

助成番号 10113

## キャピラリーゾーン電気泳動法による海水中の亜硝酸および硝酸イオンの高感度定量法の開発

Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Nobuhiro Ishio<sup>2</sup><sup>1</sup>Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine<sup>2</sup>College of Analytical Chemistry, Japan

【緒言】我々は、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)による海水中の亜硝酸、硝酸イオンの高感度同時定量法を確立するために、人工海水(pH 7.9)を泳動液(BGE)とし、一時的等速電気泳動(TTTP)を利用したオンライン濃縮法について検討してきた。今回、本法の高感度化をめざし、TTTPを効果的に利用するための条件について詳細に検討した。

【実験】TTTPを効果的に引き起こして亜硝酸、硝酸イオンの検出限界を下げるために、希釈した試料の大量導入効果、最適なターミナルイオンの種類やその導入法について調べた。また、ターミナルイオンは通常一種類しか用いないが、二種類同時に用いた場合の効果およびそれら濃度の影響についても検討した。本法を海水中の栄養塩類分析のための標準試料(National Research Council of Canadaより入手したMOOS-1)中の亜硝酸、硝酸イオン定量に応用した。また、pH 7.9の人工海水泳動液では、亜硝酸と硝酸イオンの実効移動度が接近しているため、分離の面から試料導入量を増加することができないが、より低いpH領域の泳動液を用いれば、亜硝酸イオンの実効移動度が減少するため、試料導入量の増加が期待できる。そこで現在、低pH領域の人工海水泳動液を用いた場合の亜硝酸、硝酸イオンの最適分離定量条件についても検討中である。

【結果と考察】10倍希釈した試料に、第一ターミナルイオンとして150 mM硫酸イオン、第二ターミナルイオンとして10 mM臭素酸イオンを添加し25 s導入する方法がもっとも高い濃縮効果を得ることができた。本法による亜硝酸、硝酸イオンの検出限界は、それぞれ2.2 µg/Lおよび1.0 µg/Lであった。また亜硝酸、硝酸イオンのピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の相対標準偏差はそれぞれ1.9, 1.9, 0.11%以下であった。検量線を作成したところ、ピーク面積、ピーク高さのどちらを用いた場合でも直線性のよいものが得られた。TTTPによる濃縮効果により、MOOS-1中の亜硝酸イオンピークを検出することができ、TTTPを用いた場合の硝酸イオンのピーク高さはTTTPを用いなかった場合と比べて4倍高かった。本法によるMOOS-1中の亜硝酸、硝酸イオンの合計濃度は、ピーク面積およびピーク高さのどちらを用いた場合でも許容範囲内であったが、ピーク面積を用いた場合の亜硝酸イオン定量結果は、許容範囲外となる場合もあった。pH 3.0の人工海水泳動液を用いてMOOS-1を分析したところ、亜硝酸、硝酸イオンとも検出限界(LOD)がかなり改善されることがわかった。



## 13

助成番号 0113

キャピラリーゾーン電気泳動法による海水中の亜硝酸および  
硝酸イオンの高感度定量法の開発

助成研究者：福士 恵一（神戸商船大学 船貨輸送研究施設）

共同研究者：石尾 暢宏（日本分析化学専門学校）

## 1. 研究目的

環境白書によれば、我が国周辺海域における赤潮発生確認件数は、一時期に比べれば減少しているものの高い値を示している。また火力発電所等では、大量に発生したクラゲによる冷却海水系統の閉塞問題に対する対策に頭を悩ませている。これらは依然として海水の富栄養化が進行中であることを示している。したがって海水中の栄養塩類を定量することは、富栄養化防止の観点から重要である。しかし海水中の栄養塩類の一つである亜硝酸および硝酸イオンの簡単で高精度、高感度な同時定量法は確立されていない。

最近、製薬や生体関連物質等の分析に幅広く使用されているキャピラリー電気泳動法（CE）は、他の分離分析法にはみられない高分離能を有するが、海水等の環境水分析にはまだ実用的に用いられていない。これは、他の分離分析法と同様に、海水中に含まれる多量の塩分がCEにとって妨害となることおよびCEの濃度感度が低いことに由来する。

我々は、CEの中でイオン分析に用いられるモードであるキャピラリーゾーン電気泳動法（CZE）の海水分析への応用に関する研究を続けてきており<sup>1-3)</sup>、人工海水（pH 7.9）を泳動液（BGE）とすれば、海水のように高濃度塩分試料でもその影響を受けずに臭化物、亜硝酸、硝酸イオンが簡単に高精度で同時定量できることを見いだした<sup>4)</sup>。ついで、人工海水を泳動液とするCZEにおいて泳動の初期に一時的等速電気泳動（TITP）状態を引き起こすことにより、亜硝酸および硝酸イオンの検出限界をそれぞれ1.3および2.3倍低下できることを見だし<sup>5)</sup>、海水等環境水中のこれらイオンの定量に応用した<sup>6)</sup>。その結果、本法をより実用的な方法とするためには、高感度化についてさらに検討する必要があることがわかった。

