

## キャピラリーゾーン電気泳動法による海水中栄養塩類同時定量法の開発

富士 惠一

神戸大学大学院海事科学研究科

**概要【緒言】**我々がこれまでに確立したキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)による環境水中の栄養塩類(河川水や下水中の  $\text{NH}_4^+$ 、海水中の  $\text{NO}_2^- \cdot \text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ )定量法をより実用的な方法とするためには、さらに高感度化する必要がある。また、これら定量法は、 $\text{NO}_2^- \cdot \text{NO}_3^-$  を同時に定量できるが、 $\text{PO}_4^{3-}$  も含めて同時に定量することはできない。そこで、本研究では、CZE による海水中の栄養塩類定量法を高感度化するとともに、栄養塩類の同時定量法を確立することを目的とした。

**【実験】**①海水中の  $\text{NO}_2^- \cdot \text{NO}_3^-$  同時定量法を高精度、高感度化するために、NaOH 溶液によるキャピラリー洗浄、人工海水泳動液中の  $\text{Br}^-$  の影響、一時的等速電気泳動を利用したオンライン濃縮時のターミナルイオン溶液(600 mmol/l 酢酸ナトリウム)導入法(真空吸引法、電気的導入法)、泳動液の pH(3.4, 3.6, 4.7)、泳動液中の  $\text{SO}_4^{2-}$  の影響を検討した。

② $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  等の同時定量可能性について調べるために、陽イオン界面活性剤(電気浸透流(EOF)の反転)の種類(臭化ヘキサジメトリン(HDB)、臭化ジドデシルジメチルアンモニウム(DDAB)、塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC))、四ホウ酸ナトリウム溶液(泳動液)濃度(10-50 mmol/l)、検出波長、泳動液の組成について検討した。

**【結果と考察】**①NaOH 溶液でキャピラリーを洗浄後、 $\text{Br}^-$  を含む人工海水を使用すると、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  のピーク面積の相対標準偏差(RSD)は、それぞれ 1.0%、0.80% と改善された。次にターミナルイオンを電気的に導入した場合、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  のピーク面積の RSD は、それぞれ 2.5、1.6% であり、真空吸引法を用いた場合より高精度であり、また  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  のピーク高さは、電気的導入法の方がやや高かった。さらに、pH 4.7 の泳動液は、試料導入時間を増加し、高感度化するために有利であった。また、 $\text{SO}_4^{2-}$  を含まない人工海水を泳動液とした場合、システムピークが小さくなり、ターミナルイオン導入量をより増加できることがわかった。②0.1 mmol/l DDAB で EOF を反転し、泳動液の pH 10 の場合、すべての栄養塩類( $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、ケイ酸、 $\text{NH}_4^+$ )を同時に直接吸光検出(波長 190 nm)できた。また、泳動液濃度が 50 mmol/l の場合、各成分のピーク高さはもっとも高くなり、ピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の RSD はもっとも小さくなり、それぞれ、1.4-3.7%、1.8-4.7%、0.022-0.60% であった。さらに、泳動液として、3 mmol/l CTAC を添加した簡易人工海水(560 mmol/l NaCl+0.1 g/l KBr+0.2 g/l  $\text{NaHCO}_3$ +0.03 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ )を用いると、海水中の  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  は正のピーク(210 nm)として、 $\text{PO}_4^{3-}$  は負のピーク(195 nm)として同時検出できることがわかった。

### 1. 研究目的

環境水(河川水、下水、海水等)中の栄養塩類(亜硝酸、硝酸、アンモニウム、リン酸イオン、ケイ酸)を定量することは、水域環境保全の観点から重要である。現在、これら栄養塩類は、吸光度法に基づいた高価な専用機器であるオートアナライザにより定量されている。しかし、測定結果を富栄養化防止対策等に活かすためには、場所、時間

等に関してきめ細かな測定が要求される。そのためには安価な汎用分析機器による定量法の開発が望まれる。

我々は、これまでに、比較的安価で幅広い分野で利用されているキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)による河川水や下水中のアンモニウムイオン<sup>1)</sup>、海水中の亜硝酸・硝酸イオン<sup>2)</sup>、リン酸イオン定量法<sup>3,4)</sup>を確立した。しかし、これら定量法をより実用的な方法とするためには、さらに

高感度化する必要がある。また、これら定量法は、亜硝酸・硝酸イオンを同時に定量できるが、アンモニウムイオンやリン酸イオンも含めて同時に定量することはできない。最近、栄養塩類同時定量法として、イオンクロマトグラフィーによる方法<sup>5,6)</sup>が提案された。しかしこれらの方法では、2つの流路及び2つの検出器を用いており、同時定量法とは言い難く、操作も煩雑である。現在のところ、栄養塩類の同時定量法は開発されていない。

そこで、本研究では、これまで確立してきたキャピラリーゾーン電気泳動法による環境水中の栄養塩類定量法を高感度化するとともに、栄養塩類の同時定量法を確立することを目的とした。

