

栄養塩分析とそのための標準液の現状

加藤千香子*

(平成19年7月17日受理)

Nutrients analysis and current status relevant standard solutions

Chikako Kato

1. はじめに

海洋中には、魚類や哺乳類、海藻類、動物プランクトン、植物プランクトンなど多種多様な生物が存在している。これらは陸上の生態系と同様に食物連鎖の上に成り立っており、海洋における生物生産の根幹を成すのは、その中で下位に位置する植物プランクトンである。海洋中の植物プランクトンは窒素、りん、けい素を栄養源としている。海洋中では、窒素はアンモニウムイオン(NH_4^+)、硝酸イオン(NO_3^-)および亜硝酸イオン(NO_2^-)として、りんはオルトリン酸イオン(PO_4^{3-})として、けい素はけい酸イオン(SiO_3^{2-})としての形態を主に取って溶存している。これら5種の無機塩は海洋中の動植物の栄養源となっているため、一般に栄養塩と呼ばれ、海洋中の生態系の制御因子として重要な機能を持っていると考えられている。

栄養塩濃度が過度に増加すると、海洋中のプランクトン類の異常増殖を引き起こす要因となってしまう。これが我々の目に見える形で現れたものが、水質汚濁として世間を騒がせたアオコや赤潮である。これらが動物や人間社会に影響を与えたように、栄養塩の供給によって、植物プランクトンの増減をはじめ海洋中および陸上の生態系が制御される。従って、漁業生産のみならず地球環境の観点からも、生態系に関わる物質の循環に関する研究は非常に重要であり、植物プランクトンを取り巻く環境における栄養塩の挙動に関心が持たれている^{1)~4)}。栄養塩の挙動を追跡するためには地球規模にわたる物質の循環を見る必要があり、栄養塩の濃度測定は全世界で行われている。

栄養塩の濃度測定を行う上で、常に問題として取り上げられるのが、測定値に対する信頼性である。言い換えると、『いかにして質の良い測定値を得るか』ということ

が問題になる。多くの場合、得られた測定値の質を決定するのは計測における標準物質によるトレーサビリティの確保であると言える。栄養塩海水標準物質は、海洋分析における測定値の精確さを確保する上で非常に重要な役割を果たすと考えられ、海水分析を行う上で信頼できる標準物質の供給への強い要求がある⁵⁾。そこで本調査研究では、質の高い栄養塩海水標準物質の供給を行うために、海水中の栄養塩の分析の現状調査と、各イオンの一次標準液の現状調査、評価および再検討を行った。また、実海水中の栄養塩濃度測定法について調査を行ったので報告する。

2. 海水中の栄養塩の分析の現状

2.1 栄養塩分析の起源

海水中の栄養塩の分析は、古くから行われている。1900年代初頭、ヨーロッパのバルト海沿岸国の大規模な工業化・都市化による深刻な海洋汚染が引き起こされ、閉鎖的海洋であるバルト海が赤潮の甚大な被害に侵されたことが起点であろう。赤潮の原因究明と解決のために海洋分析が行われ、海水に含まれる栄養塩の濃度にも関心が向けられた。しかし、適切な栄養塩海水標準物質が整備されていなかったために、栄養塩の濃度測定の再現性を確保することができず、栄養塩濃度の長期的な変動の追跡は困難とされてきた⁶⁾。長い時間軸や全世界の海洋という広範囲な領域にわたって、同一の条件下で測定が行われるためには、測定対象のイオンが安定に存在する栄養塩海水標準物質が必要である。栄養塩海水標準物質の現状と、測定者同士の整合性を確認する試みといえる国際比較の歴史について述べる。

2.2 要求される精度と精確さ

海水中の栄養塩濃度の測定において、測定精度は0.2%、精確さは1% - 2%が必要とされている⁶⁾。またWOCE (World

* 計測標準研究部門 無機分析科

Ocean Circulation Experiment; 世界海洋循環実験計画)の海洋観測プログラムで提示されている公称の目標値は、測定対象とする栄養塩によって異なり、けい酸イオン、硝酸イオン、りん酸イオンで、測定の精確さはそれぞれ3%、1%、1%–2%、測定精度はそれぞれ1%、1%、1%–2%とされている(亜硝酸イオンに関する規定はされていない)。しかし一方でいくつかの研究所では、研究室室内精度として日常的にその10倍(つまり0.1%の桁)の精度が求められている⁴⁾。従ってこの条件を満たす測定を行うためには、栄養塩海水標準物質の各濃度はそれと同等またはそれ以上の精確さを達成することが必要である。従って、その製造に必要な各イオンの一次標準液は0.1%の桁での測定精度と精確さで調製されることが目標である。

2.3 栄養塩海水標準物質の現状

海水中の栄養塩類の測定においては、通常測定対象イオンを含有する標準液との比較によって濃度決定が行われている。従って、比較に用いる標準液の品質や濃度の不確かさは、測定値の不確かさに影響を与えてくる。

海水栄養塩の測定に用いられるマトリックス系標準物質には2種類ある。一つは塩類組成が海水と類似している人工海水標準物質、もう一つは天然海水に滅菌処理等を施して値付けを行った天然海水標準物質である。前者の例では、ICES (International Council for the Exploration of the Sea; 海洋探査国際委員会)が主催した第3回国際相互校正において測定試料として配布された、相模化学研究所のCSK (Cooperative Study of the Kuroshio and Adjacent Regions; 黒潮および隣接水域共同調査)標準液がある^{4), 6), 7)}。この標準液は、硝酸イオン、亜硝酸イオン、りん酸イオンがそれぞれ個別の標準液として調製され、別々の瓶で提供されている。硝酸イオンとりん酸イオンの標準液は人工海水を用いて調製されているが、亜硝酸イオンは純水を用いて調製されているので、亜硝酸イオンの測定では海水マトリックスの影響に関して適切な補正が必要である⁶⁾。この標準液は国内外の研究室による共同実験法で各イオンの濃度決定が行われたので、その共同実験を通じて研究室間の濃度の一致を確認するのに非常に有効であった。

後者の例では、VKI (Water Quality Institute; デンマーク水質研究所)から頒布されたVKI栄養塩海水標準物質がある^{8)–10)}。これは1993年に行われた3研究室での比較測定において試料として用いられた。カテガット海峡、バルト海の2地点で採水された2種類の天然海水をろ過(1.6 μm)した後、オートクレーブによる滅菌処理を行い、塩

酸を用いてpH 7.0–8.0に調節して用いている。この標準物質はデンマークをはじめとするバルト海域の海水濃度範囲は網羅していたが、デンマーク以西の北海の海水濃度レベルには十分ではなかった。また共同実験法を用いて濃度決定が行われたが、研究室間の標準偏差は非常に大きく、特にアンモニウムイオンでは14%もの値であった⁸⁾。

近年調製された天然海水標準物質に、NRCカナダ(National Research Council of Canada)から頒布されている栄養塩海水標準物質MOOS-1がある¹¹⁾。この標準物質には北大西洋の水深200 mで採水された実海水試料が用いられている。採水後0.05 μm のフィルタでろ過し、ガラス容器に保存して研究室へ持ち帰った後に均質化され、 γ 線照射による滅菌処理が施された。MOOS-1の候補標準物質の栄養塩濃度の決定には共同実験法が採用された。この共同実験は2002年にNOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration; 米国立海洋大気庁)の後援のもと、NRCカナダが主催する国際比較として行われ、各研究室にMOOS-1の候補標準物質が試料として配布された^{5), 11)}。提出された各研究室の結果を平均して認証値が決定された。与えられた認証値を表1に示した。MOOS-1の認証値に付与された拡張不確かさの値は、上述したVKI栄養塩海水標準物質よりは小さくなったものの、認証された4成分はどれも栄養塩測定における最も厳しい要求と比べると依然として大きい値である。特にりん酸イオンでは大きく、4.5%もの値を取る⁵⁾ため、不確かさの縮小が求められる。また、太平洋域の海水の栄養塩測定の観点から見ると、MOOS-1に含有される硝酸イオン、けい酸イオンの濃度は低く、濃度範囲の拡大の要求もある⁵⁾。

これらの要望を踏まえて、株式会社関西総合環境センターと気象研究所によって天然海水を用いた栄養塩海水標準物質の調製が進められてきた⁵⁾。この標準物質はオートクレーブした天然海水を用いて混合条件によって6種類の濃度に調製された。調製濃度範囲は太平洋の海水濃度への対応を考慮に入れて決定された(表2)。そのうち1種類を取り上げ、30本の試料を独立に測定して試料の均質性と分析精度の評価が行われた。硝酸イオン、亜硝酸イオンおよびけい酸イオンの均質性は、分析精度と比較しても満足な値が得られたが、りん酸イオンに関しては、分析精度に比べて試料の均質性の分散は大きい値(0.80%)を示した。この栄養塩海水は2003年に行われた気象研究所主催の国際比較の試料として用いられた。

現在、株式会社環境総合テクノス(前出の関西総合環境センター、事業統合に伴い平成16年に商号変更)からは参照物質として天然海水標準物質が販売されている^{12), 13)}。こ

