一方、電極法では pH 5.60 から pH 9.10 までの値が測定され、平均と中央値はそれぞれ 7.95、8.00 であった。

ここで電極法と指示薬法の対応関係について検討するために、独立変数(x)を電極法での測定値、従属変数(y)を指示薬法による測定値とし、pH 測定に使用されたとと思われる指示薬ごとに原点を通過する回帰分析を実

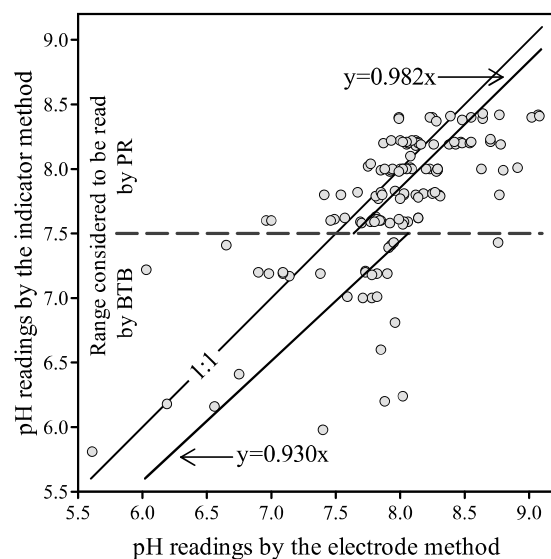


図 1 電極法と指示薬法による pH 測定値の関係

表 1 指示薬法で得られた値の電極法に対する差

Indicator type	n	Difference in pH readings relative to the electrode method						Mean	95% C.I
		<-1.0	-1.0 – <-0.5	-0.5 – <0	0 – 0.5	>0.5 – 1.0	>1.0		
All	119	6	22	53	34	3	1	-0.222	-0.303 – -0.142
PR	89	0	10	49	28	2	0	-0.137	-0.200 – -0.074
BTB	30	6	12	4	6	1	1	-0.473	-0.726 – -0.220

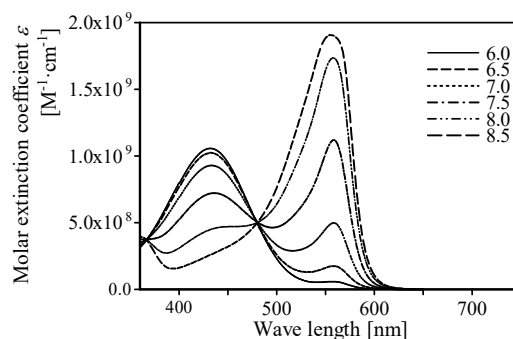
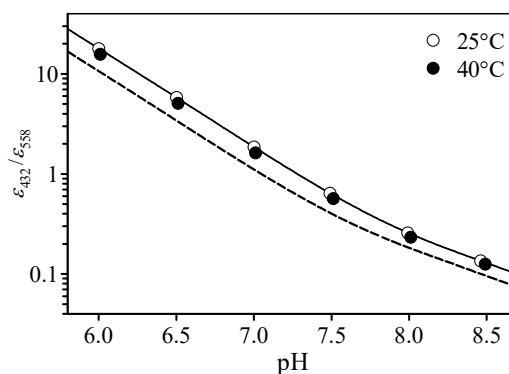
* PR: Phenol Red, BTB: BromoThymol Blue

施した。ただし PR の変色域上限は pH 8.4 であり[2]、指示薬法で pH 8.4 と計測された 14 試料の中には実際には 8.4 を超えるものも含まれると考えられたのでこの回帰分析の対象より除外した。PR による測定と考えられた pH 7.5 以上 8.2 以下の 89 試料に対する分析では $y = 0.982x$ ($n=89$, $d.f.=1$ and 88 , $F=6.452 \times 10^4$, $p<0.001$, $r^2=0.999$) の関係が、そして BTB で測定されたと考えられる pH 7.5 までの 30 試料に対しては $y = 0.930x$ ($n=30$, $d.f.=1$ and 29 , $F=3472$, $p<0.001$, $r^2=0.992$) の関係が得られた。それぞれの回帰直線を図 1 中に描画したが、電極法と指示薬法の結果が一致する 1:1 の対角線に対し、PR で測定されたとされる試料は約 0.1 下方、BTB による測定と考えられるものでは約 0.5 下方に位置し、いずれも指示薬法で値が低く、すなわちより酸性として測定される傾向であった。なお、原点を通過する回帰分析で得られる回帰係数は両者の相関についての強度を必ずしも反映しないので、相関関係を正しく評価するために通常の回帰分析も実施し、PR では $y = 0.349x + 5.103$ ($n=89$, $d.f.=1$ and 87 , $F=34.98$, $p<0.001$, $r^2=0.287$)、BTB では $y = 0.261x + 4.996$ ($n=30$, $d.f.=1$ and 28 , $F=4.588$, $p=0.041$, $r^2=0.141$) の結果を得た。