## 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 (BGE) 容器と内径 50~100  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカ製キャピラリーに BGE を満たす。次いで、右側のキャピラリー端を試料容器に挿入し、左側の BGE 容器側を減圧し、試料をキャピラリー内に吸引する。試料導入法としては、試料容器を左側 BGE 容器より一定時間高く保ち、重力により導入する重力法や試料容器内電極と左側 BGE 容器内電極との間に電圧を印加して分析目的イオンを導入する電氣的導入法がある。ついで、右側のキャピラリー端を再び BGE 容器に戻し、高電圧電源により、左右の BGE 容器中の電極に高電圧を印加する。試料中の各成分は、キャピラリー内で発生する電気浸透流 (EOF) およ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。本法は、キャピラリー断面における EOF の速度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が、これを補うため、各種オンライン濃縮法が提案されている。

### 2.2 一時的等速電気泳動法

等速電気泳動 (Isotachopheresis, ITP) とは以下のような現象をいう。まず、キャピラリー内において、試料中のいずれの分析目的イオンよりも移動度の大きなイオン (リーディングイオン) を含む電解液 (リーディング電解液) と小さなイ

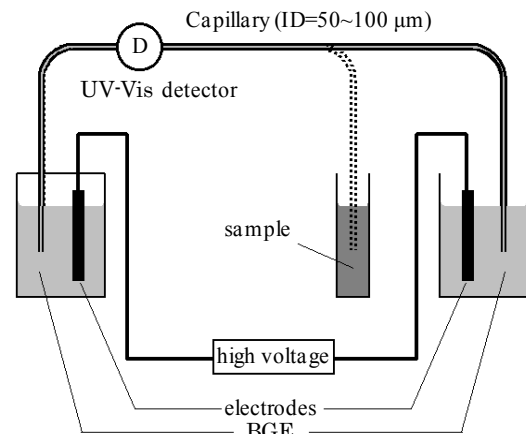
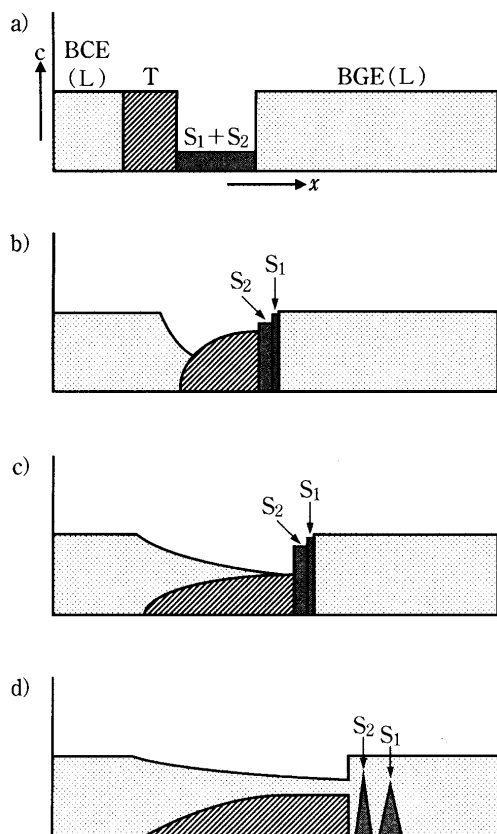


Fig. 1. Basic schematic of capillary electrophoresis (CE) instrument. BGE, background electrolyte.

オン (ターミナルイオン) を含む電解液 (ターミナル電解液) の間に試料を挟み込み、電圧を印加する。分析目的イオン濃度がリーディングイオンおよびターミナルイオン濃度より低い場合、分析目的イオンは濃縮され、定常状態に達するとすべてのイオンは等速で泳動する。CZE において、分離開始前に一時的に ITP 状態を作り出して分析目的イオンを濃縮し、その後ゾーン電気泳動状態に移行し、各分析目的イオンを分離、検出するのが一時的等速電気泳動 (transient isotachopheresis, tITP) である。

tITP を利用するためには種々の電解液充填法があるが、著者らの開発した海水中の亜硝酸、硝酸イオン定量法を例にとり、Fig. 2<sup>8)</sup> に tITP の原理を示す。まず、EOF を反転するためにキャピラリー内に臭化ジドデシルジメチルアンモニウム (DDAB) 溶液を流す。泳動液 (人工海水) を満たした後、海水試料 (分析目的イオン  $S_1$ 、 $S_2$  の移動度、 $\mu_{S1} > \mu_{S2}$ ) を注入する。ついで、ターミナルイオン (T) として酢酸イオン溶液を注入し、tITP 状態を起こす条件を整える (図 2a)。この場合、泳動液中 (或いは試料中) の塩化物イオンがリーディングイオン (L) として作用する。電圧を印加すると、各分析目的イオンは元の試料位置を離れて移動度の順に並びながら濃縮される (図 2b)。泳動液中の塩化物イオンがターミナル電解液中に進入し混合ゾーンが形成されると tITP 状態が解消され、濃縮は終了する (図 2c)。ついで、すべてのイオンは CZE 状態で泳動する (図 2d)。この場合、移動度の大きな  $S_1$  は  $S_2$  よりも早く tITP 状態から解放され、より長く泳動するので  $S_2$  よりもブロードなピークとして検出される。



**Fig. 2.** Scheme of tITP stacking.  $c$ : concentration,  $x$ : capillary length, BGE (L): background electrolyte (BGE) containing leading ion (L),  $S_1$ ,  $S_2$ : analytes (electrophoretic mobility  $\mu_{S1} > \mu_{S2}$ ), T: terminating ion. Reprinted from Fukushi and Takeda<sup>7)</sup>, with permission.

