

9810 海水中溶存成分のオンサイト分析および自動モニタリングシステムに関する研究

助成研究者：山根 兵 (山梨大学 教育人間科学部)

共同研究者：平田 真佐恵 (山梨大学 教育人間科学部)

1. 海洋地球化学や海水環境に関する研究調査において、採取された試料水は現場での迅速な分析が望ましいことは言うまでもない。本研究では新しい概念に基づいたフローインジェクション (FIA) によるオンサイトでの分析や海水環境の連続モニタリングが可能な新しい自動化学分析システムに関する基礎的な研究を行った。今回は海水中の NO_2^- および NO_3^- の分析システムについての結果を報告する。

2. NO_2^- の定量のための連続流れ分析システムの模式図をFig.1に示す。試料溶液はループ付きバルブで注入され、検出シグナルは自動記録される。

3. NO_2^- の高感度かつ迅速な検出のために過酸化水素によるクロルプロマジン (CP) の酸化における触媒作用を用い、酸化による吸光度変化を528 nmにて測定した。この分析システムでは試料溶液および試薬溶液の添加、かき混ぜ、反応、吸光度検出などが細管内での連続的な溶液の流れの中で自動的に行われるので、人手による操作を必要と

せず、したがってまた、実験室や、フラスコ、ピーカー、ピペット等が不要なので現場での分析が容易となるものと考えられる。検量線は0~120ppbの範囲で直線であり、検出限界 (S/N=3) は0.3ppbと高感度であった。50ppbの NO_2^- を含む試料を分析したときの相対標準偏差は0.9%で良好な精度が得られた。分析時間は NO_2^- の場合、1試料当たりわずか90秒程度であり、リアルタイムに近い分析も可能である。

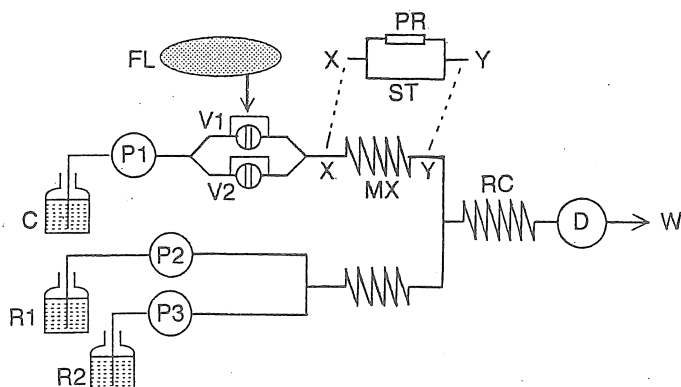


Fig.1 Schematic diagram for continuous flow system for determining nitrite and nitrate

P1, P2, P3: Pump, C: carrier (0.1ml/min),
 R1: Chlorpromazine (0.045M) (0.05ml/min),
 R2: H_2O_2 (0.30M)- CH_3COOH (0.80M) (0.05ml/min),
 MX: mixing coil (15cm), D: Photometric detector (528nm),
 V1: Sample injection with sample loop (50cm), V2: Injection of standard solution, RC: reaction coil (100cm), PR: Photo-reactor (100 cm), ST: Splitting tubing (30 cm), FL: Field, W: Waste, X, Y: replacing position for simultaneous determination of nitrite and nitrate, PTFE tubings (0.25 mm i.d.) were used for experiments, unless otherwise specified.

9810 海水中溶存成分のオンサイト分析および自動モニタリングシステムに関する研究

助成研究者：山根 兵 (山梨大学 教育人間科学部)
共同研究者：平田 真佐恵 (山梨大学 教育人間科学部)