そこで本研究では、TITPを引き起こすために最適なターミナルイオンの種類や希釈した試料の大量導入効果について調べた。また、ターミナルイオンは通常一種類しか用いられないが、二種類同時に用いた場合の効果についても検討した。本法を海水中の栄養塩類分析のための標準試料（National Research Council of Canadaより入手したMOOS-1）中の亜硝酸および硝酸イオン定量に応用した。現在、試料導入量の増加が期待できる低pH領域の人工海水泳動液を用いた場合の亜硝酸および硝酸イオンの最適分離定量条件について検討中である。

## 2. 研究方法

### 2. 1 キャピラリー電気泳動法の概要

Fig. 1 にキャピラリー電気泳動装置の概略を示す。まず左右の泳動液容器と内径 50~100  $\mu\text{m}$  のフーズドシリカ製キャピラリーに泳動液 (BGE) を満たす。ついで右側のキャピラリー端を試料容器に挿入し、左側の泳動液容器側を減圧し、試料をキャピラリー内に吸引する。右側のキャピラリー端を再び泳動液容器に戻し、高電圧電源により、左右の泳動液容器中の電極に高電圧を印加する。試料中

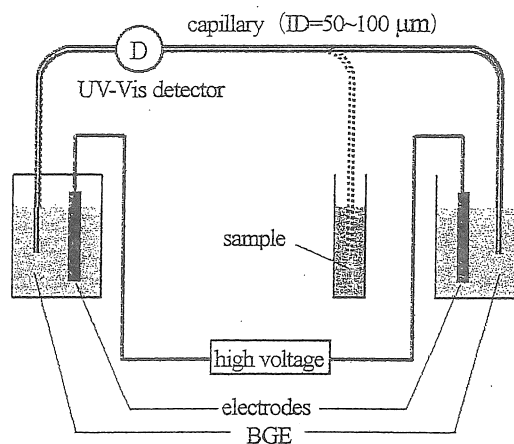


Fig. 1. Basic schematic of an CE instrument. BGE, background electrolyte.

の各成分は、キャピラリー内で生成する電気浸透流 (EOF) 及び電気泳動によりキャピラリー内を移動し、電気泳動移動度の違いによって分離され、吸光度検出器により検出される。通常、EOF は陽極から陰極に向かって流れ、その大きさは電気泳動移動度より大きい。が、亜硝酸及び硝酸イオンの電気泳動移動度は比較的大きいため、本研究では EOF が陰極から陽極に向かうように調整 (EOF の反転) している。

本法は、キャピラリー断面における泳動液の流速がほぼ均一であるため、高い分離能を有する。一方、キャピラリー内径が光路長となるため、濃度感度が十分でないという欠点がある。この欠点を補うため、各種オンライン濃縮法が提案されているが、今回用いた TITP もその一つである。

### 2. 2 一時的等速電気泳動 (TITP) によるオンライン濃縮

泳動液あるいは試料中に試料イオンより大きな実効移動度を持つイオン (リーディングイオン) 及び試料イオンより小さな実効移動度を持つイオン (ターミナルイオン) が含まれていると、CZE 分離の初期に TITP 状態が起こり、試料成分ゾーンが濃縮される。TITP による試料イオンの濃縮過程を Fig. 2 に示す。2) に示すように、リーディングイオン (L)、試料イオン (S)、ターミナルイオン (T) は、試料ゾーンと泳動液 (BGE) ゾーンの境界に移動し、そこで過渡的に等速電気泳動 (ITP) 状態が発生し、試料イオンは濃縮される。ITP 状態が終了すると 3) に示す CZE に移り、これらイオンは異なった速度で移動し、試料イオンは検出器で検出される。

### 2. 3 試薬

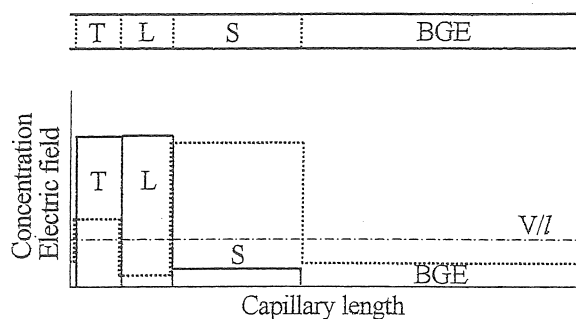
試薬はすべて特級品をそのまま用いた。ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、はナカライテスク (京都)、塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC)、臭化ジラウ