表1 MOOS-1の栄養塩濃度の認証値¹¹⁾

	認証値 (μmol/L)	RSD
NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻	23.7 ± 0.90	3.8%
NO ₂ ⁻	3.06 ± 0.15	4.9%
SiO ₃ ²⁻	26.0 ± 1.00	3.8%
PO ₄ ³⁻	1.56 ± 0.07	4.5%

* ± に続く値は認証書に記載されている拡張不確かさ ($k = 2$) を表す

表2 気象研究所による栄養塩海水標準物質の濃度⁵⁾

	濃度 (μmol/L)	RSD
NO ₃ ⁻	0 — 38	1.0%
NO ₂ ⁻	0 — 0.9	2.2%
SiO ₃ ²⁻	0 — 136	1.7%
PO ₄ ³⁻	0 — 2.7	3.5%

の標準物質は表層海水と深層海水の混合比を変化させて希望の栄養塩濃度としているもので、対象試料濃度に応じてある程度の濃度範囲に対応が可能な点から、より実分析に即した栄養塩海水標準物質として用いることができる。

2.4 海水栄養塩分析の国際比較

海水栄養塩分析の国際整合性の確認や、栄養塩海水標準物質の共同実験法による濃度決定などを目的として、これまでに行われた8回の研究室間比較や国際比較を以下にまとめた⁵⁾。

1965年にICESが主催して海水試料測定のための最初の国際的な相互比較が3か国間で行われた。深刻なバルト海汚染が契機となり、コペンハーゲンにフィンランド、ドイツ、スウェーデンの3隻の研究船が集まった。3隻それぞれが実験用の海水試料を採取し、そのまま船上にて抽出・測定を行った。測定項目は、酸素量、塩分、塩素量、アルカリ度、りん酸イオンであった。栄養塩と称される無機陰イオンのうちりん酸イオンの共同測定が初めて行われた。1966年には海水の化学分析の国際比較に関するICESワーキンググループの前身が新たに発足し、ICES第2回国際相互比較が開催された。Part 1は5月にロシアのレニングラードで開催された第5回バルト海洋学者委員会の会期中に行われた。ドイツは2隻、ロシア、スウェーデンからは各1隻ずつの研究船が集まり、海水試料を採取して各研究室へ輸送した後、溶存酸素、塩分、塩素量、pHおよびりん酸イオンの測定が行われた。Part 2は9月にコペンハーゲンで開催された第54回ICES法定会議と共に行われた。参加国はバルト海沿岸国とノルウェーおよ

びイギリスで、各国の研究船で海水試料を採取した後輸送し、コペンハーゲンで参加国が同時に測定を行った。測定項目は溶存酸素、塩分、塩素量およびりん酸イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、けい酸イオンの各濃度であった。

海水の化学分析に関するICESワーキンググループが主催するICES第3回国際相互比較が1969年から1970年にわたって行われ、20か国45研究室が参加した。最終結果報告は1977年にまとめられた。天然海水の不安定性が危惧されたので、相模化学研究所が調製した人工海水標準液（前述したCSK標準液）が試料として採り上げられ、各研究室で分析が行われた。この比較では栄養塩測定が単独で行われた。しかし、測定精度は全体的に悪い結果を示した（特にりん酸イオン、硝酸イオン）ため、配布されたCSK標準液の均質性が問題として挙げられた。

ICES第4回国際比較は1988年にICES海洋化学ワーキンググループの主催で行われ、ICES加盟国のみで22か国69研究室が参加した。参加研究室のうち58研究室がりん酸イオンを、51研究室が硝酸イオンを分析し、そのうち48研究室がりん酸イオン、硝酸イオン両方を分析した。この国際比較では、天然海水を試験用試料として扱った点、参加国はブランク試料が含まれることを知らされていない点、匿名性を廃止した点がこれまでとは異なっていた。

続いて1993年に、同じくICES海洋化学ワーキンググループ主催で第5回国際比較が開催された。参加国は欧米中心に132研究室（うち前回の国際比較参加国61か国、QUASIMEME (Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe) 所属国56か国）であった。この国際比較では、3種類の濃度の試料を配布し、前回の国際比較よりも広い濃度範囲（大西洋の濃度レベルを考慮した範囲）で行われた。

さらに2000年にはNOAAの後援のもと、NRCカナダの主催でNOAA/NRC intercomparison in 2000が開催され、30研究室の参加があった。NRCカナダのMOOS-1の候補標準物質2本が試料として配布され、異なる測定法で2組の結果が要求された。しかし、得られた結果の標準偏差は大きく、目指した精度は得られなかった。試料の均質性が問題視された。そのため、2002年にMOOS-1の候補標準物質を試料とした2度目の国際比較であるNOAA/NRC intercomparison in 2002が行われ（前出）、24研究室が参加した。この国際比較では、測定方法は限定されていなかったにも関わらず、全研究室が比色法を用いて結果を提出した。各研究室の値は平均値の±10%の範囲にまとまっており満足な一致が得られたため、問題として挙げられていた配布試料の均質性は問題ないとの結論に至っ

た。しかし、りん酸イオンだけは標準偏差が大きく、良い測定精度が得られなかった。

2003年には気象研究所によってMRI intercomparison in 2003が開催され、5か国17研究室が参加した。オートクレープで滅菌した6つの濃度の天然海水が試料として配布された。この国際比較では、研究室内の測定精度は非常に良い結果を示した反面、研究室間での標準偏差が大きい値を示した(りん酸イオン、けい酸イオンの均質性がそれぞれ0.80%, 0.15%であるのに対し、研究室間標準偏差は3.5%, 1.7%で、それぞれ4.5倍、11倍の値を示した)。各研究室の組織内標準の相違が問題として挙げられ、国際整合性と組織間比較可能性の確立のためには、海水認証標準物質の提供が必要不可欠であると結論付けられた。2005年にも同研究所が主催する国際比較が開催され、現在結果報告がまとめられている段階である。

ところで、この分野の国際比較はこれまで海洋学分野の専門機関の間で行われていたが、2007年には、メートル条約の下でCCQM(Consultative Committee for Amount of Substance; 物質質量諮問委員会)が主催する、栄養塩に関する国際比較が実施された。すなわち、標準研究所の硝酸イオン、亜硝酸イオンの定量のための能力の確認を目的として、NRCカナダとSMU(Slovak Institute of Metrology)の2研究所が幹事を務め、天然海水試料中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの定量に関する国際比較CCQM-P89が行われた。計量標準総合センター(NMIJ)もこの国際比較に参加した。現在、NRCカナダとSMUが結果報告をまとめている段階である。

3. 栄養塩に関する一次標準液の現状

3.1 概要

要求された不確かさの範囲をもつ栄養塩海水標準物質の供給を行うためには、トレーサビリティの取れた正確かつ精密な海水栄養塩の定量が求められる。栄養塩海水の候補標準物質に含まれる各イオンの濃度は、各イオンの単一の標準液との比較によって得られる。各イオンの一次標準液の不確かさが大きい場合には、海水中の栄養塩の定量値の不確かさに直接影響を与える。そこで、各イオンの一次標準液の現状を調査した。

3.2 一次標準液の開発

一次標準液の開発は図1のようなプロセスを経て行われる。最初に原料物質の純度評価が行われる。原料物質は、吸湿性や安定性、溶解方法などを考慮した上で、純度の良いものを選定する。次に、含有水分除去のための

乾燥条件を検討する。試料が恒量になる条件で乾燥温度、乾燥時間を決定する。高温、長時間の加熱は試料の分解を引き起こす恐れがあるため、注意が必要である。その後原料物質の純度評価を行う。純度の測定には可能な場合には一次標準測定法が用いられる。CCQMでは、『一次標準測定法は最高の計量学的な質を有し、その操作が完全に記述され、理解され、かつ不確かさがSI単位を用いて完全に記述される方法(したがって、その結果は測定される量の標準を参照せずに承認できる)』¹⁴⁾と定義している。現在一次標準測定法としては、同位体希釈質量分析法、電量分析法、重量法((a)質量比混合法 (b)重量分析法)、滴定法、凝固点降下法の5つが挙げられている。この中で、無機標準液の測定には主に、以外が用いられている。これらの方法を用いて原料物質の純度を決定する。原料物質の均質性と保存安定性の確認を行い、原料物質としての妥当性を検討する。

続いて、原料物質の溶解方法を検討する。溶媒には水、希硝酸など様々なものが考えられるが、できるだけマトリックスの影響が小さくなる溶媒が好ましい。原料物質が難溶性の場合は、るつぼを用いた溶解等を行うこともある。質量比混合法によって原料物質の溶解を行う。調製した溶液の保存安定性の検討を行うため、調製した溶液を容器に小分けして冷蔵、常温下でそれぞれ保存を行う。蒸発による濃度変化を避けるために、気密性の良い容器を用いる。短期から長期に渡って保存溶液の蒸発や試料の変質を追跡する。