1.研究目的

海洋地球化学や海水環境に関する研究調査において、採取された試料水は特定の成分以外は研究室に持ち帰って分析されるのが通常である。これは殆どの分析機器が大がかりな装置であったり、特殊な設備を必要とし、また、振動や衝撃に極めて弱い高分解能な分光系や微妙な調整を必要とするシステムから成り立っていることなどのために採水現場や船上での設置利用が困難なことによる。しかしながら、これでは点のデータしか得られず沿岸域海水環境の正確な動態把握は難しいし、また、溶存成分は試料水の保存、運搬中にその濃度や形態変化を起す可能性が大きく、できれば現場での迅速な分析が望まれる。海底の地殻変動に関係する水熱活動を検知する化学トレーサーとしての海水中のマンガン濃度の変化が注目されているが、そのような場合、調査船上でのオンサイト分析や連続モニタリングが特に重要な意味を持つ。本研究では新しい概念に基づいたフローインジェクション (FIA)¹⁾によるオンサイトでの分析や海水環境の連続モニタリングが可能な新しい自動化学分析システムに関する基礎的な研究を行った。今回は海水中の NO_2^- および NO_3^- の分析システムについての研究結果を報告する。

2.研究方法

2.1 測定システム (ハード面)

本研究目的に適合する分析システムは次のような特徴を持つことが望まれる。①システム構成が単純で保守管理が容易 ②分析レスポンスが数分以内と迅速である ③システム全体がコンパクトで現場での設置が容易 ④高精度分析が達成できる ⑤試薬消費量が少ない (従って廃液量もすくなく、環境を汚染しない) ⑥衝撃や振動に強

い ⑦サンプリングとキャリブレーションが容易。そこで、本研究では細管内での溶液の流れの中での反応と検出を一体化した新しい概念に基づくフローインジェクションの応用を検討した。これは従来の化学分析と根本的に異なり、試料の注入、試薬の添加、かき混ぜ、反応、検出などの一連の操作をすべてテフロン細管中（内径0.5mm）の連続した溶液流れの中で行わせるとともに溶液の流れを輸送手段とするもので、上述の条件に近い分析システムが期待される。本研究で用いたクロルプロマジンはやや高価なので、経費節約の意味も含めてマニフォールド等はセミマイクロスケールで設計した。このために廃液量も大きく減少した。

2.2 検出反応（ソフト面）

環境中の NO_2^- の定量には芳香族アミンのジアゾ化とそのジアゾ化合物と他のアミンとのカップリングにより生成する色素の吸光度測定が広く用いられている^{2~4)}。 NO_3^- は NO_2^- に還元した後、このジアゾカップリング吸光度法で定量される。このジアゾカップリング法では発色に時間がかかり、オンサイト分析を考えた場合、より反応速度の大きな、かつ感度の高い検出反応が有利と考えられるので、本研究では新しい触媒反応による検出反応を検討した。本研究で取り上げた過酸化水素によるクロルプロマジン（CL）の酸化反応に NO_2^- が触媒として作用することから^{5) 6)}、その反応速度の測定を NO_2^- 濃度の迅速な計測プローブとして活用しようというものである。測定対象は寿命の比較的短い中間体であるから、迅速な NO_2^- の計測が期待出来るが、その反面バッチシステムでの測定は問題が多い。本研究のような連続流れシステムでの計測が最適と考えられる。 NO_3^- の還元にはCuでコーティングしたCdを充填したカラムが用いられるが、Cdは有害であることのほかに、還元効率が一定せず、ある時間使用したら再生の必要があるなどの問題がある。本研究ではこの還元方式の他に、有害な試薬を用いない紫外線照射による光還元方式もあわせて検討した。

3. 実験

3.1 試薬及び装置

試薬類はとくに断わらない限り和光純薬（株）製特級品を用いた。

亜硝酸イオン標準溶液（1,000ppm）：亜硝酸ナトリウムを水に溶解して調製した。

硝酸イオン標準溶液 (1,000ppm) : 硝酸カリウムを水に溶解して調製した。

クロルプロマジン溶液 (0.045 M) : 生化学用クロルプロマジン塩酸塩を水に溶解した。過酸化水素 (0.30M) - 酢酸 (0.90M) 混合溶液 : 過酸化水素水 (30%) 1.5ml と酢酸 (99.7%) 2.5mlを水にとかして良く混合し、全容を50mlとした。

人工海水 (模擬海水) : NaCl (11.70g), CaCl₂ · 2H₂O (0.70g), MgCl₂ · 6H₂O (5.30g), 及びNa₂SO₄ (1.90 g) を水に溶かして全体を250mlとした。この溶液を原液として、使用時に2倍に希釈して使用した。