リルジメチルアンモニウム (DDAB) は東京化成工業から購入した。亜硝酸、硝酸イオン標準溶液 (0.02-1.0 mg/L) は, 1000 mg/L の硝酸カリウム (和光純薬, 大阪) 溶液, 亜硝酸ナトリウム (ナカライテスク) 溶液から調製した。イオン交換-蒸留水は, ヤマト科学 (東京) 製 WG220 型蒸留水製造装置および日本ミリポア工業製 Milli-QII システムより得られたものを使用した。人工海水は, JIS 法<sup>7)</sup>に基づいて調製した。人工海水組成を Table 1 に示す。泳動液や試料溶液等は, 使用前に 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターで濾過した。海水中の栄養塩類分析のための標準試料 MOOS-1 は, National Research Council of Canada (NRC, Ottawa, Canada) より入手した。これは, Canada, Nova Scotia 州, Cape Breton 島の沖合, 水深 200 m から 0.05  $\mu\text{m}$  のフィルターを通して採取され (1996 年 6 月 24 日), ボトルに詰められ (1996 年 7 月 11, 12 日),  $\gamma$  線を照射された (1996 年 7 月 16 日) ものである。

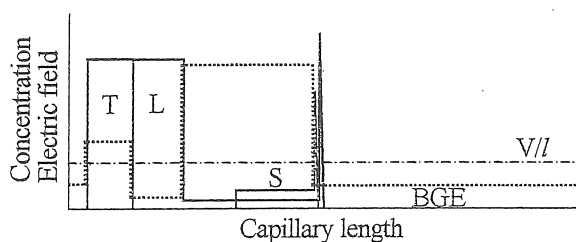
## 2. 4 装置

キャピラリー電気泳動装置は, パーキンエルマー社 (Foster City, CA, USA) 製モデル 270A-HT を使用した。検出器として紫外-可視吸光検出器を用いた。キャピラリー (GL サイエンス, 東京) の内径は 75  $\mu\text{m}$  であり, 検出波長は 210 nm, 恒温槽の温度は 30  $^{\circ}\text{C}$  に設定した。泳動時間, ピーク面積, ピーク高さは, 日立 (東京) 製モデル D-2500 クロマトインテグレータを用いて測定した。pH 測定には, ユニカムアナリティカルシステムズ社 (Cambridge, UK) 製 PW9421 型 pH メーターを使用した。

### 1) Sample injection



### 2) Preconcentration process



### 3) CZE

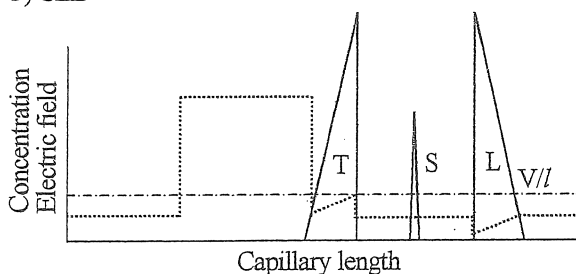


Fig. 2. Schematic preconcentration process of transient ITP. T, terminating ion; L, leading ion; S, sample ion; BGE, background electrolyte;  $V/l$ , applied voltage;  $l$ , capillary length; solid line, concentration; dotted line, electric field. Reproduced from Ref. 8) with permission of Dr. Hirokawa.

## 2. 5 操作法

Table 1. Composition of artificial seawater

## 2. 5. 1 pH 7.9 の人工海水泳動液

キャピラリーとして全長 97 cm, 検出器までの長さ(有効長) 75 cm のものを使用した。新しいキャピラリーは、使用前に 1 M 水酸化ナトリウムで 40 min, 純水で 10 min 洗浄し、その後、泳動液を 3 min 流した。泳動液として、臭化物イオンを含まない人工海水に EOF を反転するために、3 mM CTAC 添加したもの (pH 7.9) を使用した。濾過した MOOS-1 を 10 倍に希釈し、ター

Component	Concentration, g/L
NaCl	24.54
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	11.10
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.09
CaCl <sub>2</sub>	1.16
KCl	0.69
NaHCO <sub>3</sub>	0.20
KBr	0.10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.03
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.04
NaF	0.003

ミナルイオンとして硫酸イオン 150 mM, 臭素酸イオン 10 mM を添加した。試料を 25 s 吸引し(約 390 nL), 電圧を 11 kV 印加した。得られたピーク面積及びピーク高さを用いて、試料中の亜硝酸及び硝酸イオン濃度を求めた。なお、再現性の良い結果を得るために、毎分析時、水を 2 min 流してキャピラリー内を洗浄した。

## 2. 5. 2 低 pH 人工海水泳動液

pH 3 付近の泳動液を用いれば、亜硝酸イオンの移動度が減少し、亜硝酸イオンと硝酸イオンの移動度差が大きくなるため、試料導入量の増加が期待される。現在、最適分析条件については詳細に検討中であるが、以下の条件で、MOOS-1 を分析した。キャピラリーとして全長 72 cm, 検出器までの長さ(有効長) 50 cm のものを使用した。泳動液を流す前に、EOF を反転するために、0.1 mM DDAB を 3 min 流した。泳動液として、リン酸及びリン酸二水素一ナトリウム(全濃度 40 mM) で pH 3.0 に調整した臭化物イオンを含まない人工海水を用いた。泳動液を 3 min 流した後、濾過した MOOS-1 を 4 s (約 80 nL), ターミナルイオンとして 600 mM 酢酸ナトリウムを 25 s 吸引し、電圧を 8 kV 印加した。