表 1 は指示薬法で得られた値の電極法に対する差についてまとめたものである。ただし指示薬法で pH 8.4 と測定されたものは除いてある。電極法に対する指示薬法の値が ± 0.5 の範囲に存在したものは全 119 試料のうち 87 試料の 73.1% であった。PR では 89 試料の 86.5% にあたる 77 試料は ± 0.5 の範囲に収まった。ただし電極法と PR を用いる指示薬法間で測定値に差はないとする帰無仮説 H_0 を立てて対応のある t -検定を実施したところ、危険率 0.1% で有意差ありとされ ($t=-4.339$, $d.f.=88$, $p<0.001$)、両者の差 (および 95% 信頼区間) は -0.137 (-0.199 ~ -0.075) と推定された。BTB では電極法で得られた pH 値に対して ± 0.5 の範囲に収まったものは 30 試料中 10 試料の 33.3% で、多くはその範囲を超えて低く測定されていた。PR の場合と同様に対応のある t -検定を行ったところ危険率 0.1% で有意差ありとされ ($t=-3.829$, $d.f.=29$, $p<0.001$)、両者の差 (および 95% 信頼区間) は -0.437 (-0.726 ~ -0.200) と推定された。指示薬法では PR、BTB いずれの試薬を用いた場合においても pH は低く出ることが示された。

2) 水温と PR のモル吸光係数との関係

波長 830 nm から 360 nm の範囲における水温 25℃での PR のモル吸光係数 (ϵ) を図 2 に示す。この図より PR は波長 432 nm と 558 nm に吸光極大を持ち、pH の上昇に伴い波長 432 nm におけるモル吸光係数 ϵ_{432} は減少、波長 558 nm でのモル吸光係数 ϵ_{558} は増加するが、波長 480 nm のモル吸光係数 ϵ_{480} は pH に関わらず不変であることがわかる。したがって pH に対する PR の変色に関与するのは波長 432 nm (青色、補色は黄色) と 558 nm (緑色、補色は赤色) におけるモル吸光係数の変化であると考えられ、それぞれの波長におけるモル吸光係数が大きくなるにつれそれらの補色にあたる色彩が強くなる。ここでは pH 6.0 から pH 8.5 の範囲において鈴木 (2012) [3] を参考に波長 432 nm と 558 nm におけるモル吸光係数比 $\epsilon_{432}/\epsilon_{558}$ を求め、25℃と 40℃の場合で値の違いを比

図 2 各 pH における PR のモル吸光係数 ϵ 図 3 PR の pH とモル吸光係数比 $\epsilon_{432}/\epsilon_{558}$ の関係

較した。その結果を図 3 で示すが、参考として水温 25℃ における $\epsilon_{432}/\epsilon_{558}$ を 0.24 だけ酸性側へ平行移動させた値を破線で描画した。この 0.24 の根拠については後述するが、水温 25℃ と 40℃ の時における $[H^+]$ の差異に基づく。PR の場合、25℃ から 40℃ へ水温が上昇することで $\epsilon_{432}/\epsilon_{558}$ は低下し、すなわちより酸性を意味するモル吸光係数比への変化が見られた。ただしこの変化は pH 7.5 から 8.5 の範囲では約 0.06 の pH に相当する量に過ぎなかった。