その後、濃度測定が行われる。測定の繰り返し精度などは、不確かさの大きな要因となるため、繰り返し性のよい方法を選択する必要がある¹⁵⁾。適切な既存手法が存在しない場合は、新規法の開発も必要である。

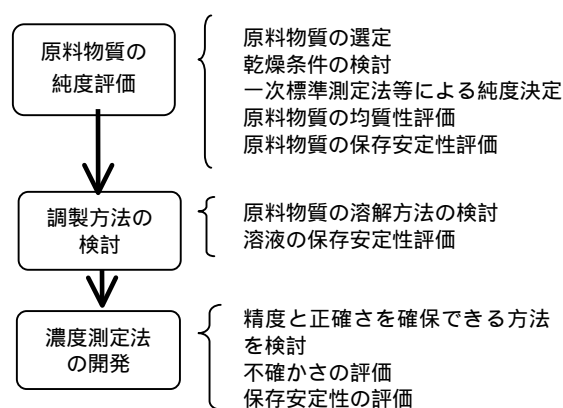


図1 一次標準液の開発フロー

3.3 硝酸イオン標準液

3.3.1 頒布状況

現在，化学分析用としてJCSSの硝酸イオン標準液が，関東化学，和光純薬工業によって市販されている．どちらも1000 mg/L (合成標準不確かさ0.35 %)である．また，NIST (National Institute of Standards and Technology; 米国標準技術研究所)からはStandard Reference Material (SRM) 9185として硝酸イオン標準液が頒布されている．認証値は976 mg/kg $\pm$ 6 mg/kg (拡張不確かさ0.61 %, $k = 2.00$)である¹⁶⁾．KRISS (Korea Research Institute of Standards and Science; 韓国標準科学研究院)からはCRM No. 105-04-NO2として998.3 mg/kg $\pm$ 5.0 mg/kg (拡張不確かさ0.5 %)の濃度で頒布されている¹⁷⁾．

3.3.2 原料物質と調製法

原料物質には硝酸カリウム(KNO_3)^{3), 4), 18), 19)}あるいは，硝酸ナトリウム(NaNO_3)^{11), 16), 17)}が用いられている．どちらも吸湿性を有し，試料中の水分を除去するために乾燥が行われる．乾燥温度と時間は105 °Cで一晩²⁰⁾，110 °Cで2時間¹⁶⁾または130 °C $\pm$ 5 °Cで4時間^{18), 19)}などが採用されている．硝酸ナトリウムは硝酸カリウムよりも高い吸湿性を有するため，硝酸カリウムの使用が適していると思われる．

純度決定法として，NMIJ，NISTでは一次標準測定法のうち重量分析法が採用されている．硝酸ニトロ重量分析法¹⁹⁾，硫酸カリウム変換法²¹⁾が用いられている．前者は，ニトロと硝酸イオンとの反応を利用したもので，生成した硝酸ニトロの結晶の質量測定によって硝酸イオン量を算出する¹⁹⁾．この方法では純度99.71 % $\pm$ 0.07 % (質量分率)等が得られている．後者は，硝酸カリウムと濃硫酸の反応によって硫酸カリウムへの変換を行う．沈殿の質量測定から計算したカリウムの質量を用いて間接的に硝酸イオン量を決定する²¹⁾．この方法はNIST SRM193高純度硝酸カリウムの純度決定法として用いられている²¹⁾．

乾燥した原料物質を，質量比混合法を用いて純水に溶解し，標準液を調製する．溶解した後，ろ過(0.22 μm フィルタ)を行い，不溶物を除去する場合もある²⁰⁾．また，生物活性を落とすために標準液1 Lに対して1 mLのクロロホルムを加える場合もある³⁾．この標準液は，冷暗所保存によって少なくとも6ヶ月間の安定性を有するという報告がある^{3), 4)}．

調製した標準液の濃度測定法には，主な手法としてイオンクロマトグラフ法が用いられている¹⁶⁾．

原料物質として硝酸ナトリウムを用いたNISTとKRISS

の硝酸イオン標準液では，認証値に付与された拡張不確かさ(それぞれ0.61 %, 0.5 %)は比較的大きい^{16), 17)}ので，より小さい不確かさの標準液が望まれる．

3.4 亜硝酸イオン標準液

3.4.1 頒布状況

現在，化学分析用としてJCSSの亜硝酸イオン標準液が，関東化学と和光純薬工業によって市販されている．どちらも1000 mg/L (合成標準不確かさ0.35 %)の濃度である．またFLUKAからNISTにトレーサブルと称するイオンクロマトグラフ用亜硝酸イオン標準液が頒布されている．

3.4.2 原料物質と調製法

原料物質として検討されているのは亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)のみである^{3), 4), 18), 19)}．この物質は吸湿性，潮解性を有するため，乾燥による水分除去が必須である．105 °Cで2時間²²⁾，110 °C $\pm$ 5 °Cで2時間^{18), 19)}などの乾燥を行った後に用いられる．亜硝酸ナトリウム以外を原料物質に用いた例は見つからなかった．

純度評価法には，硝酸ニトロ重量分析法が用いられている¹⁹⁾．この方法は，亜硝酸イオンを酸化して硝酸イオンとした後，3.3.2と同様に結晶を析出させるもので，純度99.57 % $\pm$ 0.09 % (質量分率)が得られている．主な不純物は硝酸ナトリウムであった．

乾燥した原料物質は，質量比混合法を用いて純水に溶解して調製する．生物活性を落とすために標準液1 Lに対して1 mLのクロロホルムを加える場合もある^{3), 4)}．この標準液は，冷暗所保存を行うことで少なくとも3ヶ月の安定性が得られている³⁾．

調製後の標準液の濃度測定法には，イオンクロマトグラフ法が主な手法として用いられている¹⁸⁾．

3.5 アンモニウムイオン標準液

3.5.1 頒布状況

現在，化学分析用としてJCSSのアンモニウムイオン標準液が，関東化学，和光純薬工業によって市販されている．どちらも1000 mg/L (合成標準不確かさ0.35 %)である．MerckからはNIST SRM 999a KClにトレーサブルと称するアンモニウムイオン標準液(後述)が1000 mg/L $\pm$ 2 mg/L (拡張不確かさ0.2 %)の濃度で市販されている．また，FLUKAからもNISTトレーサブルと称する，クロマトグラフ用のアンモニウムイオン標準液が市販されている．

3.5.2 原料物質と調製法

原料物質には塩化アンモニウム (NH_4Cl) が用いられている²³⁾。減圧下50 で6時間乾燥した後に用いられている²³⁾。この物質は吸湿性を有するため乾燥は必須である。実験室での一般的な利用には105 – 110 での乾燥が行われている。熱による塩化アンモニウムの分解を念頭に置き、過剰な加熱による分解を引き起こさないように留意する必要がある。

塩化アンモニウムの純度評価法としては、JIS K 8116 にホルムアルデヒドを添加してアルカリを用いる中和滴定が定められている²⁴⁾。この規格では次のような操作が行われる。JIS K 8872に規定するホルムアルデヒド液25 mL に水50 mLを加え、フェノールフタレイン溶液を指示薬として0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液で中和した後、0.1 mgの桁まで量り取った試料1.5 gを加えて溶解する。次にビュレットを用いて1 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加えて1時間放置した後、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液で滴定を続ける。液の色が無色から紅色に変わる点を終点とし、純度を決定する。JISではこの方法を用いて試薬としての塩化アンモニウムの純度99.5 %以上を規定している。この方法は操作が簡便であるが、ホルマリンは空气中で酸化されて遊離酸を形成するので注意が必要である²⁵⁾。また、次亜臭素酸イオンとの酸化還元反応を用いた電量滴定²³⁾や、塩化カリウムを一次標準とした銀滴定によって塩化物イオン量を決定し、アンモニウムイオン量を算出する方法がある (FLUKAのNISTトレーサブル標準液のアンモニウムイオン量決定法から)。

標準液は、質量比混合法を用いて乾燥後の原料物質を純水に溶解して調製する。濃度測定法には、イオンクロマトグラフ法が用いられている²⁶⁾。

3.6 りん酸イオン標準液

3.6.1 頒布状況

化学分析用としてJCSSに基づくりん酸イオン標準液が、関東化学、和光純薬工業によって市販されている。どちらも1000 mg/Lの濃度である。またNISTからはSRM3186としてりん酸イオン標準液が頒布されている。認証値は1001 mg/kg $\pm$ 3 mg/kg (拡張不確かさ0.3 %) である²⁷⁾。また、KRISSからはCRM No.105-04-PO2が1000.5 $\pm$ 5.0 mg/kg (拡張不確かさ0.50 %) の濃度で頒布されている²⁸⁾。

3.6.2 原料物質と調製法

原料物質にはりん酸二水素カリウム (KH_2PO_4)^{3), 4), 29)} もしくはりん酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4)²⁸⁾ が用いられる。110 で2–4時間³⁾、120 で2時間³⁰⁾などの乾燥を