## 3. 研究結果と考察

## 3. 1 試料希釈の効果

電気伝導度が BGE の電気伝導度より低い試料を多量に導入することにより、イオン強度の差に由来するスタッキングが起こることが知られている。一方、試料中にターミナルイオンを添加する場合、試料はある程度希釈される。そこで、TITP に対する試料希釈の影響について検討した。試料として、10 mg/L 臭化物イオン、1.0 mg/L 亜硝酸イオン、1.0 mg/L 硝酸イオン、250 mM 塩素酸イオンを含む人工海水を 2.5 s 装置に導入した。我々は以前、TITP を用いた亜硝酸および硝酸イオンの定量において、ターミナルイオンとして塩素酸イ

オンがもっとも効果的であることを見いだしている<sup>9)</sup>。また、亜硝酸および硝酸イオンの濃縮率は、亜硝酸イオンと塩素酸イオン、あるいは硝酸イオンと塩素酸イオンのベースライン分離が達成される範囲内において、キャピラリーに導入される塩素酸イオンの量が増加するにつれて増大した<sup>9)</sup>。これは、キャピラリーに導入される塩素酸イオン量が多ければ多いほど TITP 状態を長く保つことができるからである<sup>9,10)</sup>。しかし濃縮されたゾーンが検出器に到達する直前に、TITP 状態は解除されなければならない。以上のことから、ここでは 250 mM 塩素酸イオンをターミナルイオンとして用いた。また、上記試料を 10 倍希釈し、25 s 導入した。得られた結果より、塩素酸イオンを含まない試料を用いた場合の各ピーク高さに対するピーク高さの比を求めた。試料を希釈した場合、臭化物イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオンのピーク高さ比はそれぞれ 1.0, 1.3, 2.4 であり、試料を希釈しなかった場合のピーク高さ比(それぞれ 0.98, 1.3, 2.1) よりわずかに大きかった。したがって以下の実験では、10 倍希釈した試料を用いることとした。

### 3. 2 二種類のターミナルイオンの効果

通常 TITP を引き起こすためには、一種類のターミナルイオンが用いられる。我々は予備実験において、ターミナルイオンよりさらに実効移動度の小さな他のイオンを、すでに最大限にターミナルイオンを含んだ試料溶液に添加できることを見いだした。ターミナルイオンのみを最大濃度を超過して添加した場合には、硝酸イオンとターミナルイオンとのベースライン分離は達成されなかったが、二種類添加の場合には、ベースライン分離された。そこで、TITP に対する第二のターミナルイオンの効果について検討した。以下の三種類の試料溶液を調製し、分析した：臭化物イオンを 1.0 mg/L、亜硝酸イオンを 0.1 mg/L、硝酸イオンを 0.1 mg/L、塩素酸イオンを 25 mM 含む人工海水を 10 倍希釈したもの；25 mM 塩素酸イオンの代わりに 40 mM 臭素酸イオンを含む同様の試料；25 mM 塩素酸イオンと 40 mM 臭素酸イオンを含む同様の試料。ここで、塩素酸イオンを第一ターミナルイオンと呼び、実効移動度が塩素酸イオンより小さな臭素酸イオンを第二ターミナルイオンと呼ぶことにする。塩素酸イオン濃

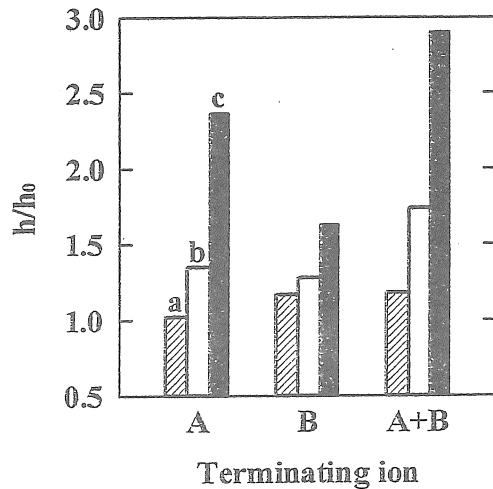


Fig. 3. Effect of additional terminating ion on the peak height for bromide, nitrite, and nitrate. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{tot} = 97$  cm,  $L_{det} = 75$  cm, ID 75  $\mu$ m; BGE, artificial seawater without Br<sup>-</sup> containing 3 mM CTAC; voltage, -11 kV; wavelength for detection, 210 nm. Sample, 10-times diluted artificial seawater containing 1.0 mg/L Br<sup>-</sup>, 0.1 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 0.1 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and terminating ion; vacuum injection period, 25 s. h, peak height;  $h_0$ , peak height for the sample solution without terminating ion; A, ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>; B, BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>; a, Br<sup>-</sup>; b, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; c, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