3) 水温と BTB のモル吸光係数との関係

水温 25℃ における BTB 溶液のモル吸光係数 (ϵ) を図 4 に示す。BTB は波長 430 nm 付近と 616 nm に吸光極大を持ち、pH が上昇することで 430 nm におけるモル吸光係数 ϵ_{430} が減少し、代わりに 616 nm におけるモル吸光係数 ϵ_{616} が増加することがわかる。また、いずれの pH であっても波長 500 nm のモル吸光係数 ϵ_{500} は変わらない。よって BTB の発色を決める要因は波長 430 nm 付近(青紫色、補色は黄色)、616 nm (橙色、補色は青色) におけるモル吸光係数の変化であると考えられるので、PR の時と同様に吸光極大の見られた波長 430 nm と 616 nm におけるモル吸光係数比 $\epsilon_{430}/\epsilon_{616}$ を求め、25℃ と 40℃ の場合で値の違いを比較した。その結果を図 5 で示す。図中の破線は PR と同様に 25℃ における pH とモ

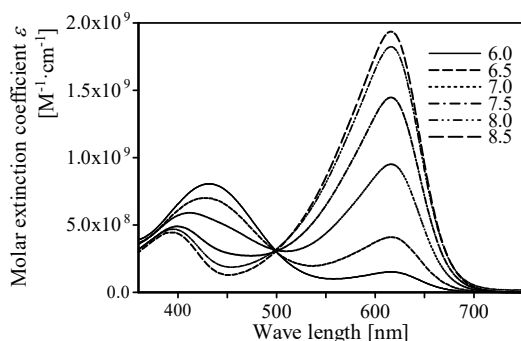


図 4 各 pH における BTB のモル吸光係数 ϵ

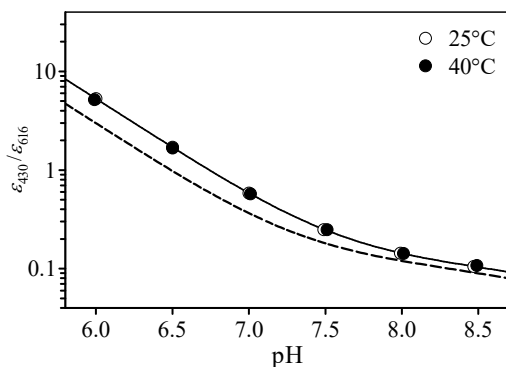


図 5 BTB の pH とモル吸光係数比 $\epsilon_{432}/\epsilon_{558}$ の関係

ル吸光係数比の関係を 0.24 だけ酸性側へシフトさせたものである。BTB の場合は PR とは異なり、25℃ と 40℃ のプロットはほぼ一致し、したがって PR とは異なり温度によるモル吸光特性の違いは見られなかった。

IV 考察

現場で得られた指示薬法による pH と当研究センターで得られた電極法による pH との関係では、通常、回帰分析では PR で $r^2=0.287$ 、BTB で $r^2=0.141$ の低い回帰係数にとどまったが、半ば経験的ではあるが、指示薬法で測定された結果のうち電極法での値に対して ± 0.5 の誤差範囲にあったものは 73.1% を占め(表 1)、全体としておおむね信頼できる値が得られていたものと考えられる。ただし指示薬法では電極法と比較し、平均すると PR で -0.137、BTB で -0.473 とより低い値を示す傾向にあり、対応のある t -検定でも酸性側への有意な偏向が認められた。この偏向は図 1 中に示された原点を通過する回帰分析で得られた回帰式からも明らかである。

本研究では指示薬法の結果が酸性側へ偏向するのは水温に起因するものと考えて検証を試みた。通常、電極法による pH 測定では水素イオン濃度 ($[H^+]$) を起電力とする電位差を基に測定されるが、 $[H^+]$ は水温依存のため、25℃ における $[H^+]$ に補正される。そして 25℃ の純水における $[H^+]$ は 1.004×10^{-7} mol/L で定義より pH は 7.00 であるが、水温 40℃ だと $[H^+]$ は 1.732×10^{-7} mol/L まで増加して pH は 6.76 となる。本来 pH が 0.24 低くなることを電極法では温度補正して pH 7.00 と表示する。一方、pH 指示薬もその変色原理は溶液中の水素イオン濃度に依存する。小畠ら(2011)によると PR、BTB はいずれもスルホンステイン族の指示薬であるが、指示薬の分子は変色域を挟みアルカリ性側でプロトン (H^+) が離脱することで吸光特性に違いが生じ、変色する原因としている[4]。ここで保健所職員が立ち入り調査で採水する浴槽水は水温が 40℃ 前後であるため、25℃ の時と比べると水素イオン濃度指数は約 0.24 低い状態であり、このことが指示薬法で測定される pH が酸性側へ偏向する原因ではないかと考えた。