行った後に用いられる。

JIS K 9007りん酸二水素カリウム³¹⁾の純度試験の項では、110 で乾燥した試料に対して、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液、および1 mol/L塩酸を用いて電位差滴定が行われる。りん酸二水素ナトリウムは吸湿性が高く乾燥減量が大きいので、りん酸二水素カリウムが用いられている。

乾燥後の原料物質を、質量比混合法を用いて純水に溶解して標準液を調製する³⁾。調製された標準液は褐色ガラス瓶等に移し、冷暗所で密栓保存する場合や^{3), 4)}、生物活性を落とし保存性を向上させるために、標準液1 Lに対して1 mLのクロロホルム^{3), 4)}、もしくは4.5 mol/Lの硫酸2 mLを添加する場合もある³⁾。調製した標準液は少なくとも6ヶ月間の安定性が確認されている³⁾。

3.7 けい酸イオン標準液

3.7.1 頒布状況

けい素のJCSS標準液は未開発であるため、迅速な開発が望まれる。NISTからはSRM3150としてけい素標準液の頒布が行われており、認証値は9.34 mg/g $\pm$ 0.04 mg/g (拡張不確かさ0.43 %) である³²⁾。KRISSからはCRM No.105-02-SI2けい素標準液 (0.1 % HCl) が頒布されている。認証値は997.6 mg/L $\pm$ 5.2 mg/L (拡張不確かさ0.52 %) である³³⁾。

3.7.2 原料物質と調製法

原料物質にはヘキサフルオロけい酸二ナトリウム (Na_2SiF_6)、無水けい酸ナトリウム (Na_2SiO_3)、高純度二酸化けい素 (SiO_2) が用いられている。

ヘキサフルオロけい酸二ナトリウムは、ニッケルるつぼやテフロンビーカー中で105 で2時間以上乾燥させた後に用いられている^{3), 4)}。デシケータ中で保存し、これを純水に溶解して標準液を調製する。溶解には1–2日を要するため、長時間放置または超音波攪拌によって完全に溶解した後に用いる。保存にはポリエチレン容器を用い、密栓する。調製した標準液は少なくとも数ヶ月間の安定性が得られている^{3), 4)}。またNISTとKRISSでは原料物質として無水けい酸ナトリウムが用いられており^{32), 33)}、純水または0.1 %塩酸に溶解して標準液の調製が行われている。また、高純度二酸化けい素を精秤し、110 で4–5時間乾燥後、白金るつぼ中でアルカリ融解して、生じたけい酸ナトリウムを水に溶解する方法もある³⁴⁾。この方法では技術の熟練を要するが、純粋なけい酸ナトリウムが得られるので非常に有効である。この溶液は純水系または水酸化ナトリウム水溶液系としている場合が多いが、微量のふっ化水素を含む硝酸系や塩酸系として調製

されたものもある。けい酸イオン溶液の調製では全ての過程においてガラス器具を用いてはならない。

濃度測定法にはICP-OES法が用いられている³³⁾。

3.8 現状に対する課題

各イオンの一次標準液の現状について述べてきたが、まずは現在JCSS標準液としては未供給であるけい素標準液の開発を迅速に進める必要がある。NISTやKRISSが原料物質として採用している無水けい酸ナトリウムを用いた標準液調製については、原料によっては溶解残渣が生じるという問題点がある。そこで、二酸化けい素を原料物質の候補として採用し、アルカリ融解によって可溶性のけい酸ナトリウムに変換した後、溶解して標準液を調製する方法を検討していく予定である。

けい酸イオン以外のイオンの一次標準液は、JCSSでは供給済みであるが、特に硝酸イオンの原料物質の純度に関する不確かさを小さくしたいと考えている。前述のニトロン法などの方法とは異なる方法で硝酸イオンの評価法を構築し、硝酸イオン標準液に与えられている拡張不確かさの値をより小さくすることが今後の課題である。

4. 海水栄養塩の濃度測定法

4.1 概要

栄養塩海水標準物質の製造を行う上で、トレーサビリティの取れた正確かつ精密な測定を行うためには、各イオンの一次標準液の拡充整備とともに、海水試料の適切な前処理と、適切な測定再現性や繰り返し性を有する濃度測定法を用いる必要がある。これまでに海水栄養塩の測定手法として用いられてきた吸光光度法、連続流れ分析法について、また最近海水への応用が行われているフローインジェクション分析法、キャピラリーゾーン電気泳動法、イオンクロマトグラフ法について、各手法の概要と特徴をまとめ、濃度測定法としての可能性を検討する。

4.2 吸光光度法

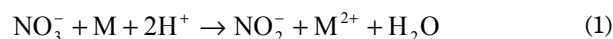
吸光光度法は海水中の栄養塩濃度定量のために古くから広く用いられてきており、現在もなお最も一般的に用いられる検出法である^{3), 4)}。分析対象イオンを試薬と反応させることで、極大吸収の大きい物質に変換する。光が溶液中を通過する際には、溶液に含まれる溶質濃度と透過距離に比例した吸収が起こる（ランベルト・ベールの法則）ことを利用して、試料溶液に対する光の透過率から分析対象イオンの濃度を決定する方法である。各イ

オンの測定法と特徴について述べる。この方法は後述する連続流れ分析法やフローインジェクション分析法の検出法としても用いられている。

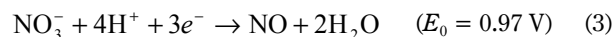
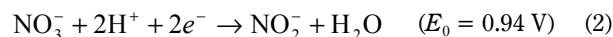
4.2.1 硝酸イオン、亜硝酸イオン

硝酸イオン、亜硝酸イオンの吸光光度法は、Morrisらの方法(1963)³⁵⁾が改良されて現在でも用いられている。亜硝酸イオンとスルファニルアミドとの反応によって、ジアゾニウム塩が形成される。これをナフチルエチレンジアミンと反応させると540 nmに吸収極大を持つ赤色のアゾ色素が生じるので、それを利用して定量を行う。定量範囲は0.02ppm - 0.2ppmである³⁶⁾。硝酸イオンは還元剤を用いて亜硝酸イオンにした後、亜硝酸イオンと同様の反応を用いて間接的定量が行われる。

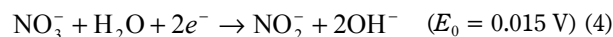
硝酸イオンの還元法には次のような二つの方法がある。一つは触媒存在下での硫酸ヒドロキシルアミンなどの還元剤による還元法^{3), 4)}、もう一つは粒状の金属アマルガム（銅でコーティングした粒状カドミウムなど）との接触による還元法^{3), 4), 35)}であるが、現在良く用いられているのは後者である³⁾。金属をMと表すと、還元過程は(1)式のように表せる。



硝酸イオンの NO_2^- 、NOへの標準酸化還元電位はそれぞれ次式で示される^{3), 4)}。



(1)式からわかるように、この還元法は金属の種類や溶液のpH、金属表面の活性に依存する。強塩基性溶液中では反応が不活性になるが、逆に酸性が強すぎると亜硝酸イオンより先まで還元されてしまう。中性から弱塩基性条件下では次のような反応が進行する。



(4)式の反応を用いると、試料中の硝酸イオンを適切に還元できる。海水はpH 8.2程度の弱アルカリ性であるが、緩衝能を補うために試料水に緩衝液を添加して還元反応を行う場合もある³⁾。

直接定量法としては、220 nmにおける硝酸イオンの紫外吸収を測る方法がある³⁷⁾。この方法では、試料水のpHを塩酸で調節するだけで測定できるため、簡便だけでなくカドミウム廃液を生じないという利点がある。しかし、硝酸イオンだけでなく有機物も紫外線を吸収する性

質があるため、海水の分析を行う上では妨害が生じる³⁷⁾。

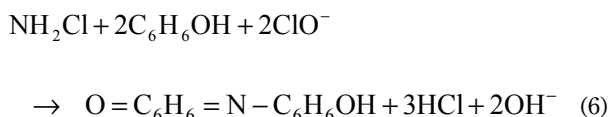
4.2.2 アンモニウムイオン

たんばく質や尿素が微生物によって分解されてアンモニウムイオンが生成する。さらに、アンモニウムイオンは、ニトロソモナス菌、ニトロバクター菌などによって硝酸イオン、亜硝酸イオンに酸化される。

インドフェノールブルー法には次の反応が用いられている³⁶⁾。アンモニウムイオンは次亜塩素酸イオンと反応してモノクロラミンを生成する。



モノクロラミンはフェノールとの脱塩酸反応によってインドフェノールブルーを形成する。



これは630 nm付近に吸収極大を持つため、この吸光度を測定する³⁶⁾。

この方法では、まず塩基性条件下で試料溶液にフェノールとニトロプルシッドナトリウムを溶解した溶液を加える。その後、有効塩素濃度が0.1 %となるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、インドフェノールブルーを形成させる。

