

海水中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの簡易で高感度な測定システムの開発(2)

児玉谷 仁, 富安 卓滋

鹿児島大学大学院理工学研究科・理学部

概要

海水中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオン濃度は、海洋環境を把握するために重要な測定項目である。報告者らは、これらイオンをセミマイクロ化したイオンペアクロマトグラフィー (IPC) で分離し、222 nm 紫外線によりペルオキシナイトライトへ変換 (PR), そしてルミノール化学発光反応 (CL) により測定する IPC-PR-CL システムの確立を進めてきた。本助成プログラムの 2023 年度の成果 (助成番号 202307) として、グラファイトカーボンのセミマイクロカラム (内径 2 mm, 外径 30 mm) にセチルトリメチルアンモニウムをコーティングすることで IPC カラムを作成し、3 分以内に亜硝酸イオンと硝酸イオンを分別定量可能とした。しかしながら、海水試料の定量は達成できなかった。

そこで本研究では、市販の内径の細かいイオンクロマトグラフィー (IC) 用カラムを利用し分離を担保したうえで、発光検出セルおよび光化学反応器の最適化を進めた。結果として、溶離液の流量 0.25 mL/min で発光セルに内径 0.5 mm の PFA チューブ 1.5 cm, 光化学反応器に内径 0.15 mm の FEP チューブ 20 cm (紫外線照射時間約 1 秒) を用いた IC-PR-CL システムにより、海水中の亜硝酸イオン、硝酸イオンを測定できることを確認した。また、この時の測定時間は 1 試料あたり 8 分であったが、通常のシステムに比べて必要とする溶媒量を 1/4 とした。この発光検出条件下で IC カラムを IPC カラムにし、さらに溶離液の変更により、海水試料の迅速な測定が可能か検討を進めた。

結果として、炭酸イオンなどの溶離液成分が、分離だけではなく PR-CL 部分にも大きな影響を与えることを確認した。またセミマイクロ IC-PR-CL システムで鹿児島湾 3 地点の海水中硝酸イオン、亜硝酸イオンの測定を 2 ヶ月毎に実施した。特に湾奥の海底熱水噴気活動が確認されている地点で得られた試料において、他と比べ高い亜硝酸イオン濃度と、硝酸イオン濃度の減少が確認され、硝酸イオンから亜硝酸イオンへの還元が起こっている可能性が示唆された。

1. 研究目的

海水中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオン濃度は、海洋環境を把握するために重要な測定項目である。一般的にこれらイオンの測定には、オートアナライザー法 (グリス反応を利用した誘導体化-UV 検出法をフローインジェクションにより自動化したもの) が採用されている¹⁾。しかし、硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元に必要な Cu-Cd カラム使用に伴う有害廃液の発生や、硝酸イオンの定量値に還元効率の変動が大きく影響を与えるなどの問題が知られている。

報告者らは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の検出法として、オンライン紫外線照射 (PR) -ルミノール化学

発光検出 (CL) 法 (以下、PR-CL 法) による含窒素化合物の測定法を開発してきた。測定原理としては、塩基性水溶液条件下で含窒素化合物に紫外線を照射すると、強い酸化力を持つペルオキシナイトライトが生成する。このペルオキシナイトライトは、ルミノールの発光反応を引き起こすため、ルミノール溶液を紫外線照射後の溶液に混合し、生じた化学発光を検出することで含窒素化合物の高感度測定が可能となる。これまで *N*-ニトロソアミン類などは、254 nm の低圧水銀灯による紫外線照射で、効率よくペルオキシナイトライトに変換されることを確認し、HPLC と組み合わせることで、ng/L レベルの測定が可能であることを報告してきた^{2) 3)}。一方、硝酸イオンや亜硝酸イオンも *N*-ニ