度 25 mM は、硝酸イオンと塩素酸イオンとがベースライン分離できる最大濃度である。同様に臭素酸イオン 40 mM というのは、塩素酸イオンと臭素酸イオンとが同時に用いられた場合、硝酸イオンと塩素酸イオンとがベースライン分離できる最大濃度である。結果を Fig. 3 に示す。塩素酸イオンを第一ターミナルイオン、臭素酸イオンを第二ターミナルイオンとした場合、亜硝酸および硝酸イオンのピーク高さ比は、ターミナルイオンを一種類用いた場合のピーク高さ比より大きかった。同様の効果は、以下の文献において報告されている。Křivánková ら[11]は、二種類のスタッキング主要成分がリーディングイオン（あるいはターミナルイオン）として、以下の条件を満たしているならば、より強い ITP 効果が期待できることを述べている。 $u_{A1} > u_{A2} > u_{Xn} > u_C$  あるいは  $u_C > u_{Xn} > u_{B1} > u_{B2}$ 、ここで  $u_{A1}$ ,  $u_{A2}$ ,  $u_{Xn}$ ,  $u_C$ ,  $u_{B1}$ ,  $u_{B2}$  はリーディングイオン、分析目的イオン、BGE 共通イオン、ターミナルイオンの実効移動度である。また Gebauer ら[12]は、モデル血清の分析やコンピュータシミュレーションによって、第二のスタッカーである塩化物イオンの効果について実証した。我々の場合は後者に、Gebauer らの場合は前者に相当する。

### 3. 3 ターミナルイオンの種類

CZE 分離の初期に TITP 状態を引き起こすためには、リーディングイオンとターミナルイオンが試料溶液あるいは BGE 中に含まれていなければならない。人工海水 BGE の場合には、BGE 中の塩化物イオンがリーディングイオンとして働くことが推察される。したがって、ターミナルイオンを試料溶液あるいは BGE 中に添加しなければならない。今回のように試料溶液を 10 倍希釈する場合には、試料溶液中にターミナルイオンを添加する方が都合がよい。我々は今までに、ターミナルイオン量が同じならば、ターミナルイオンとして塩素酸イオンがもっとも有効であることを見いだしている。しかし、ターミナルイオンの有効性を正確に比較する場合、ターミナルイオン量は、硝酸イオンと分離できる程度に最大でなければならない。そこで、TITP をより効果的に引き起こすターミナルイオンを見いだすために、塩素酸イオンを含めて数種類の陰イオンについて検討した。結果を Fig. 4 に示す。これら陰イオン濃度は、以下の通りである：硫酸イオン, 150 mM; チオ硫酸イオン, 10 mM; 塩素酸イオン, 25 mM; 臭素酸イオン, 200 mM。Fig. 4 の縦軸の値は、各イオンのピーク高さ

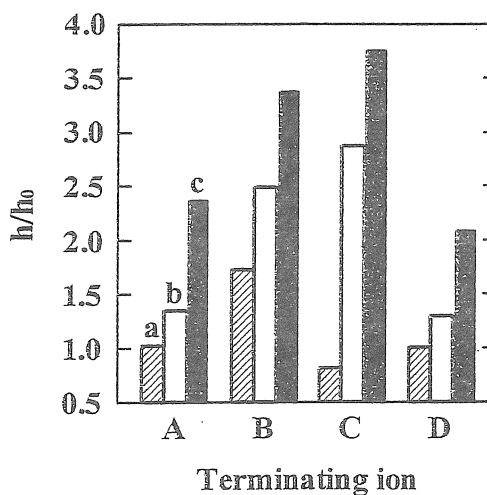


Fig. 4. Effect of kind of terminating ion on the peak height for bromide, nitrite, and nitrate. A,  $\text{ClO}_3^-$ ; B,  $\text{BrO}_3^-$ ; C,  $\text{SO}_4^{2-}$ ; D,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Electrophoretic conditions as in Fig. 3. Sample, vacuum injection period and other symbols as in Fig. 3.



を含まない場合のピーク高さとの比である。Fig. 4 から明らかなように、亜硝酸、硝酸イオンに対して硫酸イオンがもっとも効果的なターミナルイオンであった。一般に、計算結果(広島大学、廣川教授による)によると、亜硝酸、硝酸および他の陰イオンの実効移動度( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )は、以下の通りである: 亜硝酸イオン,  $74.6 \times 10^{-5}$ ; 硝酸イオン,  $74.1 \times 10^{-5}$ ; 硫酸イオン,  $82.9 \times 10^{-5}$ ; チオ硫酸イオン,  $88.1 \times 10^{-5}$ ; 塩素酸イオン,  $67.0 \times 10^{-5}$ ; 臭素酸イオン  $57.8 \times 10^{-5}$ 。硫酸イオンの実効移動度は、亜硝酸や硝酸イオンの実効移動度より大きいいため、硫酸イオンはターミナルイオンとして作用しないように思われる。しかしこの場合は、カルシウムイオンとの錯形成<sup>13)</sup>により、硫酸イオンの実効移動度が減少したため、硫酸イオンがターミナルイオンとして作用できたものと思われる。チオ硫酸イオンの実効移動度も同様の理由により減少したものと考えられる。