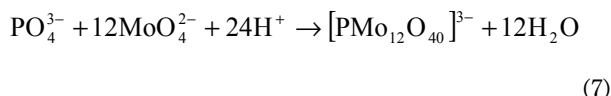
フェノールが劇物、ニトロプルシッドナトリウムが毒物であるため、代替物質としてサリチル酸ナトリウム、2-ヒドロキシビフェニルナトリウムが検討されている^{37), 38)}。前者による反応はモル吸光係数が極めて小さいが、後者では炭酸塩緩衝剤と共に用いることで高感度な測定が可能である。また後者は殺菌剤やカビの予防剤として用いられているが毒性は低く、代替物質として有効であると考えられる³⁸⁾。

インドフェノールの呈色はpHの影響を受けやすい点や、ニトロプルシッドナトリウムは酸性条件下で毒性をもつシアン化水素を発生する点からpH制御が非常に重要である。そのため、反応は緩衝液中で行われる。定量範囲は0.1ppm - 0.5ppmである³⁶⁾。

4.2.3 リン酸イオン

リン酸イオンの測定法にはモリブデンブルー法、リン酸還元によるホスフィン生成を利用するガスクロマトグラフ法などの方法があるが、簡便・高感度であるためモリブデンブルーの吸光度法が一般的である³⁾。リン酸イオンは酸性条件下でモリブデン酸と反応し、モリブド

りん錯体を形成する。



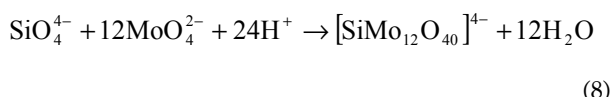
この錯体は容易に還元され、モリブデン()の一部がモリブデン()に還元された濃青色の還元体を形成する。これは880 nm - 885 nm付近で吸収極大を持つので、この光吸収を利用してりん酸イオンの定量を行う。還元体形成の際にアンチモンを共存させて、12個のモリブデンのうちの1つがアンチモンに置換された錯体を形成させ、これを定量に用いる方法もある³⁾。この方法では、呈色が安定するまでの時間が短縮される。

モリブドりん錯体の形成法には種々の方法があるが、塩分の影響を受けにくい点、干渉するイオン種が少ない点から、アスコルビン酸還元法が広く用いられている⁴⁾。酸性条件下でL-アスコルビン酸を加え、酒石酸アンチモニルカリウム、モリブデン酸アンモニウムの混合溶液を加える。

モリブドりん錯体のモル吸光係数は海水中と淡水中でほとんど同じであるので、検量線の作成には純水を用いても構わない。反応生成物が最大吸光度に達するまで数分間必要である。また、温度が低いと最大吸光度に達するまでの時間は著しく長くなるので注意が必要である。最大吸光度に達した後、1時間程度は安定である。しかし、高濃度の有機物を含む試料の測定の際には、時間の経過とともに吸光度の上昇が見られる場合もある⁴⁾。これは試薬中の硫酸によって有機物が分解されてりん酸が放出され、呈色するためである。このような現象が見られた場合は発色後の放置時間は短くする必要がある。定量範囲は0.1ppm - 1.2ppmである³⁶⁾。

4.2.4 けい酸イオン

吸光光度法によるけい酸イオンの定量には、モリブデンイエロー法とモリブデンブルー法がある^{3), 4)}。溶存けい酸は、酸性条件下でモリブデン酸と反応して、けいモリブデン酸錯体を形成する。



この錯体はけい酸を中心に12個のモリブデンが取り囲み、可視光の短波長域から紫外域にかけて大きな吸収を持つ。モリブデンイエロー法では、この錯体の吸収を利用して定量を行う。

けいモリブデン酸錯体の形成には、モリブデン酸アンモニウム水溶液またはモリブデン酸ナトリウム水溶液が

用いられる．この錯体は，酸性領域で α 型 ($> \text{pH } 4$) と β 型 ($> \text{pH } 1$) の2種類のポリマーを形成し，互いに異なるモル吸光係数 (大きさは α 型錯体 $<$ β 型錯体) を持つので，硫酸添加後はよく攪拌混合し， α 型の形成を防ぐ必要がある．

また，還元雰囲気下では一部のモリブデンが6価から5価に還元され，可視から近赤外領域で吸収を持つ．この還元型錯体の吸収を用いて定量を行う方法がモリブデンブルー法である．この還元型錯体ではモル吸光係数が大きいので，より高感度な測定ができる．モリブデンブルー法で用いられる還元剤にはアスコルビン酸，塩化第一スズ，1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸などがある．これらを添加し，けいモリブデン酸の還元型錯体を作る．

モリブデンイエロー法は，操作が簡便で定量範囲が広く，便利な方法である．しかし，紫外吸収を利用するので，天然水中に存在する腐敗物，分解物などの有機物によって正の誤差が生じる場合もある．一方モリブデンブルー法は，操作が煩雑で定量範囲が狭いという欠点はあるが，高感度測定ができる点や，長波長域を利用するため共存する黄色物質の影響を受けない点から，特に低濃度の測定に適した方法と言える．前者での定量範囲は $0.3\text{ppm} - 10\text{ppm}$ であるのに対し，後者では $0.1\text{ppm} - 1\text{ppm}$ である³⁶⁾．系を複雑にすることが不利に働くような測定でなければ，感度の点から後者を用いるのが有効である．

けい酸イオンの定量を行う際には，ガラスからのけい酸イオンの溶出を考慮し，溶液調製にはガラス器具の使用を避け，器具からのけい酸イオンの混入を最小限に抑える必要がある．また，けいモリブデン酸のモル吸光係数は，海水中では淡水中よりも約3 %低いので，海水中のけい酸イオンの定量に要する標準液の調製には人工海水が用いられている³⁾．

4.3 連続流れ分析法

この方法は，上述した吸光光度法を自動化するために，一般にオートアナライザーと呼ばれる連続流液式分析装置を用いるものである．この装置は，オートサンプラー，ペリスタ型ポンプ，吸光光度計からなり，チューブによって各部が接続されている⁴⁾．装置の概略図を図2(a)に示す．

海水試料はオートサンプラーによって分析システムに導入される．マルチチャンネルのペリスタ型ポンプによって試料，試薬，空気が同時に分析システムに送り込まれるので，一定の時間間隔で一定量の試料と試薬が自動で混合される．試料と試薬の連続的な流れの中に気泡を導入する．これによって流れが分割され，前に測った試

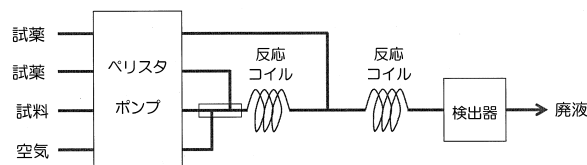


図2(a) 連続流れ分析法の装置概略図

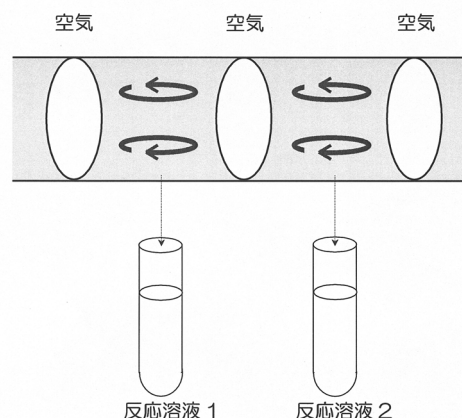


図2(b) 連続流れ分析法において気泡により生じる層流のイメージ³⁹⁾

*各分節がそれぞれ試験管に入った独立の反応溶液に対応し，溶液が攪拌される．

料の混入を防止する．また，分節された連続流中に層流が生じ，一つ一つの分節が攪拌入り試験管のように働く (図2(b))³⁹⁾ため，導入された気泡はフロー中での試料と試薬の混合促進の役割も果たす．連続流の中で生成物の吸光度を比色計によって測定する．

この方法は全ての試料と標準液を同様に取り扱い，試薬添加の時間や割合の正確さを確保することができるため，人的誤差の軽減が可能である．また，実質的に全てが同程度に発色するため，完全な発色が必要なく分析時間の短縮が可能である⁴⁾．この装置は船内への搭載が可能であるため，海水試料採取後の即時測定での利用が可能である．現在，栄養塩類の分析法として一般的に用いられており，対象の全イオンについて適応可能である．

4.4 フローインジェクション分析法

この方法は連続的に流れている試薬中に液体試料を導入してキャピラリーチューブを流れる間に化学反応をさせた後，検出器で分析成分を検出し定量する自動分析法である^{34), 40)-43)}．この方法で用いる分析装置はキャピラリーチューブ，ポンプ，切り替えバルブ，恒温槽からなり，

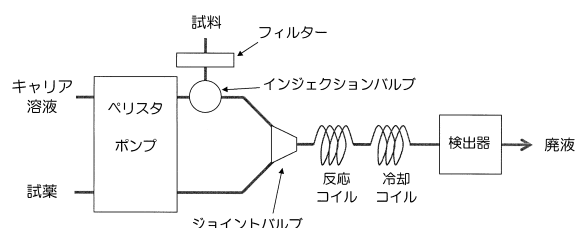


図3 フローインジェクション分析法の装置概略図

検出系には通常の定量分析で用いられているほとんど全ての検出装置を用いることができるので、その応用範囲は非常に広い。分光光度計、蛍光分光光度計、電極、原子吸光度計などが主に用いられる⁴³⁾。装置の概略図を図3に示す。