今回の実験で PR と BTB は水温に対してそれぞれ異なる挙動を示した。モル吸光係数の測定結果より、PR では波長 432 nm と 582 nm に吸光極大があり、酸性側では ϵ_{432} が、アルカリ性側では ϵ_{582} のモル吸光係数がそれぞれ増大した(図 2)。PR では 25℃ から 40℃ への温度上昇で測定を行ったすべての pH において $\epsilon_{432}/\epsilon_{582}$ が低下したことで指示薬はより黄色味を帯び、測定値はより酸性側を示す、すなわち水温による影響が生じることが示された(図 3)。そして現場における測定値への影響についてであるが、pH 7.5 から 8.5 の範囲において PR は 25℃ から 40℃ への温度上昇により pH で 0.06 に相当する酸性側への変化を示したのに対し、PR で測定されたと

考えられた 88 試料は平均 0.137 酸性側寄りであったので、指示薬法と電極法の差のうち約半分にあたる 44%が水温の影響で説明されることとなる。一方で BTB では 25℃と 40℃間ではモル吸光係数に差は見られなかった(図 5)。このことから浴槽水の pH 値が BTB を用いて計測した場合に低く報告される点に関しては水温による違いで説明することはできなかった。

なぜ PR では水温 15℃の違いが 0.24 の pH に相当するだけの吸光スペクトルの変化を生じさせないのか、又はなぜ BTB では PR のような温度による吸光特性に違いが生じないのか、これらの考察は他の研究に譲るが、ここでは PR や、殊に BTB で測定値が酸性側に偏って測定される水温以外の要因について検討してみる。例えば、指示薬法では指示薬を溶かしてある溶媒の pH が測定結果に影響する酸塩基誤差の存在が知られている。実際に PR や BTB は溶液そのものが酸性を示す指示薬であり、普通に調製すると pH 4 前後となるようで[4]、誤差要因として十分に考えられるが、職員が現場へ持参する指示薬は、PR はオレンジ色、BTB は緑色であり最初から強い酸性にはなく、特に BTB 使用時における主要な誤差要因とは考えにくい。この他にも pH 指示薬法では塩誤差[5]やタンパク誤差[3]等多くの誤差要因のあることが知られている。それらの物質は浴槽水中にもある程度の量で含まれると考えられ、影響について検討する必要性はある。また、浴槽水には次亜塩素酸ナトリウム等の消毒用塩素が過剰に投入されることもあり、それらの影響を無視することはできない。多くの消毒用塩素は酸化剤でもあり、pH とは関係なく指示薬を酸化させることで誤差を生じさせることが考えられる。少なくとも今回の研究では指示薬法において PR を用いた場合には水温による誤差が生じることを示したが、指示薬法では値

が酸性側へ偏向する現象について未解明な部分もあり、今後の検討課題である。

V まとめ

以上の結果をまとめると本研究の結果は以下の 3 点に要約される

1. 指示薬法で測定された浴槽水の pH を電極法での値と比較すると 7 割以上の試料は ± 0.5 の誤差範囲にあり良好に測定されたが、酸性側への偏向が見られた。
2. 酸性側への偏りを水温による影響として説明しようと試みたところ、PR では偏向のうち 44%が説明された。ただし BTB では水温による影響は見られなかった。
3. 指示薬法において水温以外の酸性側へ偏向する要因については今後の検討課題である。

謝辞 本調査は大阪市保健所の協力の下で実施されたことを記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局長. 公衆浴場における衛生等管理要領等について. 平成 12 年 12 月 15 日生衛発第 1811 号, 最終改正令和 2 年 12 月 10 日生食発 1210 第 1 号 2000.
- 2) 国立天文台. 酸塩基指示薬. 理科年表 2023;539.
- 3) 鈴木優治. 試験紙法による尿 pH 測定のタンパク誤差に関する理論的解析. 分析化学 2012; **61**(19):885-892.
- 4) 小畠りか, 向井知大, 大場茂. 中和滴定と酸塩基指示薬の可視吸光スペクトル. 慶応義塾大学日吉紀要 2011; **50**:77-102.
- 5) 加藤多喜雄. 指示薬. 分析化学 1952; **1**(2):166-168.