### 3. 4 第二ターミナルイオン濃度の影響

TITP に対する第二ターミナルイオン濃度の影響について検討するために、臭化物イオンを 1.0 mg/L, 亜硝酸イオンを 0.1 mg/L, 硝酸イオンを 0.1 mg/L, 第一ターミナルイオンとして硫酸イオンを 150 mM, 第二ターミナルイオンとして臭素酸イオンを 0-20 mM 含む 10 倍希釈人工海水を分析した。得られた結果より、各イオンのピーク高さと臭素酸イオンを含まない場合のピーク高さの比を計算した。各イオンのピーク高さ比は、臭素酸イオン濃度とともに増加したが、3. 2 で述べた塩素酸イオンと臭素酸イオンの組み合わせの場合と比較して、第二ターミナルイオンの効果は大きくなかった。臭素酸イオン濃度が 10 mM より高い場合、硝酸イオンと硫酸イオンとの境界が不明確になったので、最適な臭素酸イオン濃度として 10 mM を採用することとした。

### 3. 5 検量線

硫酸イオンを 150 mM, 臭素酸イオンを 10 mM 含む 10 倍希釈人工海水を用いて臭化物、亜硝酸、硝酸イオンの標準溶液を調製し、検量線を作成した。その結果、ピーク面積、ピーク高さのどちらを用いた場合でも直線性のよい検量線が得られた。ピーク面積を用いた場合の臭化物 ( $x$ , 0-0.1 mg/L), 亜硝酸 ( $x$ , 0-0.01 mg/L), 硝酸イオン ( $x$ , 0-0.1 mg/L) の検量線は、 $y=1.79 \times 10^4 x - 4$  (0.9998),  $y=2.15 \times 10^5 x + 85$  (0.9971),  $y=2.96 \times 10^5 x + 1130$  (0.9997) であり、ピーク高さを用いた場合は、 $y=1.74 \times 10^3 x$  (1.0000),  $y=6.49 \times 10^4 x + 13$  (0.9991),  $y=1.17 \times 10^5 x + 458$  (0.9996) であった。本法の相対標準偏差 (RSD) と検出限界 (LOD) を Table 2 に示す。本法による亜硝酸、硝酸イオンの LOD は、イオンクロマトグラフィー (IC) による伊藤ら<sup>14)</sup>によって得られた LOD (亜硝酸イオン 1.2  $\mu\text{g/L}$ , 硝酸イオン 1.8  $\mu\text{g/L}$ ) とほぼ同様であった。また Hu ら<sup>15)</sup>は IC により、硝酸イオンの LOD として 0.12  $\mu\text{g/L}$  を得た。しかし、人工海水試料では問題ないが、実際の海水分析では、硝酸イオンと臭化物イオンとはベースライン分離されていない。

Table 2. Precision and detection limit of determination of bromide, nitrite and nitrate

	RSD (%)				LOD ( $\mu\text{g/L}$ , $S/N=3$ )			
	Area		Height		Time			
$\text{Br}^-$	2.6 <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	3.3 <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	0.20 <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	77 <sup>a)</sup>	(75 <sup>d)</sup> )
$\text{NO}_2^-$	1.9	9.7	1.7	3.4	0.11	0.080	2.2	(6.8)
$\text{NO}_3^-$	1.4	4.3	1.9	2.0	0.11	0.078	1.0	(4.4)

- a) Sample: 10-times diluted artificial seawater containing 0.5 mg/L  $\text{Br}^-$ , 0.05 mg/L  $\text{NO}_2^-$ , 0.05 mg/L  $\text{NO}_3^-$ , 150 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , and 10 mM  $\text{BrO}_3^-$ , eight determinations  
 b) Sample: 10-times diluted artificial seawater containing 0.05 mg/L  $\text{Br}^-$ , 0.005 mg/L  $\text{NO}_2^-$ , 0.005 mg/L  $\text{NO}_3^-$ , 150 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , and 10 mM  $\text{BrO}_3^-$   
 c) Sample: 10-times diluted artificial seawater containing 0.1 mg/L  $\text{Br}^-$ , 0.01 mg/L  $\text{NO}_2^-$ , 0.01 mg/L  $\text{NO}_3^-$ , 150 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ , and 10 mM  $\text{BrO}_3^-$   
 d) Sample: 10-times diluted artificial seawater containing 0.2 mg/L  $\text{Br}^-$ , 0.02 mg/L  $\text{NO}_2^-$ , and 0.02 mg/L  $\text{NO}_3^-$   
 e) Electrophoretic conditions as in Fig. 3

### 3. 6 MOOS-1 の分析

本法により, MOOS-1 中の亜硝酸, 硝酸イオンを定量した. 結果を Table 3 に示す. 測定は各ボトルについて 3 回ずつ行った. 本法による亜硝酸イオンと硝酸イオンの合計濃度は, ピーク面積およびピーク高さのどちらを用いた場合でも許容範囲内であった. 一方, ピーク高さを用いた場合の亜硝酸イオン定量結果は, すべてのボトルにおいて許容範囲内であったが, ピーク面積を用いた場合には, No. 1 と No. 2 ボトルについては許容範囲外であった. これは MOOS-1 中の亜硝酸イオン濃度が本法の LOD に近いためである. MOOS-1 を分析したときのエレクトロフェログラムを Fig. 5 に示す. TITP による濃縮効果により, 亜硝酸イオンのピークを検出することができた.