操作の完全な自動化が可能であるので、人的誤差の縮小が図れる。また、一定間隔で試料と試薬を導入し検出するので、すべての試料が同条件で扱われ、反応が平衡に達する前の状態でも測定でき、迅速な測定が可能である⁴³⁾。しかし、試料は合流地点で希釈されることになるので、流路を多くすると感度が低下する。また、検出部までの到達時間が短く、反応速度の遅い反応系には適用できない。恒温槽を用いて反応を加速することが必要となる場合もある。連続流れ分析法とは気泡の導入がない点で異なるので、気泡の乱れに起因する測定の不安定さは除去される。検出器の選択によって様々な反応系を用いた測定が可能であり、応用性にも優れると言える。

4.5 キャピラリーゾーン電気泳動法

一般に内径10 μm – 200 μm 程度の細管内で分離を行う電気泳動法をキャピラリー電気泳動法という⁴⁴⁾。泳動液としてキャピラリー内に電解質の緩衝液を満たし、両端を緩衝液内に置く。その後、試料溶液をキャピラリー内に導入する。キャピラリー内への泳動液の充填や、試料溶液の導入には、泳動液の注入側を加圧する加圧法、泳動液の流出側を減圧する減圧法、液面高さの差から生じるサイフォン流を利用する落差法が用いられる。両端に数kVから数十kVの電圧をかけることで、試料成分を分離する。試料の溶質は、それぞれの電荷とイオン半径に応じた静電力を受ける。このときに生じる電気浸透流と電気泳動の作用で溶質を相互分離する⁴⁴⁾。装置の概略図を図4に示す。

この方法はキャピラリーと高圧電源、検出器のみの簡単な装置で分析が可能である。分析に用いる試料溶液量や泳動液量が数10 μL から(溶媒の蒸発による濃度変化を考慮しても)数100 μL 程度で十分である、理論段数が大

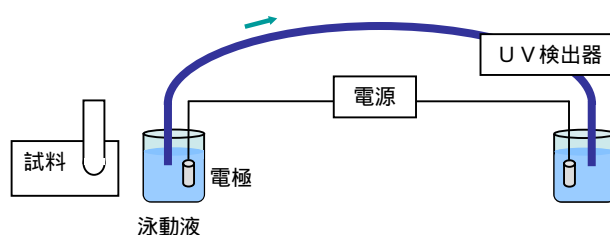


図4 キャピラリーゾーン電気泳動法の装置概略図

きく分離度が高い、充填カラムを用いないのでキャピラリーの洗浄やコンディショニングが容易などの利点がある。定量可能な試料濃度は、検出器の種類や濃縮法によって異なるが、 nmol L^{-1} – mmol L^{-1} オーダーである⁴⁵⁾とされているので、海水中の微量無機イオンの濃度レベルに十分に対応する。しかし、海水測定に適用するためには、海水中に多量に含まれている高濃度陰イオンの妨害除去および検出感度の向上が求められる。海水試料中に共存する高濃度陰イオンの妨害による影響を防ぐために、緩衝液として人工海水が用いられる。さらにオンライン濃縮法として、一時的(過渡的)等速電気泳動を利用した例がある^{45), 46)}。この例では、分析目的イオンの濃度が低い場合に、そのイオンゾーンが濃縮される効果を利用したものである。Foretらによって提唱⁴⁷⁾されて以来、一時的(過渡的)等速電気泳動は海水分析や生体関連試料のような高塩分試料や高濃度共存成分を含む工業関連試料の分析を行う際のオンライン濃縮法として用いられている。硝酸イオンと亜硝酸イオンの同時定量も可能である。

4.6 イオンクロマトグラフ法

イオンクロマトグラフ法は、『溶離液を移動相とし、イオン交換体などを固定相とした分離カラム内で試料中のイオン種成分を展開溶離させ、電気伝導度検出器、電気化学検出器または吸光度検出器で測定する方法である』と定義されている。つまり、分離カラム中のイオン交換基との選択係数(イオン交換能)の差を利用して、試料中の対象成分イオンを分離する方法である⁴⁸⁾。検出器には汎用性や感度の点から電気伝導度検出器が用いられることが多い。試料成分分離用の分離カラムの後に、溶離液の電気伝導度のバックグラウンドを低下させるためにサプレッサーが直列に接続され、検出器で対象成分が検出される。概略図を図5に示す。

この方法では、カラムの選択によって様々な分離系を作ることができる。分離カラムには、低交換容量のイオン交換樹脂を用いるイオン交換型が一般的であるが、ポラスポリマーへの吸着・分配による分離を利用する吸

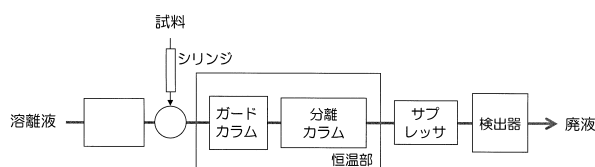


図5 イオンクロマトグラフ法の装置概略図

着分配型，強酸性陽イオン交換樹脂を用いて陰イオンに解離したものを排除し，解離していない分子を樹脂の内部に浸透させるイオン排除型などが用いられている．溶離液中の高電気伝導度を持つイオンを取り除くための除去カラムには，陽イオン分析では OH^- 型強塩基性陰イオン交換樹脂（もしくは陰イオン交換膜），陰イオン分析では H^+ 型強酸性陽イオン交換樹脂（もしくは陽イオン交換膜）が用いられる⁴⁸⁾．

たとえば，けい酸イオン測定のために用いられたイオン排除イオンクロマトグラフ分離が挙げられる⁴⁹⁾．この方法では分離カラムの後に二種類のイオン交換樹脂カラムをつないだものを用いて分離が行われている．一本目のカラムで K^+ 型強酸性陽イオン交換樹脂を用いてけい酸の H^+ を K^+ と交換してけい酸カリウムに変換し，けい酸成分を分離する．その後，二本目のカラムに OH^- 型強塩基性陰イオン交換樹脂を用いてけい酸イオンを水酸化イオンに変換し， KOH として検出を行っている．測定値のRSD（ピーク面積）は標準液の測定において1.4%–2.0%，実海水試料の測定において0.7%–1.4%が得られている⁴⁹⁾．

他の例では，プレカラムとして2つの陰イオン交換カラムをつなぎ，スイッチングバルブを介して分析用の陰イオン交換カラムで分離を行うカラムスイッチングイオンクロマトグラフ分離が挙げられる⁵⁰⁾．装置の概略図を図6に示す．グラジエントをかけてプレカラム部の2つの陰イオン交換カラムで高濃度の塩化物イオンを除去した後，スイッチングバルブで分離用のカラムへ送って分離を行う．電導度検出器で残留した塩化物イオンと亜硝酸イオンを検出し，UV検出器で亜硝酸イオンのみを検出する．この方法では硝酸イオン，亜硝酸イオン，りん酸イオンの相互分離が可能である．

このようにプレカラム，分離カラムや検出器の組み換えで様々な分離系を構築することが可能である．ただし，イオンクロマトグラフ法で用いられる電気伝導度検出器は，強電解質のイオン種を高感度で検出することができる反面非選択的な検出が行われるので，海水中に含まれる多量の塩化物イオンの除去が必要である．

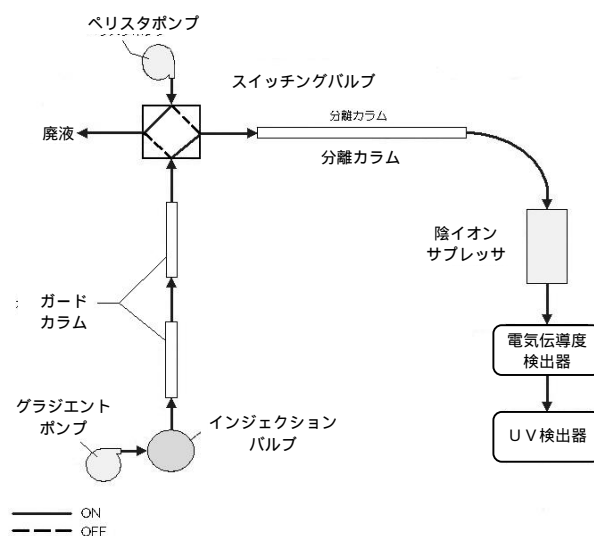


図6 カラムスイッチングイオンクロマトグラフィーの装置構成図⁵⁰⁾

*スイッチングバルブ内の傍線はバルブONの状態，点線はバルブOFFの状態を表す．

4.7 測定法の比較・検討

4.7.1 硝酸イオン，亜硝酸イオン

硝酸イオン，亜硝酸イオンでは，吸光光度法での適用可能範囲は $0.05 \mu\text{M}$ – $45 \mu\text{M}$ ⁴⁾であると報告されている．測定のRSD（相対標準偏差）は海水試料の測定においては1%–5%と高めの値を示しているが，純水ベースの試料の測定では0.4%前後が得られている⁵¹⁾．