### 2.3 海水中栄養塩類濃度

独立行政法人産業技術総合研究所計測標準研究部門では、低濃度から高濃度まで3種類の海水中栄養塩類標準試料を調製中である。Table 1にそれら標準試料中の亜硝酸、硝酸、リン酸イオン、溶存ケイ素濃度を示す。我々が以前開発したCZEによる海水中の亜硝酸、硝酸イオン定量法の検出限界(LOD)は、それぞれ0.19、0.21  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった<sup>2)</sup>。従って、Table 1のような濃度範囲の亜硝酸、硝酸イオンを定量する場合、本法のLOD、特に亜硝酸イオンのLODを低下する必要がある。

### 2.4 装置

#### 2.4.1 亜硝酸及び硝酸イオン定量法の高感度化

紫外可視吸光検出器を備えたパーキンエルマー製キャピラリー電気泳動装置270A-HTを使用した。キャピラリーはジーエルサイエンス製フューズドシリカ管(内径75

**Table 1.** Candidate materials for NMIJ<sup>a)</sup> certified reference materials for nutrients in seawater<sup>9)</sup>

	Approximate concentration ( $\mu\text{mol}/\text{kg}$ )		
	Low	Middle	High
$\text{NO}_2^-$	<0.1	0.4	<0.1
$\text{NO}_3^-$	<0.1	15	45
$\text{PO}_4^{3-}$	<0.1	1	3
Si	1	30	140

<sup>a)</sup>National Metrology Institute of Japan.

$\mu\text{m}$ , 外径375  $\mu\text{m}$ , 全長72 cm, 有効長50 cm)である。データ処理には、日立製D-2500クロマトインテグレーター(270A-HTの場合)を用いた。pH測定には、堀場製カスターニーLAB pHメーターF-22を使用した。

#### 2.4.2 栄養塩類の同時定量

大塚電子製キャピラリー電気泳動装置CAPI 3200を用いた。キャピラリーはジーエルサイエンス製フューズドシリカ管(内径75  $\mu\text{m}$ , 外径375  $\mu\text{m}$ , 全長62.35 cm, 有効長50 cm)である。

### 2.5 試薬

#### 2.5.1 亜硝酸及び硝酸イオン定量法の高感度化

試薬はすべて特級品を用いた。溶液調製の際に使用した純水は、ヤマト科学製WG220型純水製造装置および日本ミリポア製Simpli Lab超純水製造装置により得られたものである。なお、BGE、標準溶液は使用する前に0.45  $\mu\text{m}$ のメンブランフィルター(アドバンテック製)で濾過した。

#### 2.5.2 栄養塩類の同時定量

BGEとして20 mM四ホウ酸ナトリウム(ナカライテスク製)溶液を用い、1 mol/l水酸化ナトリウム(ナカライテスク製)溶液でpHを調整した。EOFを反転するために、陽イオン界面活性剤として、臭化ヘキサジメトリン(HDB, ナカライテスク製)、臭化ジドデシルジメチルアンモニウム(DDAB, 東京化成製)、塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC, 東京化成製)を使用した。栄養塩類標準試料は、亜硝酸ナトリウム(ナカライテスク製)、硝酸カリウム(和光製)、リン酸二水素カリウム(和光製)、塩化アンモニウム(和光製)、メタケイ酸ナトリウム(ナカライテスク製)を用いて調製した。また、tITPにおけるターミナルイオン溶液として、2-(N-モ

ルホリン)エタンスルホン酸(MES, ナカライテスク)及び *N*-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES, 同仁化学)を用いた。

## 2. 6 定量操作法及び検討した条件

### 2. 6. 1 亜硝酸及び硝酸イオン定量法の高感度化

新しいキャピラリーは、使用前に 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液で 40 分、純水で 10 分洗浄し、以下の操作法により分析を行った。まず、恒温槽温度を 30°C、検出波長を 210 nm に設定した。次いで、BGE をキャピラリーに 3 分間充填した。標準溶液として、0.1 mmol/l 亜硝酸及び硝酸イオンを添加した人工海水、3 µmol/l 亜硝酸及び 20 µmol/l 硝酸イオンを添加した人工海水を用いた。標準溶液を真空吸引法(16.9 kPa) 或いは電気的導入法により注入した。tITP による濃縮を行う場合には、さらに、ターミナルイオン溶液(600 mmol/l 酢酸ナトリウム溶液)を真空吸引法(vacuum injection) 或いは電気的導入法(electrokinetic injection, EKI)により注入した。次いで、試料注入側を陰極として 6 kV の電圧を印加した。上記操作法に基づき、1 日の分析開始時における 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液によるキャピラリー洗浄、BGE 中の臭化物イオン、tITP を利用したオンライン濃縮時のターミナルイオン溶液(600 mmol/l 酢酸ナトリウム)導入法(真空吸引法、電気的導入法)、BGE の pH(3.4, 3.6, 4.7)、BGE 中の硫酸イオンの影響について検討した。