本研究で構築したFIA システムの概念図をFig.1 に示す。

送液ポンプ : 日立製作所 (株)

製655A-13型、トーソー (株)

製CCPD、サヌキ株) 製RX-703T型、またはサヌキ (株)

製PU-5000型、検出器 : 日本分光 (株) UV-970型 UV/

VIS 検出器、記録計 : 横河

電機 (株) 製LR4110 記録計

、光還元装置 : 相馬光学 (株)

製S-3900 型光反応器 (低圧

水銀ランプ、内径14mm、

長さ134mm、4W)、反応

コイルは1mの半透明PFAチ

ューブ (内径0.5 mm、外

径1.8 mm) を水銀ランプに直接まきつけて使用した。NO₃⁻の定量においてはFig.1 中のマニフォールドの一部 (X、Y) に光反応器を挿入した。

3.2 分析操作

試料溶液はサンプルループ付き (1m) 六方バルブによりキャリアーに注入され、溶液R1、R2と合流後、反応コイル (RC) を通過する過程で生成した反応生成物の吸光度が528 nm にて測定記録される。記録されたシグナルはピーク状で、このピーク高

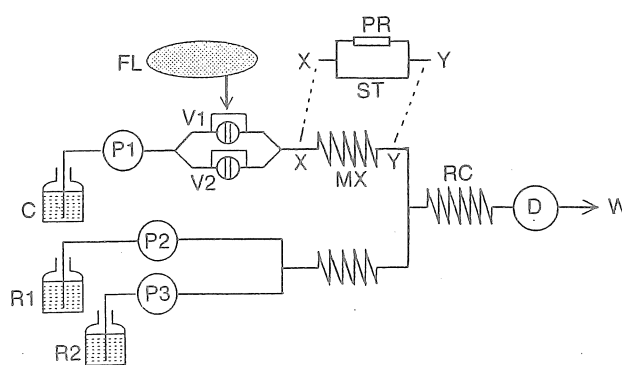


Fig.1 Schematic diagram for continuous flow system for determining nitrite and nitrate

P1, P2, P3:Pump, C:carrier(0.1ml/min), R1:Chlorpromazine(0.045M)(0.05ml/min), R2:H₂O₂(0.30M)-CH₃COOH(0.80M)(0.05ml/min), MX:mixing coil(15cm), D:Photometric detector(528nm), V1:Sample injection with sample loop(50cm), V2:Injection of standard solution, RC:reaction coil (100cm), PR:Photo-reactor (100 cm), ST:Splitting tubing(30 cm), FL:Field, W:Waste, X, Y:replacing position for simultaneous determination of nitrite and nitrate, PTFE tubings(0.25 mm i.d.) were used for experiments, unless otherwise specified.

さを測定し、予め標準溶液を用いて作成してある検量線から試料溶液中の亜硝酸イオン濃度が算出される。オンライン分析を行う場合は測定対象からチューブを用いてポンプで注入バルブ (V 2) のループに試料溶液を送りこみ、決められた時間間隔でバルブを操作して注入する。

4. 結果及び考察

4.1 反応速度の測定

過酸化水素によるクロルプロマジン (CP) の酸化反応は赤色の中間体を経て無色の生成物へと変ることが知られている。これはFig.2 に示すようなフリーラジカルを持つ中間体が生成し、スルフォキサイドが生成するものと考えられている。