また, TITP を用いた場合の硝酸イオンのピークは, より鋭く, その高さは TITP を用いなかった場合と比べて 4 倍高かった. 一般に, 沿岸海水の塩分は, 河川水等の影響により変化する. そこで, MOOS-1 を試料として, 亜硝酸, 硝酸イオンの CZE パラメータ (ピーク面積, ピーク高さ, 泳動時間) に対する塩分の影響を調べた. その結果, 本法では塩分の影

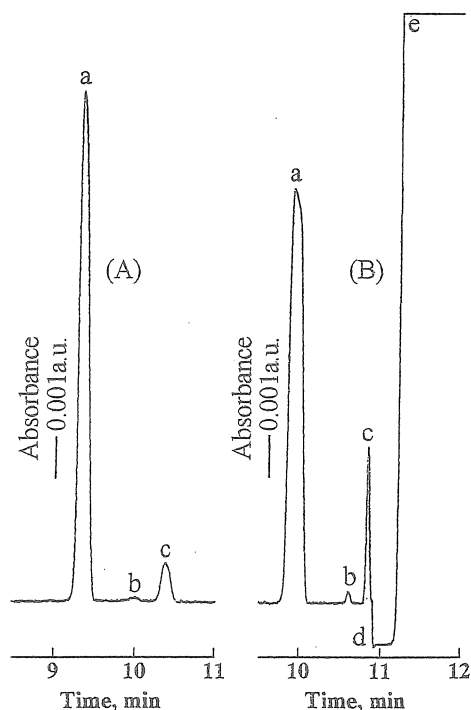


Fig. 5. Electropherograms of MOOS-1. (A) Sample, 10-times diluted MOOS-1; vacuum injection period, 25 s. (B) Sample, 10-times diluted MOOS-1 containing 150 mM sulfate and 10 mM bromate. a,  $\text{Br}^-$ ; b,  $\text{NO}_2^-$ ; c,  $\text{NO}_3^-$ ; d,  $\text{SO}_4^{2-}$ ; e,  $\text{BrO}_3^-$ . Electrophoretic conditions as in Fig. 3.

響はないことがわかった。したがって本法では、ピーク面積、ピーク高さどちらの検量線を用いても試料溶液の塩分にかかわらず海水中の亜硝酸、硝酸イオンが定量できる。

Table 3. Analytical results for nitrite and nitrate in MOOS-1<sup>a)</sup>

Bottle No.	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> +NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)
1	0.0496±0.0041 <sup>b)</sup>	0.283±0.0050	0.333±0.009
	0.0419±0.0011 <sup>b)</sup>	0.282±0.0035	0.324±0.005
2	0.0400±0.0023	0.269±0.0021	0.309±0.004
	0.0397±0.0018	0.268±0.0017	0.308±0.004
3	0.0429±0.0105	0.276±0.0021	0.319±0.013
	0.0407±0.0008	0.272±0.0029	0.313±0.004
Assigned tolerance interval	0.0386±0.0081	—	0.325±0.034

f) MOOS-1, a proposed certified reference material for nutrients in seawater distributed by NRC

g) Upper and lower values were calculated by triplicate analyses using peak area and peak height, respectively

h) Electrophoretic conditions as in Fig. 3

### 3. 7 低 pH 人工海水泳動液による MOOS-1 の分析

LOD をさらに低下するためのもっとも簡単な方法は、より多くの試料を導入することである。そこで pH 3.0 の人工海水泳動液を用いて、MOOS-1 を分析した (Fig. 6)。Fig. 5 と比較すると、亜硝酸、硝酸イオンとも LOD がかなり改善されていることがわかる。低 pH 人工海水泳動液を用いた場合の各種分析条件について、現在、詳細に検討中である。

### 4. 今後の課題

海水中の亜硝酸、硝酸イオンの簡単で高感度、高精度同時定量法を確立することができた。今後は、海水中のヨウ化物イオン、リン酸イオン等の定量法確立を目指して研究を進めていきたい。本研究にご援助頂きましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