### 2. 6. 2 栄養塩類の同時定量

まず、恒温槽温度を 25°C に設定した。次いで、BGE をキャピラリーに 3 分間充填した。標準溶液として、0.05-0.12 mmol/l 亜硝酸、0.05-0.12 mmol/l 硝酸、3-12 mmol/l リン酸、1-4 mmol/l アンモニウムイオン、1 mmol/l ケイ素溶液を用いた。標準溶液を真空吸引法(50 kPa)により 1 秒注入した後、試料注入側を陰極として電圧を印加した。上記操作法に基づき、EOF を反転するための陽イオン界面活性剤の種類(HDB, DDAB, CTAC)及びコーティング法、BGE 濃度(10-50 mmol/l)、検出波長(190-210 nm)、泳動液の組成について検討した。また、人工海水試料については、真空吸引後、ターミナルイオン溶液を 2-5 s 吸引し、tITP の効果についても検討した。

## 3. 研究結果と考察

### 3. 1 亜硝酸及び硝酸イオン定量法の高感度化

#### 3. 1. 1 水酸化ナトリウム溶液によるキャピラリー洗浄効果

BGEとして、臭化物イオンを含まない人工海水(pH 3.4)を用いた。試料は、0.1 mmol/l 亜硝酸及び硝酸イオンを添加した人工海水である。1日の分析開始時に純水5分、1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液10分、純水5分流してキャピラリーを洗浄した場合としなかった場合の亜硝酸、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(RSD)を **Table 2** に示す。Table 2 から明らかのように、泳動時間以外の再現性は改善された。

#### 3. 1. 2 人工海水泳動液中の臭化物イオンの影響

1日の分析開始時に 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液或いは純水でキャピラリーを洗浄後、BGE として臭化物イオンを含む人工海水を用いて3. 1. 1と同様の実験を行った。この時の亜硝酸、硝酸イオンのピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の RSD を **Table 3** に示す。Table 3 から明らかのように、1日の分析開始時に 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液でキャピラリーを洗浄後、BGE として臭化物イオンを含む人工海水を用いた場合、亜硝酸、硝酸イオンのピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の再現性は大幅に改善された。さらに、検量線を作成したところ、ピーク面積及びピーク高さを用いた場合とも直線性の良いものが得られた( $r=0.9995-0.9998$ )。

#### 3. 1. 3 ターミナルイオン溶液導入法

tITP におけるターミナルイオン溶液導入法として vacuum 或いは EKI を用いた場合の亜硝酸、硝酸イオンのピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の RSD を **Table 4** に示す。Table 4 から明らかのように、ターミナルイオン導入法として EKI を用いたほうが亜硝酸、硝酸イオンのピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の再現性が良いことがわかった。なお、今回の条件では、どちらのターミナルイオン導入法を用いた場合でも、亜硝酸、硝酸イオンのピーク高さに大きな差は見られなかった。

#### 3. 1. 4 泳動液の pH

本法を高感度化するためには、試料導入量を増加し、それに応じてターミナルイオン導入量も増加する必要がある。tITP を用いた場合、遅く検出される分析目的成分(亜硝酸イオン)とターミナルイオンとの間に、試料中の硫酸イオンに由来する負のシステムピークが検出される。分析目的成分を十分に濃縮するためには、ターミナルイオンを十

**Table 2.** Effect of rinsing the capillary with 1 mol/l NaOH before analysis on the reproducibilities

	RSD (%)					
	Area		Height		Time	
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
With washing	7.6	5.1	5.2	6.6	3.6	0.50
Without washing	25	22	22	19	3.6	0.73

Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{tot.}=72$  cm,  $L_{det.}=50$  cm,  $75 \mu\text{m I.D.}\times 375 \mu\text{m O.D.}$ ; BGE, artificial seawater without Br<sup>-</sup> (pH 3.4); voltage, 6 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 210 nm. Sample, artificial seawater containing 0.1 mmol/l NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; vacuum injection period, 3 s (63 nl); four determinations.

**Table 3.** Effect of Br<sup>-</sup> in the BGE on the reproducibilities

	RSD (%)					
	Area		Height		Time	
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Washing with NaOH	1.0	0.80	1.1	1.0	0.30	0.50
Washing with water	3.7	2.9	2.2	1.5	1.5	1.5

Electrophoretic conditions and the sample are as in Table 2.

**Table 4.** Variation of the injection mode for the terminating ion (600 mmol/l acetate) on the reproducibilities

	RSD (%)					
	Area		Height		Time	
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
EKI <sup>a)</sup>	2.5	1.6	2.3	1.3	0.76	0.44
Vacuum injection <sup>b)</sup>	9.8	3.9	7.5	2.6	0.76	0.58

<sup>a)</sup> 10 kV for 48 s. <sup>b)</sup> 8 s. Other electrophoretic conditions and the sample are as in Table 2.