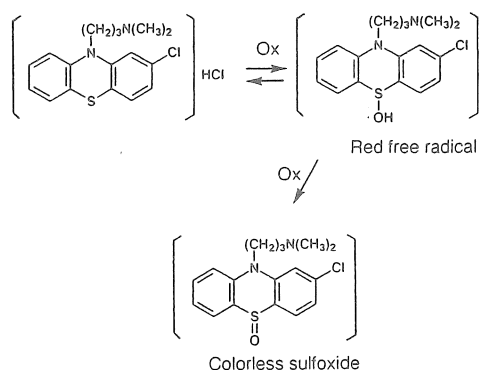


Fig.2 Reaction scheme for oxidation of chlorpromazine by hydrogen peroxide

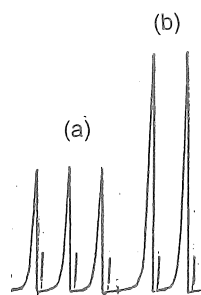


Fig.3 Typical signal traces for nitrite ; (a)50ppb and (b)100ppb

この酸化反応は酸化還元反応の指示薬としての応用が検討されたこともあるが、著者らはこの反応が NO_2^- によって触媒されることを利用し、この反応速度から極微量 NO_2^- のモニターに応用することを検討した。この赤色の中間体の吸収スペクトルを測定結果、酸化により生ずる中間体は528 nm に極大吸収を示すが、CP自身はこの波長では全く吸収を示さないので、この528 nm を反応追跡の際の測定波長とした。本研究で用いたフローシステムにおいては、反応に伴う吸光度変化はFig.3 のようなピークを持ったシグナルとして記録される。これは一定時間内の反応生成物の濃度変化を測定していることにもなるので、このピーク高さは見掛け上、反応速度 (定時間法) を表わすものといえる。

4.2 反応速度と各種因子の関係

Fig.1のフローシステムにこの反応系を利用して NO_2^- を定量する際の触媒反応速度に及ぼす種々の因子の影響について検討した。まず反応体としてのCP及び過酸化水素の濃度と反応速度（ピーク高さ）の関係調べた結果をFig.4に示す。どちらも濃度の増加とともにピーク高さ（反応速度）は増加するが、CPでは0.030 M以上で、また過酸化水素水の場合は0.30 M以上ではほぼ一定となった。これらのことから定量条件としてCP濃度 4.5×10^{-2} M 及び過酸化水素濃度 0.30 Mを選んだ。

CPの酸化反応は弱酸性域で進行するとされているので、本実験では酸として酢酸を用い、その濃度と反応速度との関係を調べた結果、

酢酸濃度の増加とともにピーク高さも少しずつ大きくなる傾向にあるが、それほど大きな濃度依存性がないことがわかった。ここでは0.80 M 酢酸酸性とした。

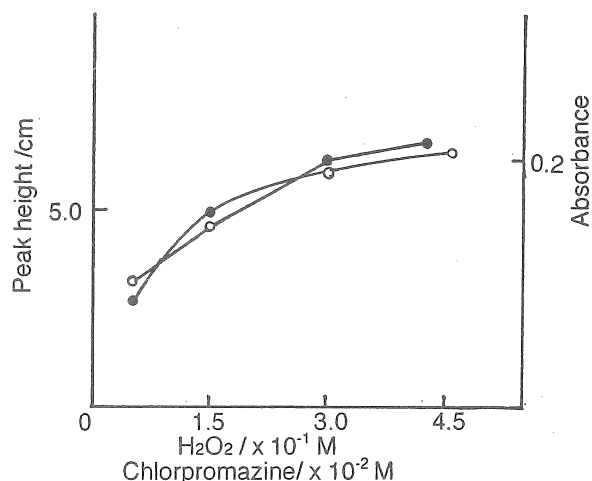


Fig. 4 Dependence of peak height on the concentration of hydrogen peroxide and chlorpromazine

4.3 フローシステムの検討

本研究のような触媒反応を用いる動的な反応速度測定法に FIA システムを導入する場合には溶液の流速や反応コイルの長さなどが試料ゾーンの分散の程度や反応時間と密接に関係し、したがって分析感度に大きく影響する。

反応コイル長さを一定として、試薬溶液の流速を変えてピーク

高さとの関係を調べた（ただし、キャリアーと試薬の流速の比を2:1と一定とした）

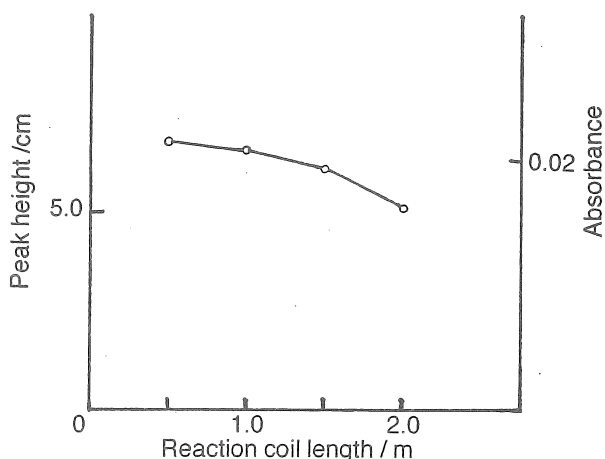


Fig. 5 Dependence of peak height on reaction coil length for injection of 100 ppb NO_2^-