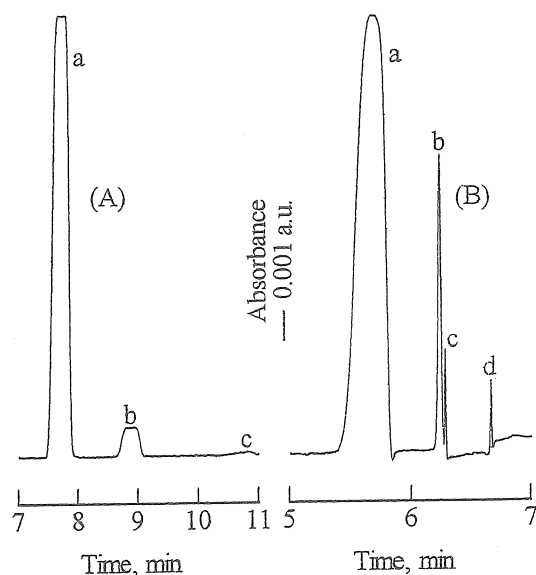


Fig. 6. Electropherograms for the separation of nitrite and nitrate. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{tot} = 72$  cm,  $L_{det} = 50$  cm, ID 75  $\mu$ m; reversing the EOF, 0.1 mM DDAB for 3 min; BGE, artificial seawater without Br<sup>-</sup> adjusted to pH 3.0 with phosphate buffer; voltage, -8 kV; wavelength for detection, 210 nm. Sample, artificial seawater containing 68 mg/L Br<sup>-</sup>, 0.05 mg/L NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and 0.5 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; vacuum injection period, 4 s. (A) Without TTIP and (B) with TTIP; terminating ion, 600 mM CH<sub>3</sub>COONa; vacuum injection period, 25 s. a, Br<sup>-</sup>; b, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; c, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; d, unknown.

5. 文献

- 1) K. Fukushi, K. Hiiro, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 356 (1996) 150.
- 2) K. Fukushi, K. Watanabe, S. Takeda, S. -I. Wakida, M. Yamane, K. Higashi, K. Hiiro, *J. Chromatogr. A*, 802 (1998) 211.
- 3) K. Fukushi, K. Tada, S. Takeda, S. -I. Wakida, M. Yamane, K. Higashi, K. Hiiro *J. Chromatogr. A*, 838 (1999) 303.
- 4) K. Fukushi, N. Ishio, H. Urayama, S. Takeda, S. -I. Wakida, K. Hiiro, *Electrophoresis*, 21 (2000) 388.
- 5) K. Fukushi, N. Ishio, M. Sumida, S. Takeda, S. -I. Wakida, K. Hiiro, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2866.
- 6) K. Fukushi, N. Ishio, T. Miyado, K. Saito, S. Takeda, S. -I. Wakida, K. Hiiro, *Proceedings of the Third Biennial International Conference on Chemical Measurement and Monitoring of the Environment*, pp. 125-129 (May 2000).
- 7) JIS K 2510 : 1998, 潤滑油-さび止め性能試験方法, pp. 8-9.
- 8) T. Hirokawa, H. Okamoto, N. Ikuta, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3483.
- 9) J. Boden, K. Bächmann, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 319.
- 10) L. Křivánková, P. Boček, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 13.
- 11) L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 55.
- 12) P. Gebauer, L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, W. Thormann, *Electrophoresis* 21 (2000) 2797.
- 13) J. Vacík, I. Muselasová, *J. Chromatogr.* 320 (1985) 199.
- 14) K. Ito, Y. Ariyoshi, F. Tanabiki, H. Sunahara, *Anal. Chem.* 63 (1991) 273.
- 15) W. Hu, P. R. Haddad, K. Hasebe, K. Tanaka, P. Tong, C. Khoo, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1617.

## Highly sensitive determination of nitrite and nitrate in seawater by capillary zone electrophoresis

Keiichi Fukushi<sup>1</sup>, Nobuhiro Ishio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine

<sup>2</sup>College of Analytical Chemistry, Japan

### Summary

We describe a combination of selected ions as a terminating ion which is useful for transient isotachopheresis (ITP) in capillary zone electrophoresis (CZE) for the determination of nitrite and nitrate in seawater. In addition to 150 mM sulfate as the principal terminating ion, 10 mM bromate was added to a sample solution as the additional terminating ion. Artificial seawater containing 3 mM cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) was adopted as a background electrolyte (BGE, pH 7.9). The limits of detection (LODs) for nitrite and nitrate were 2.2 and 1.0  $\mu\text{g/L}$  (as nitrogen), respectively. The LODs were obtained at a signal to noise ratio (S/N) of 3. The values of the relative standard deviation (RSD) of peak area for these ions were 1.9 and 1.4%. The RSDs of peak height were 1.7 and 1.9%. The RSDs of migration time 0.11%. The proposed method was applied to the determination of nitrite and nitrate in a proposed certified reference material for nutrients in seawater, MOOS-1, distributed by the National Research Council of Canada (NRC). The results were almost agreed with the assigned tolerance interval.

The amount of sample injected into the CE apparatus is limited as the effective mobility of nitrite was very close to that of nitrate using a BGE at pH 7.9. In order to further lower the LOD for nitrite, it was found that by lowering the pH of the BGE, the difference between the effective mobilities increased, hence permitting increased sample volumes to be tolerated and nitrite LOD to decrease. Therefore, subsequent experiments investigated the pH of the artificial seawater in the range 2.5-3.5 using phosphate buffer. For the purpose of reversing or decreasing the electroosmotic flow (EOF), the effect of dilauryldimethylammonium bromide (DDAB), CTAC and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was examined. Investigations are in progress to examine analytical conditions including the applied voltage, the concentration of phosphate buffer, etc. After establishing the optimum procedure, it will be applied to the analysis of real seawater and the results will be compared to those obtained using the conventional spectrophotometric method.