分導入する必要があるが、成分ピークとシステムピークが重ならない程度までしかターミナルイオン導入量を増加できない。0.1 mmol/l 亜硝酸及び硝酸イオンを添加した人工海水試料の場合、pH 3.4のBGEでは、試料導入時間3秒、ターミナルイオン導入時間 48 秒が限界であった。pH 3.6 では、亜硝酸イオンの移動度が増大し、亜硝酸イオンピークとシステムピークとの距離が長くなるため、ターミナルイオン導入時間を 70 秒に増加できた。そこで、pH 3.6 の BGE を用い、試料として 3  $\mu\text{mol/l}$  亜硝酸イオンと 20  $\mu\text{mol/l}$  硝酸イオンを添加した人工海水を分析したところ、試料導入時間を 5 秒まで増加することができた。亜硝酸、硝酸イオンの RSD はそれぞれ、ピーク面積 13%、4.2%、ピーク高さ 10%、3.0%、泳動時間 1.0、0.55% であった。ま

た、亜硝酸、硝酸イオンの LOD は 0.080  $\mu\text{mol/l}$ 、0.21  $\mu\text{mol/l}$  であり、以前、我々が確立した方法<sup>2)</sup>(LOD は、亜硝酸イオン 0.19  $\mu\text{mol/l}$ 、硝酸イオン 0.21  $\mu\text{mol/l}$ )と比較すると、硝酸イオンについては同様であるが、亜硝酸イオンについては約 1/2 であった。試料として 0-9  $\mu\text{mol/l}$  の亜硝酸イオン及び 0-60  $\mu\text{mol/l}$  の硝酸イオンを添加した人工海水を調製し、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(y)を用いた場合の亜硝酸イオン及び硝酸イオンの検量線(x: 濃度)はそれぞれ、 $y=0.359x + 0.752$  ( $r=0.9839$ )、 $y=2.64\times 10^{-2}x + 2.94\times 10^{-2}$  ( $r=0.9997$ )、ピーク高さを用いた場合は、 $y=0.315x + 0.869$  ( $r=0.9866$ )、 $y=2.49\times 10^{-2}x + 6.19\times 10^{-2}$  ( $r=0.9987$ )で

あった。pH 4.7 の BGE では、亜硝酸イオンの移動度が増大し、亜硝酸イオンの方が硝酸イオンより早く検出され、システムピークとの距離がさらに長くなり、ターミナルイオン導入時間を99秒に増加できた。しかし、亜硝酸、硝酸イオンのRSDはそれぞれ、ピーク面積18%、2.0%、ピーク高さ17%、1.4%、泳動時間0.23%、0.24%であり、pH 3.6の場合と比較し、亜硝酸イオンのピーク面積、高さの再現性が多少悪くなった。

### 3. 1. 5 BGE 中の硫酸イオンの影響

亜硝酸、硝酸イオンのピーク面積、ピーク高さ、泳動時間のRSDに対するBGE中の硫酸イオンの影響をTable 5に示す。硫酸イオンを含まない人工海水をBGEとした場合、亜硝酸イオンのピーク面積、高さの再現性を改善する

ことができた。なお、システムピークが小さくなり、ターミナルイオン導入時間を155 sまで増加できた。ブランク値を考慮したピーク高さは、亜硝酸イオンについてはほぼ同様であったが、硝酸イオンについては、約1.3倍であった。Fig. 3に、硫酸イオンを含む人工海水をBGEとした場合のエレクトロフェログラムを示す。

## 3. 2 栄養塩類の同時定量(標準溶液)

### 3. 2. 1 陽イオン界面活性剤の種類

BGEとして、0.001% HDBを含む20 mmol/l 四ホウ酸ナトリウム溶液(pH 10)を用い、分析開始前にキャピラリーにBGEを15分流し、コンディショニングを行った。なお毎分析時、BGEを3分流した。その結果、高濃度ではあるが、亜硝酸、硝酸、リン酸、アンモニウムイオンが同時検出で

Table 5. Effect of  $\text{SO}_4^{2-}$  in the BGE on the reproducibilities

	RSD (%)					
	Area		Height		Time	
	$\text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^-$
a) BGE without $\text{SO}_4^{2-}$	5.4	2.0	4.5	3.1	0.34	0.37
b) BGE with $\text{SO}_4^{2-}$	18	2.0	17	1.4	0.23	0.24

a) Injection time for terminating electrolyte (600 mmol/l acetate), EKI with 10 kV for 99 s.

b) Injection time for terminating electrolyte, EKI with 10 kV for 155 s. Electrophoretic conditions: BGE, artificial seawater (pH 4.7). Sample, artificial seawater containing  $3 \mu\text{mol/l NO}_2^-$  and  $20 \mu\text{mol/l NO}_3^-$ ; vacuum injection period, 3 s (63 nl); four determinations. Other electrophoretic conditions are as in Table 2.