ところ、流速が大きくなるにつれてピークは低くなった。これは反応時間が短くなったため、反応生成物の量が減少するためと考えられ、よくみられる減少である。次に、一定流速の下で、反応コイルの長さを変えた場合の反応コイル長さとピーク高さの関係をFig.5に示す。反応コイルが長くなるとともにピークは低くなった。これは反応コイルの増加により分散が増加し、感度が低下することも一つの原因と考えられるが、それだけの理由としてはピークの低下が大き過ぎる。測定対象となっているのが、反応の中間体であることから、反応時間の増加により検出器に到達する時間も長くなるので中間体が次の反応生成物に変わることもピーク低下の原因の一つと考えられる。キャリアー流速を100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、試薬R1とR2の合量を50 $\mu\text{l}/\text{min}$ に固定してR1とR2試薬の流速比とピーク高さの関係を実験し、R1とR2の比が1:1の時にもっとも良い感度が得られた。以上の結果をもとにしてFig.1に示すようなマニフォールドを設定した。

4.4 検量線

Fig.1のFIAシステムを用い、種々の濃度の NO_2^- 標準溶液を注入して得られたピーク高さと同濃度（0～100ppb）の間には良好な直線関係が認められた。この反応系ではバックグラウンドとしての非触媒反応速度が相対的に小さく、そのシグナルはFIAシステムではベースラインとして自動的に差し引かれており、安定しているため検出限界として（ $S/N=3$ ）0.3 ppbであった。50 ppbの NO_2^- の繰り返し測定では相対標準偏差0.9%と良好な精度であった。試料を注入後、約4.5秒でピークが出現し、最大ピーク時間は7.0秒程度である。キャリアーオーバーを考慮しても1試料当たり2分で十分迅速な分析が可能である。ある程度の長い時間にわたって分析が行われる場合や、長時間のモニタリングにおいては本分析システムにおいても正確を期すためのキャリブレーションが必要である。そこで本システムではFig.1におけるバルブ（V2）を使って標準溶液を注入する方式をとった。したがって、ラインに何ら影響や中断による分析の妨げにならずに簡単にキャリブレーションが随時行えるという大きな特色がある。

4.5 共存イオンの影響

100ppbの NO_2^- に種々の他種イオンを共存させた試料溶液を調製し、それらの溶液

を注入して得られたピーク高さとNO₂⁻単独の溶液のピーク高さを比較し、その比が95%以上であれば影響ないものとして、まとめた結果をTable 1に示した。

Table 1 Effect of diverse ions

Ion added	Tolerance levels(ppm)
Ca(II), Mg(II), SO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ ,	> 20
Cu(II), Al(III), Mn(II)	5
Zn(II), Pb(II), Co(II), Ni(II), Cr(III), V(V), Mo(VI), W(VI)	1
Fe(III) *	0.2

* 1×10^{-3} M EDTA was added.

鉄(III)は0.1 ppm以上では正の誤差を与えた。これは鉄(III)もこの反応に対して触媒作用を持つためと考えられる。そのためにEDTAによるマスキングを検討した。その結果、 1.0×10^{-3} M EDTAの添加により0.2 ppmの鉄の影響を除くことができた。このように通常の自然水中に共存が予想される成分レベルではほとんど影響がないことがわかった。しかしながら、海水中のNO₂⁻のモニタリングを考えるとCa(II), Mg(II), SO₄²⁻などのイオンの量はTable 1に検討したレベルよりもはるかに大量の共存の影響を考慮する必要がある。そこでまず、人工海水(模擬海水)を使ってそれらの影響を検討した。人工海水(模擬海水)を共存させた場合には約28%の負の影響が見られた。人工海水(模擬海水)中の各成分を単独で共存させてその影響を調べた結果、20,000 ppmの塩化ナトリウムでは15%、400 ppmのCa²⁺では20%、1,300 ppmのMg²⁺では8%のいずれも負の影響が見られたことから、これらが複合した影響となったものと考えられる。キャリアーに10⁻² M EDTAとpH7.2の緩衝液を加えたところ、Caが一部マスキングされたためか人工海水の影響は小さくなったが15%程度の影響は依然として残った。したがって、海水に適用する場合には感度の低下を覚悟の上で海水組成に近い人工海水、あるいは塩化ナトリウムと10⁻² M EDTA (+ pH7.2の緩衝液)をキャリアーに使うか必要があることがわかった。