キャピラリーゾーン電気泳動法を用いた測定における検出限界は，純水ベースの試料では $0.1 \mu\text{M}$ ⁵¹⁾程度，海水試料の測定では $0.2 \mu\text{M}$ ⁴⁴⁾や $0.53 \mu\text{M}$ ⁵¹⁾という値が得られている．しかし，測定のRSDは硝酸イオン，亜硝酸イオンの順に2.8%、5.5%（純水ベースの試料）と2.1%、1.6%⁴⁹⁾（海水試料）と大きくなっている．硝酸イオン，亜硝酸イオンの同時定量ができることが利点であるが，測定感度や測定精度の点では問題がある．

フローインジェクション分析法では様々な検出方法が用いられている．原子吸光検出を用いた検出限界は $0.65 \mu\text{M}$ ⁵¹⁾と高めの値が報告されている．陰イオン交換-分光光度法による検出では硝酸イオンの検出限界は 50 nM (RSD 1%)⁵¹⁾，化学発光検出においては硝酸イオンで $0.1 \mu\text{M}$ ，亜硝酸イオンでは 10 nM ⁵¹⁾と良い検出限界が得られている．RSDは硝酸イオンで6.7% 亜硝酸イオンで0.6%であり，硝酸イオンの分析に用いるためにはRSDの向上が必要である．

連続流れ分析法では硝酸イオン検出の直線範囲として $0 \mu\text{M}$ – $40 \mu\text{M}$ が与えられている⁴⁾．RSDはWOCEの海洋観

測プログラムの分析指針では3 %とされているものの、実際は0.1 %の桁の値が得られている⁴⁾。フローインジェクション分析法では検出方法に様々な検討の余地があり、工夫次第でよい検出感度が得られる可能性があるが、吸光光度法を用いる連続流れ分析法はRSDも小さく、実海水試料に向けた測定法であると思われる。吸光光度法を用いる直接測定法では紫外吸収を測定するので、有機物の影響を考えると海水分析には不適である。

実海水試料に含まれる硝酸イオン、亜硝酸イオンの量はそれぞれ0.05 μM – 40 μM 、0.02 μM – 0.25 μM ⁵⁾であると考えられるため、フローインジェクション分析法や連続流れ分析法で得られる検出限界はまずまずの値である。また、イオンクロマトグラフ法では、海水中に高濃度に含まれる塩化物イオンの除去に工夫がいるものの、硝酸イオン、亜硝酸イオンの直接分離が可能であり有効である⁵⁰⁾。従って、連続流れ分析法とイオンクロマトグラフ法の使用をともに検討して行きたい。

4.7.2 アンモニウムイオン

アンモニウムイオンの既存の測定法としては、インドフェノールを用いた吸光光度法が挙げられ、アンモニウムイオンの定量のために最も広く使われている方法である。この方法では簡便で高感度な検出ができるので水質試験などにも用いられているが、反応に時間がかかる。アンモニウムイオンの測定では、アンモニウムイオン自身の熱分解や窒素含有有機物の加水分解に注意する必要がある²⁶⁾、反応時間がかかることは不利である。また、海水への適用に関しては、pHのシフトが観察されている²⁶⁾。低pH側へのシフトによって、検出感度と反応速度の低下を引き起こすので注意が必要である²⁶⁾。また、銅、亜鉛、鉄、硫化物、チオール、アスコルビン酸など、干渉する物質が多いので、必要に応じて前処理や最適条件の設定が必要である²⁶⁾。

イオンクロマトグラフ法による検出も行われており^{26), 52)}、海水中に多量に含まれるナトリウムイオンとの良い分離が行われた報告がある。定量に用いるためには工夫が必要である。

連続流れ分析法での定量は海水分析において一般的に用いられる方法であるため、検出限界やRSDとしてどの程度の値を得ることができるか確認する必要がある。

4.7.3 リン酸イオン

リン酸イオンの定量のために、フローインジェクション分析法による吸光光度測定が用いられている。検出限界は0.6 μM との報告がある⁵³⁾。連続流れ分析法での検出

直線範囲は0 μM – 5.0 μM である⁴⁾。また、イオンクロマトグラフ法によるけい酸イオンとの同時分離の報告もある⁵²⁾。この方法では環境試料中におけるりん酸イオンとけい酸イオンのみの選択的な分離検出が可能である。MOOS-1の測定に用いられたイオン排除クロマトグラフィー-ICP質量分析法では検出限界0.06 μM が得られている⁵⁴⁾。

海水中のりん酸イオンの含有濃度は、低いところでは数十nMなので、連続流れ分析法では定量可能な範囲内であり、有効である。

4.7.4 けい酸イオン

けい酸イオンについては、フローインジェクション分析法、連続流れ分析法、イオン排除イオンクロマトグラフ法などを用いた測定等が行われている。フローインジェクション分析法ではRSD 0.46 %が得られている³⁴⁾。連続流れ分析法では、0 μM から200 mMの検出範囲で直線性が得られている⁴⁾。イオンクロマトグラフ法では、前述のようにRSD(ピーク面積)は標準液で1.4 % – 2.0 %、実試料で0.7 % – 1.4 %が得られており⁴⁹⁾、りん酸イオンとの相互分離の報告もある⁵²⁾。イオン排除クロマトグラフィー-誘導結合プラズマ質量分析法によるMOOS-1の測定では、検出限界0.08 μM が得られている⁵⁵⁾。けい酸は海水中では2 μM – 130 μM の濃度で存在するので、検出範囲の広い連続流れ分析法は有効である。

4.7.5 測定法に対する方向性と課題

海水測定に関しては、様々な方法が試みられてはいるが、最も一般的で広く用いられている方法は吸光光度法である。この方法を自動化し、人的誤差の排除を可能としたオートアナライザーは、実際に海洋分析を行う現場で船上に設置して栄養塩の即時分析に用いられており、現状では海水中の栄養塩を測定するためには、これを用いる連続流れ分析法が最も有効な方法である。連続流れ分析法では、前述した5種類の栄養塩の測定が可能であり、検出可能な濃度範囲が広いが、日常的な繰り返し性に関して疑問を持つ声も聞かれる。従って、今後連続流れ分析法を用いた測定の繰り返し性の向上を図るための最適条件の探索を行い、求められている0.1 %程度の繰り返し性での測定を可能にすることが必要である。

5. 今後の展望

物質大循環の観点では、窒素、りん、けい素の挙動と共に他の成分の挙動への着目も必要である¹⁾。地球上でこれらの成分は海水表面と接触し、海水中に溶解し、海

栄養塩分析とそのための標準液の現状

表3 栄養塩の測定における要求濃度範囲および各手法を用いた際の対応濃度範囲とRSD^{3)-5), 34), 36), 44), 51)-53), 55)}

	NO ₃ ⁻ (μmol/L)	NO ₂ ⁻ (μmol/L)	NH ₄ ⁺ (μmol/L)	PO ₄ ³⁻ (μmol/L)	SiO ₃ ²⁻ (μmol/L)
求める濃度範囲	0.05 - 40	0.02 - 0.2	0 - 0.6	0.01 - 2.5	2 - 140
	対応濃度範囲 RSD	対応濃度範囲 RSD	対応濃度範囲	対応濃度範囲 RSD	対応濃度範囲 RSD
吸光光度法	0.05 - 45 1-5 %	0.01 - 2.5 1-5 %	0.1 - 0.5	0.01 - 2.5	0.1 - 140 (青) 0.3 - 10 (黄)
フローインジェクション 分析法(AAS)	0.65 -		—	0.6 -	0.46%
(陰イオン交換)	0.05 - 1.0%		—		
(化学発光)	0.1 - 6.7%	0.01 - 0.6%	—	—	—
連続流れ分析法	0 - 40		—	0 - 5.0 0.3%	0 - 200000 0.16%
キャピラリーゾーン 電気泳動	0.2 - 2.1%	0.2 - 1.6%	—	—	—
イオンクロマト グラフィー	硝酸・亜硝酸の相互分離可能		JIS K 0102 排水試験法公定法	りん酸・けい酸の相互分離可能	
IEC-ICP-MS				MOOS-1の測定に使用	

*特に断らない限り、単位はμmol/Lを用いている

**AAS:原子吸光分析法、IEC-ICP-MS:イオン排除クロマトグラフィー-誘導結合プラズマ質量分析法

水同士の混合拡散によって深層に輸送される。海洋生物は呼吸や光合成によってこれらの成分を消費・生産し、生産物は重力によって沈降して深層へ運ばれ、一部は分解されて循環する。このようにして物質が循環し、蓄積されるメカニズムの解明は、地球環境や漁業生産だけでなく、気候予測の観点からも重要視されているので⁶⁾、海水中の栄養塩や他の物質の正確な濃度を測定するための海水標準物質の供給には強い要求がある。