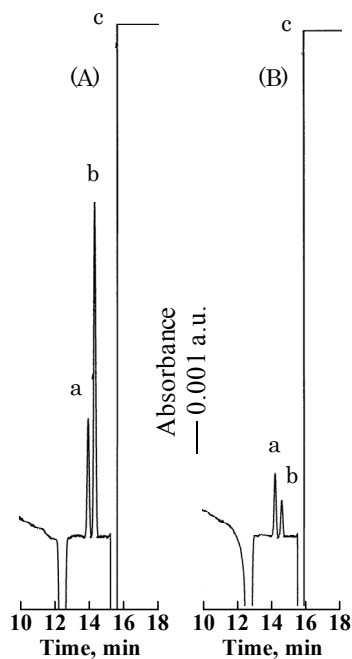


Fig. 3. Electropherograms of artificial seawater containing nitrite and nitrate using BGE without sulfate. (A) Sample, artificial seawater containing  $3 \mu\text{mol/l NO}_2^-$  and  $20 \mu\text{mol/l NO}_3^-$ . (B) Sample, artificial seawater. Identification of peaks: a,  $\text{NO}_2^-$ ; b,  $\text{NO}_3^-$ ; c,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ . Electrophoretic conditions are as in Table 5 (a).

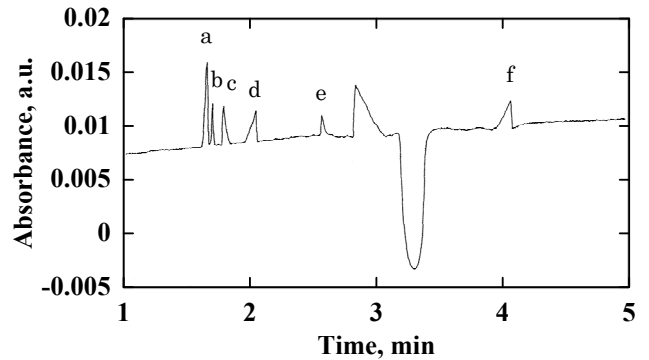
きた(波長は 190 nm)。ピーク面積を用いた場合の検量線はそれぞれ、 $y=25.7x+0.361$  ( $x$ : 0-0.12 mmol/l,  $r=0.9832$ )、 $y=57.4x+4\times 10^{-3}$  ( $x$ : 0-0.12 mmol/l,  $r=0.9998$ )、 $y=1.02x+0.835$  ( $x$ : 0-12 mmol/l,  $r=0.9970$ )、 $y=3.49x+1.18$  ( $r=0.9859$ )であり、比較的直線性の良い検量線が得られた。LODは、亜硝酸 41  $\mu\text{g/l}$ 、硝酸 22  $\mu\text{g/l}$ 、リン酸 7.5 mg/l、アンモニウムイオン 1.1 mg/l であり、河川水のような環境水に適用するためには、高感度化が必要であった。なお、ケイ酸も同時に検出できたが、システムピークと重なり、ピーク形状が悪かった。そこで、陽イオン界面活性剤として DDAB を用いて同様の実験を行った。分析開始前に、まず、キャピラリーに BGE を 15 分流通し、引き続き、0.1 mmol/l DDAB を 5 分、さらに BGE を 1 分流通し、分析を開始した。毎分析時、0.1 mmol/l DDAB を 2 分、BGE を 1 分流通した。Fig. 4 から明らかなように、すべての栄養塩類を同時検出できた。DDAB の場合には、ケイ酸はシステムピーク影響を受けず、分析時間は 5 分であり、HDB の場合 (8 分) より分析時間が短くなり、アンモニウムイオンのピーク形状も改善された。これは、DDAB を用いたほうが EOF が増大したためと思われる。

### 3. 2. 2 BGE 濃度

陽イオン界面活性剤として DDAB を用い、四ホウ酸ナトリウム濃度を変化させ、3. 2. 1 と同様に栄養塩類混合試料を分析した。四ホウ酸ナトリウム濃度が高いほど、各成分のピーク高さは高かった。これは、濃度が高いほど BGE と試料との電気伝導度差が増大し、試料成分がスタッキングされたためであると考えられる。50 mmol/l の場合、各成分のピーク高さはもっとも高くなり、ピーク面積、ピーク高さ、泳動時間の RSD はもっとも小さくなり、それぞれ、1.4-3.7%、1.8-4.7%、0.022-0.60% であった。また、LOD は、亜硝酸 41  $\mu\text{g/l}$ 、硝酸 36  $\mu\text{g/l}$ 、リン酸 8.7 mg/l、アンモニウムイオン 0.89 mg/l であり、HDB を使用した場合とほぼ同様であった。

### 3. 2. 3 DDAB のコーティング法

DDAB のコーティング法として、以下の 2 種類の方法について検討した<sup>10)</sup>。①分析開始前にキャピラリーを BGE で 15 分洗浄後、0.1 mmol/l DDAB を 3 分流通し、さらに BGE を 3 分流通し、分析を開始した。毎分析時、0.1 mmol/l DDAB を 3 分流通した後、BGE を 3 分流通した。②分析開始前にキャピラリーを BGE で 15 分洗浄後、0.1 mmol/l



**Fig. 4.** Electropherogram of the separation of nutrients. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{\text{tot}}=62.35$  cm,  $L_{\text{det}}=50$  cm, 75  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  375  $\mu\text{m}$  O.D., pre-rinsed with 0.1 mmol/l DDAB; BGE, 20 mmol/l sodium borate (pH 10); voltage, 20 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 190 nm. Sample, standard solution containing 0.05 mmol/l  $\text{NO}_2^-$ , 0.05 mmol/l  $\text{NO}_3^-$ , 5 mmol/l  $\text{PO}_4^{3-}$ , 1 mmol/l Si, and 1 mmol/l  $\text{NH}_4^+$ ; vacuum injection period, 1 s. Identification of peaks: a,  $\text{Cl}^-$ ; b,  $\text{NO}_2^-$ ; c,  $\text{NO}_3^-$ ; d,  $\text{PO}_4^{3-}$ ; e, Si; f,  $\text{NH}_4^+$ .