トロソアミン類と同様に低圧水銀灯による紫外線照射でペルオキシナイトライトを生成したため、PR-CL 法で測定可能であったが、*N*-ニトロソアミン類と比べ 2 ケタほど低感度であった^{4),5)}。しかし最近、紫外線光源として低圧水銀灯の代わりに 222 nm のエキシマーランプを使用したところ、硝酸イオン・亜硝酸イオンが高効率でペルオキシナイトライトに変換されることを確認し、陰イオンクロマトグラフィー (IC) 分離と組み合わせることで、僅か 1 mL の試料注入量でも nM レベルの定量を可能とした。海水試料の測定においても、試料注入量が通常の 1/20 ほどであるため、高濃度塩類の妨害もなく硝酸イオン、亜硝酸イオンの測定が可能であった⁶⁾。

しかしながら、確立した IC-PR-CL 法は、既存の IC 装置に PR-CL 法を組み合わせただけであり、分離・検出が最適化されておらず、PR-CL 法のパフォーマンスを活かせていない状況であった。そこで本助成プログラムにより 2023 年度より、船上でも利用しやすい測定法として最適化を進めて来ている。

2023 年度の成果として、分離挙動を調整しやすいイオンペアクロマトグラフィー (IPC) カラムを利用したセミマイクロ IPC-PR-CL 装置により、一試料 4 分以内での測定、低溶媒化を達成した。しかしながら海水試料の測定では、認証標準物質の認証値を得ることが出来なかった。これは、高濃度に含まれる塩化物イオンや硫酸イオンにより、分離や検出が妨げられていることを示唆する。

そこで本年度は、市販のセミマイクロ IC カラムを利用して分離を担保したうえで、まず化学発光検出器、光化学反応器の最適化を進めることとした。また、確立したセミマイクロ IC-PR-CL 法で鹿児島湾海水中の硝酸・亜硝酸イオンの定量を進めた。

2. 研究方法

2.1 試薬

硝酸イオン、亜硝酸イオンの検量線溶液は 1000 mg/L 標準溶液 (富士フィルム和光純薬, 以下 Wako) を用いて 1 mM 混合溶液を調製し、これを Mill-Q 水で希釈することで調製した。溶離液は 1 M 水酸化ナトリウム溶液 (容量分析用, Wako) とメタノール (LC-MS, Wako) を利用して調製した。また溶離液として、炭酸ナトリウムや硫酸ナトリウム (試薬特級, Wako) を用いた。ルミノール溶液は、ルミノール (東京化成) と炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム

(試薬特級, Wako) を用いて調製した。また海水中の硝酸イオン、亜硝酸イオンの認証標準物質として KANSO CRM Lot CP を利用した。

特に記載のない限り、溶離液は 30 mM NaOH-MeOH (98:2, v/v), ルミノールは 0.05 mM luminol in 0.5 M Carbonate buffer (pH 10) を調製して使用した。

2.2 IC(IPC)-PR-CL 装置構成

本研究で利用した IC(IPC)-PR-CL 装置の概略図を Fig. 1 に示す。オートサンプラーから注入された試料は、溶離液により、プレフィルター、ガードカラム、分離カラムを移動し、各イオンに分離される。その後、紫外線を透過する流路で構成された光化学反応器によってオンラインで紫外線が照射される。紫外線照射により硝酸イオン、亜硝酸イオンからペルオキシナイトライトが生成し、ルミノール溶液と混合され、生じた化学発光を化学発光検出器でとらえる装置構成となっている。光化学反応器は、紫外線光源として 222 nm KrCl エキシマーランプ (セン・エンジニアリング株式会社) を用いた。この光源の照射面が 10 cm × 5 cm であったため、3D プリンターで紫外線を透過するチューブを固定する台座 (Fig. 1a) を作成し、光化学反応器として利用した。紫外線透過チューブとして、石英キャピラリー (内径 0.25 mm, 外径 325 mm, 肉厚 0.05 mm), FEP チューブ (内径 0.5 mm, 外径 1/16 inch, 肉厚 0.54 mm), FEP チューブ (内径 0.15 mm, 外径 1/32 inch, 肉厚 0.32 mm), テフロン AF2400 チューブ (内径 0.23 mm, 外径 0.3 mm, 肉厚 0.04 mm) を検討した。