4.6 NO₃⁻の光還元

NO₃⁻の定量のためにNO₂⁻への還元が行われるが、殆どの場合、前述のようにCd/Cuを詰めたカラムが用いられている。本研究では有害なこれらの金属を使わない還元方法として紫外線による光還元反応の可能性について検討した。NO₃⁻は紫外線照射によりNO₂⁻に変換され^{7) 8)}、水溶液中での全体の反応は、NO₃⁻ → NO₂⁻ + 1/2 O₂ , で表わされることも報告されている。この光還元のNO₃⁻定量への応用の可能性についてはすでにTakeda⁹⁾及びMotomizuら¹⁰⁾により検討され、EDTAの共存とpH 6以上が還元効率を高めるのに有効なことが報告されている。しかしながら、まだ検討例が少なく最適条件は確率されていないようなので、これらの研究報告を参考にしながら1.0ppmNO₃⁻溶液を用いて本研究に適切な反応条件やフロー条件について検討した。pH6.2から9.2の範囲で実験したところ確かにEDTAの添加(1.0 x 10⁻³ M)による還元率の増大効果が認められた。EDTAは試料溶液中の金属イオンのマスキング効果も期待されるのでそれを積極的に用いることにした。pHは7.2よりも9.2のほうが20%程度高い還元効率であったが、PCと過酸化水素の反応は酢酸酸性で行うため、あまり高いpHの緩衝液を使うことはその検出反応への影響が出ることも考えて、pH7.2付近で実験した。リン酸塩緩衝液も有効との報告もあるが、それをトリス緩衝液に変えたら2倍近い還元効率の増加が認められた。このようなことから、本研究では光還元の際のアクチベーターとして1.0 x 10⁻³ M EDTA, 1 x 10⁻² Mトリス緩衝液 (pH7.2) を用いることとした。キャリアーの流速を一定として光還元コイルの長さを1 mから1.5mと長くすると約1.5倍のピーク高さとなり、還元率は向上したが、さらに2 mにあけてもわずか10%程度の増加であった。また、キャリアーの流速が100から120、150、200 μl/minへと増加すると反応時間が短くなるためかピーク高さはそれぞれ60%、45%、25%と減少した。流速は小さい程還元効率は高い結果であったが、単流路の場合とちがって流路を二つに分ける場合は分析時間が長くなるのでキャリアー流速は120 μl/minに大きくした。流路を二つに分けてNO₂⁻とNO₃⁻を同時定量しようとする際、試料プラグをバランスよく分かれて両者のピークが分離されるようにそれぞれのコイル長さを設定する必要があるが、Fig.1に示すように光還元用のコイルを1m、還元器を通らない方のコイルを30 cmすることがピークの分離と測定時間などの兼ね合いで適当であった。海水の分析を想定して0.5 Mの塩化ナトリウム共存の試料溶液

(NO_2^- または NO_3^- を個別に含む) を注入した場合のシグナル例をFig. 6 に示した。良好なピークの分離がえられているが試料溶液が二つに分かれるために NO_2 の感度はやや低下している。 NO_3^- のピーク(NO_2^- に還元された)ピークが現われるまでに約5分かかり、同時定量的場合には迅速定量をある程度犠牲にしなければならない結果となった。上記条件での還元効率は約65%であり、検量線は0~3ppmの範囲で直線関係が得られた。