DDAB を 5 分流通し、さらに BGE を 1 分流通し、分析を開始した。毎分析時、0.1 mmol/l DDAB を 2 分流通した後、BGE を 1 分流通した。栄養塩類混合試料を分析し、RSD を求めた。その結果、ピーク面積の RSD は、①の場合 4.3-8.9%、②の場合 0.82-6.3%、ピーク高さについては、①3.9-6.4%、②1.3-7.4%、泳動時間①0.70-1.5%、②0.03-0.50%であり、②のコーティング法の方が再現性の良い結果が得られた。これは、①では DDAB のコーティング後、BGE を 3 分流通することにより、DDAB のコーティングが不均一になり、その結果 EOF が不安定になったためと考えられる。

### 3. 3 栄養塩類の同時定量(人工海水)

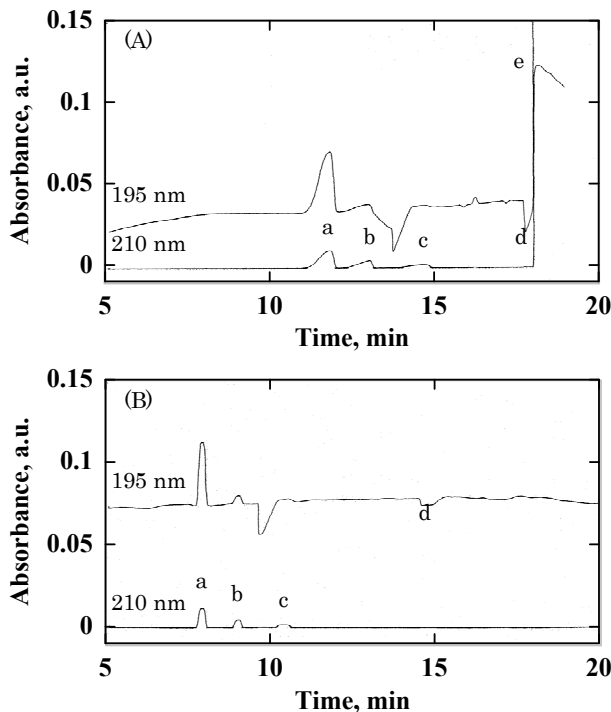
#### 3. 3. 1 簡易人工海水を BGE とした場合

BGE として、3 mmol/l CTAC を添加した簡易人工海水 (560 mmol/l NaCl + 0.1 g/l KBr + 0.2 g/l  $\text{NaHCO}_3$  + 0.03 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) を用いた。泳動電圧は、5.2 kV (試料注入側を陰極) とした。検出波長は、リン酸イオンについては 195 nm、亜硝酸および硝酸イオンについては 210 nm とした。試料として、0.1 mmol/l 亜硝酸及び硝酸イオン、10 mmol/l リン酸イオンを添加した人工海水を用いた。その結果、人工海水中の亜硝酸及び硝酸イオンは正のピーク

として、リン酸イオンは負のピークとして同時検出できた。また tTIP におけるターミナルイオン溶液として 500 mmol/l TES を使用したところ、リン酸イオンのピーク高さがわずかに増大した。しかし、TES 溶液注入時間を増加すると、リン酸イオンピークが TES 由来の不純物ピークと重なり、分離できなかった。なお、硫酸イオンも負のピークとして検出された。

### 3. 3. 2 塩化ナトリウム溶液を BGE とした場合

BGE として、3 mmol/l CTAC を添加した 500 mmol/l 塩化ナトリウム溶液 (pH 3.0)、ターミナルイオン溶液として 500 mmol/l MES を用い、3. 3. 1 と同様の実験を行った。



**Fig. 5.** Electropherograms of artificial seawater containing nutrients. Electrophoretic conditions: BGE, 500 mmol/l sodium chloride containing 3 mmol/l CTAC (pH 3.0); voltage, 6 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 195 nm for  $\text{PO}_4^{3-}$  and 210 nm for  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ ; Sample, artificial seawater containing 0.1 mmol/l  $\text{NO}_2^-$ , 0.1 mmol/l  $\text{NO}_3^-$ , and 10 mmol/l  $\text{PO}_4^{3-}$ ; vacuum injection period, 1 s. (A) With tTIP; terminating ion solution, 500 mmol/l TES; vacuum injection period, 5 s. (B) Without tTIP. Identification of peaks: a,  $\text{Br}^-$ ; b,  $\text{NO}_3^-$ ; c,  $\text{NO}_2^-$ ; d,  $\text{PO}_4^{3-}$ ; e, TES.