栄養塩海水標準物質の供給を行うためには、値付けの対象として考えている硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニウムイオン、りん酸イオン、けい酸イオンそれぞれの一次標準液の整備がまず必要である。栄養塩海水標準物質に不確かさの小さい認証値を与えるために、NMIJでは未開発であるけい素標準液の開発を迅速に進めると同時に、硝酸イオン等の原料物質の純度を再検討する必要がある。それとともに、連続流れ分析法を用いた測定の繰り返し性の向上を図り、正確な測定が可能な条件を整えたい。さらに、対象イオンの正確な測定を可能にする既存手法の改良や他の手法の探索にも尽力して行きたい。

参考文献

- 1) 山中康裕: 物質循環としての陸域・海洋生態系との相互作用(海洋), 天気 49-1(2002)36-42.
- 2) 西村雅吉: 環境科学(改訂版)第13版(裳華房, 2002).
- 3) 奥修: 吸光光度法ノウハウ ケイ酸・リン酸・硝酸塩の定量分析(技報堂出版, 2002).
- 4) 角皆静雄, 才野敏郎監修, 角皆研究室, 川辺みどり訳: 全球海洋フラックス合同研究計画における観測・測定手法(日本語翻訳版)(日本海洋データセンター(JODC), 1999).
- 5) 青山道夫: 栄養塩測定用海水組成標準の2003年国際共同実験報告, 気象研究所技術報告 50(2006)1-91.
- 6) 廣瀬勝己: 地球温暖化をはかる, ぶんせき 10(2002) 566-569.
- 7) A. Alain and K. Roger: Stability and preservation of primary calibration solutions of nutrients, Marine Chemistry 52(1996)173-181.
- 8) M. Jill: Reference materials for monitoring nutrients in sea water environment, Fresenius J. Anal. Chem. 352(1995)148-151.

- 9) Certificate for QC SW4.1 Nutrients in Natural Seawater, VKI.
- 10) Certificate for QC SW4.2 Nutrients in Natural Seawater, VKI.
- 11) V. Clancy and S. Willie: Preparation and certification of a reference material for the determination of nutrients in seawater, *Anal. Bioanal. Chem.* 378(2004)1239-1242.
- 12) 株式会社環境総合テクノス: 海水栄養塩類参照物質パンフレット.
- 13) http://www.kanso.co.jp/kankyo_j/k_k_chosa/k_k_chosa_4.html
- 14) M. J. T. Milton and T. J. Quinn: Primary methods for the measurement of amount of substance, *Metrologia* 38(2001)289-296.
- 15) 久保田正明: わが国における標準物質の現状, 計測と技術 32-8(1993)638-643.
- 16) Certificate of Analysis Standard Reference Material 3185, Nitrate Anion Standard Solution, NIST(2005).
- 17) Certificate of Reference Material No. 105-04-NO2, Nitrate Anion Standard Solution, KRISS(2003).
- 18) 寺島園子, 渡邊勉, 日置昭治, 久保田正明: 硝酸イオン及び亜硝酸イオンの標準液調製条件の検討, 科学技術研究所報告 85(1990)55-59.
- 19) A. Hioki, T. Watanabe, K. Terajima, N. Fudagawa, M. Kubota and A. Kawase: Accuracy in Gravimetric Determination of Nitrate and Nitrite as Nitron Nitrate, *Analytical Sciences* 6(1990)757-762.
- 20) P. A. Liberatore: Automated nitrate analysis of water, *Instruments at Work UV-59* (Varian, 1993)1-5.
- 21) Certificate of Analysis Standard Reference Material 193, Potassium Nitrate, NIST(1991).
- 22) NPS Anion Analysis Revision 3, RTI(2005).
- 23) A. Hioki, M. Kubota and A. Kawase: Accuracy in the precise coulometric titration of ammonia and ammonium ion with electrogenerated hypobromite, *Talanta* 38(1991)397-404.
- 24) JIS K 8116-2006 塩化アンモニウム (試薬), 日本規格協会(2006).
- 25) 井上達也: 化学分析における基礎技術の重要性(5), *The Chemical Times* 200-2(2006)15-21.
- 26) C. Kuo, P. Wang and C. Wu: Fluorometric determination of ammonium ion by ion chromatography using postcolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde, *J. Chromatogr. A* 1085(2005)91-97.
- 27) Certificate of Analysis Standard Reference Material 3186, Phosphate Anion Standard Solution, NIST(2005).
- 28) Certificate of Reference Material No. 105-04-PO2, Phosphate Anion Standard Solution, KRISS(2003).
- 29) 厚生労働省第261号46 pH 別表第31又は第32に定める方法.
- 30) 飯田広恵, 内田哲男, 湯地昭夫, 小西美和, 伊藤聡美, 磯山博文: 酸分解/フローインジェクション分析法によるケイ酸塩副成分の定量, *分析化学* 52(2003)527-532.
- 31) JIS K 9007-1996 りん酸二水素カリウム (試薬), 日本規格協会(1996).
- 32) Certificate of Analysis Standard Reference Material 3150, Silicon Standard Solution, NIST(2004).
- 33) Certificate of Reference Material No. 105-02-SI2, Silicon Standard Solution, KRISS(2004).
- 34) 岡野博文: FIAによる海水試料中のケイ酸塩分析について, *海洋技術部技報*21(2003)97-102.
- 35) A.W. Morris and J. P. Riley: The determination of nitrate in sea water, *Analytica Chimica Acta* 29(1963)272-279.
- 36) 日本分析化学会編, 分析化学データブック改訂第5版 (丸善, 2004) 93-94.
- 37) 日本分析化学会北海道支部, 水の分析第4版 (化学同人, 1994) .
- 38) 荒川祐介, 赤木功, 山本克巳: 農耕地土壌のアンモニウム態窒素の比色定量法, 平成15年度 九州沖縄農業研究成果情報; 荒川祐介, 赤木功, 山本克巳, 土肥誌 74-5(2003)657.
- 39) ビーエルテック株式会社: AACS-V仕様書.
- 40) J. Floch, S. Blain, D. Birot and P. Treguer: In situ determination of silicic acid in sea water based on FIA and colorimetric dual-wavelength measurements, *Analytica Chimica Acta*, 377(1998)157-166.
- 41) 福士恵一, 横田久里子, 中山雄介, 石尾暢宏, 宮道隆: 人工海水を泳動液とするキャピラリーゾーン電気泳動法による海水中の微量無機陰イオンの定量, *分析化学* 54(2005)665-677.
- 42) K. Fukushi, Y. Nakayama and J. Tsujimoto: Highly sensitive capillary zone electrophoresis with artificial seawater as the background electrolyte and transient isotachopheresis as the on-line concentration procedure for simultaneous determination of nitrite and nitrate in seawater, *J. Chromatogr. A* 1005(2003) 197-205.
- 43) 小熊幸一: フローインジェクション分析, 高純度化技術体系 第一章分析技術 (フジテクノス) (1996)1126-1128.

- 44) 酒井恒行: キャピラリーゾーン電気泳動, 高純度化技術体系 第一章分析技術 (フジテクノス) (1996)1076-1090.
- 45) 高柳俊夫: キャピラリー電気泳動, 機器分析ラボガイド (講談社サイエンティフィク) (2006)103-117.
- 46) 廣川健, 岡本光, 徐中其, 育田夏樹: オンライン試料前濃縮によるキャピラリー電気泳動法及びマイクロチップ電気泳動法の高感度化, 分析化学 52(2003) 1069-1079.
- 47) F. Foret, E. Szoko, B. L. Karger: On-column transient and coupled column isotachophoretic preconcentration of protein samples in capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr. 608(1992)3-12.
- 48) 井上嘉則: イオンクロマトグラフィー, 高純度化技術体系 第一章分析技術 (フジテクノス) (1996)962-976.
- 49) 森勝伸, 田中一彦, 埴田博史, 池戸みかる, 小月文志: 導電率検出増大型カラムを用いる海水及び河川水中のケイ酸イオンのイオン排除型イオンクロマトグラフィー, 分析化学 53(2004)1481-1486.
- 50) P. Bruno, M. Caselli, G. de Gennaro, B. De Tommaso, G. Lastella and S. Mastrolitti: Determination of nutrients in the presence of high chloride concentrations by column-switching ion chromatography, J. Chromatogr. A 1003(2003)133-141.
- 51) M. J. Moorcroft, J. Davis and R. G. Compton: Detection and determination of nitrate and nitrite, Talanta 54(2001)785-803.
- 52) 田中一彦: イオン排除型イオンクロマトグラフィーによる水質モニタリング法の開発に関する研究, 分析化学 55-5(2006)275-289.
- 53) J. M. Estela and V. Cerda: Flow analysis techniques for phosphorus, Talanta 66(2005)307-331.
- 54) L. Yang, R. E. Sturgeon and J. W. H. Lam: On-line determination of dissolved phosphate in sea-water by ion-exclusion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 1302-1306.
- 55) A. Hioki, J. W. H. Lam and J. W. McLaren: On-Line Determination of Dissolved Silica in Seawater by Ion Exclusion Chromatography in Combination with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Anal. Chem. 69 (1997)21-24.