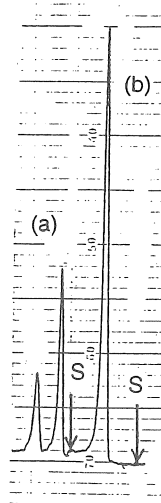


Fig.6 Typical signal traces for (a)0.1 ppm nitrite and (b)1.0 ppm nitrate
S:sample injection

4.7 自然水の分析

本分析システムを用いて山梨県内の河川水を分析した。荒川及び相川の水では NO_2^- としてそれぞれ36.7ppb、および50.9ppbであり、相対標準偏差はいずれとも1%以下で良好な精度で分析することができた。手近なところに海水試料がなかったので、特級の塩化ナトリウムの0.5M溶液を分析したが NO_2^- は検出下限以下であった。また、この塩化ナトリウム溶液に標準の NO_2^- 30ppb、および50ppb添加した場合の回収率は両者とも95%以内であった。一般に自然水中の NO_2^- 濃度は0.1ppm以下のものが多いとされるが、本法の感度はそれに十分対応出来るものである。

5. 今後の課題

フローインジェクションを応用した海水溶存成分のオンサイト分析法の基礎的な研究の先ず最初の取り組みとして NO_2^- や NO_3^- の簡易迅速定量を取り上げた。CP- H_2O_2 系触媒反応と連続流れ検出を直結した、反応と検出の一体化により感度、精度、迅速性、簡便性ともにオンサイト分析法としての要件を備えた新しい連続計測システムの構築が可能であることを明らかにすることができた。ただ、時間切れにより実際の海水を分析し、実際への応用例をしめすことが出来なかったのが残念である。また、ハードの面、いわゆるコンパクトな検出器の開発とコンピュータコントロールされたシステムまでは手が届かなかったので、これらが今後に残された大きな課題といえる。

引用文献

- 1) J. Ruzicka, E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis", 2nd ed., p.257, John Wiley and Sons, New York (1988).
- 2) D. F. Boltz, J. A. Howell, "Colorimetric Determination of Nonmetals", p.204, John Wiley & Sons, New York (1978).
- 3) M. A. Kouparis, K. M. Walczak, H. V. M. Malmstadt, *Analyst*, 107, 1309 (1982).
- 4) JIS K 0104 (1984). JIS K 0102 (1993).
- 5) A. Kierczenko, *Farm. Pol.*, 22, 583 (1966); *Chem. Abstr.*, 66, 3900 (1967).
- 6) B. Liang, M. Iwatsuki, T. Fukasawa, *Analyst*, 119, 2113 (1994).
- 7) M. Daniels, R. V. Meyers, E. V. Belardo, *J. Phys. Chem.*, 72, 389 (1968).
- 8) U. Shuali, M. Ottolenghi, J. Rabani, Z. Yeling, *J. Phys. Chem.*, 73, 3445 (1969).
- 9) K. Takeda, K. Fujiwara, *Anal. Chim. Acta*, 276, 25 (1993).
- 10) S. Motomizu, M. Sanada, *Anal. Chim. Acta*, 308, 406 (1995).

Continuous flow system(FIA) for on-site analysis and continuous monitoring for dissolved constituents in sea water

Takeshi YAMANE and Masae Hirata(Department of Chemistry, Faculty of Education and Human Sciences, Yamanashi University)

Summary

A new continuous flow system for nitrite and nitrate nitrogen determination in sea water is presented as a prototype tool which is applicable to on-site analysis and/or continuous monitoring. In order to achieve highly sensitive and rapid detection of nitrite, nitrite-catalyzed oxidation of chlorpromazine with hydrogen peroxide in acetic acid medium was employed which was directly in-line coupled with spectrophotometric detection at 528 nm in a continuous flow system. No complicated manual operation was needed and glass apparatus such as beaker, flask, and pipets usually required for analysis was omitted because most analytical operations were done automatically in a narrow bore tubing system. Those must be important requirements for realizing on-site analysis. Under the optimum conditions established, a linear calibration graph was obtained in the range 0~120 ppb nitrite. The relative standard deviation was 0.9% for 50 ppb nitrite and the limit of detection was 0.3ppb (S/N=3). Only about 90sec is needed for analysis of one sample. The photo-chemical reduction of nitrate to nitrite in a continuous flow system was also described.