MES 溶液を 5 秒注入したところ、リン酸イオンピークは MES 由来の不純物ピークと重ならず、リン酸イオンピーク高さは約 5 倍となった。しかし、亜硝酸及び硝酸イオンピーク高さは増大しなかった。**Fig. 5(A)**は tTIP による濃縮を行った場合、**Fig. 5(B)**は行わなかった場合のエレクトロフェログラムである。

### 4. 今後の課題

比較的高濃度の栄養塩類を含む試料に対しては、キャピラリーゾーン電気泳動法により、栄養塩類の一斉分析は可能であると考えられる。しかし、栄養塩類濃度が低く、かつ共存塩類濃度の高い海水のような試料に対しては、検出法、濃縮法等について改めて検討しなければならない。

本研究に助成頂きました公益財団法人ソルト・サイエンス財団法人にお礼申し上げます。

また、本実験に協力頂いた本学の博士前期課程の林学生、服部学生に感謝申し上げます。

### 文献

- 1) K. Fukushi, H. Ito, K. Kimura, K. Yokota, K. Saito, K. Chayama, S. Takeda, S. Wakida: *J. Chromatogr. A*, **1106**, 61 (2006).
- 2) K. Fukushi, Y. Nakayama, J. Tsujimoto: *J. Chromatogr. A*, **1005**, 197 (2003).
- 3) 岡本孝明, 福士恵一, 横田久里子, 竹田さほり, 脇田慎一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 627 (2006).
- 4) T. Okamoto, K. Fukushi, S. Takeda, S. Wakida: *Electrophoresis*, **28**, 3447 (2007).
- 5) 伊藤一明, 廣川 健ら: 日本分析化学会第 58 年会講演要旨集, p. 411 (2009).
- 6) 北見秀明, 石原良美: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **58**, 945 (2009).
- 7) 福士恵一, 竹田さほり: *ぶんせき*, **2**, 52 (2006).
- 8) M. Urbánek, L. Krivánková, P. Boček: *Electrophoresis*, **24**, 466 (2003).
- 9) A. Hioki, C. Cheong, T. Miura, T. Suzuki: The poster at ICAS2011.
- 10) J. E. Melanson, N. E. Barylá, C. A. Lucy: *Anal. Chem.*, **72**, 4110 (2000).



## Simultaneous Determination of Nutrients in Seawater using Capillary Zone Electrophoresis

Keiichi Fukushi

Kobe University Graduate School of Maritime Sciences

### Summary

We have developed capillary zone electrophoresis (CZE) procedure for the determination of nutrients in environmental waters:  $\text{NH}_4^+$  in river and sewage waters,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$  in seawaters. However the method cannot determine all nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Si, and  $\text{NH}_4^+$ ) simultaneously. Our current emphasis purpose is to enhance the sensitivities for the simultaneous determination of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in seawater and develop a CZE procedure for simultaneous determination of nutrients in seawater. (I) To improve the reproducibility and enhance the sensitivity of the method for the determination of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ , several conditions were examined: the effect of rinsing the capillary with 1 mol/l NaOH before analysis, the addition of  $\text{Br}^-$  to the background electrolyte (BGE), variation of the injection mode (vacuum and electrokinetic injection (EKI)) for the terminating ion (600 mmol/l acetate), the pH (3.4, 3.6, 4.7) of the BGE, and the effect of  $\text{SO}_4^{2-}$  in the BGE. (II) To examine the feasibility of simultaneous determination of all analytes, cationic surfactants (hexadimethrine bromide (HDB), didodecyldimethylammonium bromide (DDAB), and cetyltrimethylammonium chloride (CTAC)) to reverse the electroosmotic flow (EOF), concentrations of the BGE (sodium borate, 10-50 mmol/l), detection wavelength, and BGE composition. The following results were obtained. (I) The reproducibility was improved by rinsing the capillary and using the BGE containing  $\text{Br}^-$ : the relative standard deviation (RSD) of peak area obtained for  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  were 1.0 and 0.80%, respectively. The reproducibility was improved and the sensitivity was slightly enhanced using the EKI mode for the terminating ion. The sample injection volume could be increased using the BGE (pH 4.7). Also it was expected to increase the injection volume of the terminating ion using the BGE without  $\text{SO}_4^{2-}$ . (II) All nutrients were detected simultaneously using the BGE (pH 10) with the reversed EOF (0.1 mmol/l DDAB) and direct UV detection (190 nm). When the BGE concentration was 50 mmol/l, higher peak heights and lower RSDs (peak area: 1.4-3.7%, peak height: 1.8-4.7%, migration time: 0.022-0.60%) were obtained. Using an artificial seawater containing 560 mmol/l NaCl, 0.1 g/l KBr, 0.2 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0.03 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , and 3 mmol/l CTAC as the BGE,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in seawater were detected as positive peaks (210 nm) and  $\text{PO}_4^{3-}$  as a negative peak (195 nm), simultaneously.