化学発光検出器は、2 つの溶液 (溶離液とルミノール溶液) を混合して、光透過性のチューブで構成された発光検出セルにより、光電子増倍管 (PMT) の前に混合溶液を導くことで発光を検出している。市販の化学発光検出器は、混合した後の流量が 1~2 ml/min 程度の HPLC 用として、一般的に 100 mL 程度 (5 秒程度の通過時間) のセル容量を持っている。本実験では、まず、溶離液とルミノール溶液の混合直後から発光を検出できるようにするため、光化学反応器の出口から外径 325 mm × 内径 0.1 mm の Peck チューブを用い Fig. 1b のように二重管構造とすることで、ルミノール溶液との混合直後からの発光を検出できる構造とした。

その後、チューブの素材・長さ・内径を変えることでセル容量を調整した (Fig. 1c)。光透過チューブとして

PTFE チューブ (内径 0.5 mm, 外径 1/16 inch, 肉厚 0.54 mm), PFA チューブ (内径 0.5 mm, 外径 1/16 inch, 肉厚 0.54 mm), PFA チューブ (内径 1 mm, 外径 1/16 inch, 肉厚 0.3 mm) を検討した。

また海水試料測定では, コンタミネーションの抑制のため未ろ過の海水試料を直接注入することとし, 0.1 mm の PEEK 製プレフィルター (直径 1 mm, GLsciences) を分析カラムの前に接続することで, 分析カラムが詰まるトラブルを回避することとした。

2. 3 海水試料の測定条件

本実験で用いたセミマイクロ IC 分離カラムとして, Dionex Ion Pac AS19 (内径 2 mm, 長さ 250 mm, Thermo Fisher Scientific) とガードカラム Dionex Ion Pac AG19 (内径 2 mm, 長さ 50 mm) を組み合わせたものを採用した。溶離液の流量は 0.25 mL/min, ルミノール溶液の流量 0.125 mL/min とし, 試料注入量は 1 mL とした。また PR-CL 条件として, 紫外線照射時間は約 1 秒 (内径 0.15 mm, 外径 1/32 inch FEP チューブ 20 cm), 化学発光検出器のセル容量は 3 mL (内径 0.5 mm PFA チューブ長さ 1.5 cm) で海水試料の測定を行った。

2. 4 IPC カラムの準備方法

IPC カラムは Nagashima らの手法を基におこなった⁷⁾。多孔質グラファイトカーボンカラム (Hypercarb, 内径 2.1 mm, 長さ 30 mm, 粒子径 3 mm, およびガードカラム 10 mm) を Mill-Q 水, 100% アセトニトリル, Mill-Q 水で順次 0.4 mL/min で 2 時間以上送液し, 5 mM のセチルトリメチルアンモニウムイオン (CTA⁺) を含む 25% アセトニトリル水溶液を送液し, カラムを CTA⁺ でコーティングした。その後, Mill-Q 水を 0.4 mL/min で 2 時間以上送液し, IPC カラムとして用いた。

2. 5 鹿児島湾での試料採取と処理

海水試料採取は, 鹿児島大学水産学部実習船南星丸により 2 ヶ月毎に鹿児島湾で実施した。海底熱水噴気孔がある湾奥 (若尊カルデラ) を St.2 とし, 天降川の河川水が流れ込む地点を St.9N, St.2 と同程度の深度 (200 m) を有する湾中央部を St.12 とした (Fig. 2)。表層はバケツ, 50, 100, 150, 180, 200 m の各深度は CTD 採水器により採取した。採取された海水試料は 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に採取し, 直ちに船内の冷凍庫で冷凍して保存した。測定前日に冷蔵庫で解凍し, ろ過等を行わず, そのまま 1.5 mL のオートサンプラーバイアルに入れ測定に用いた。

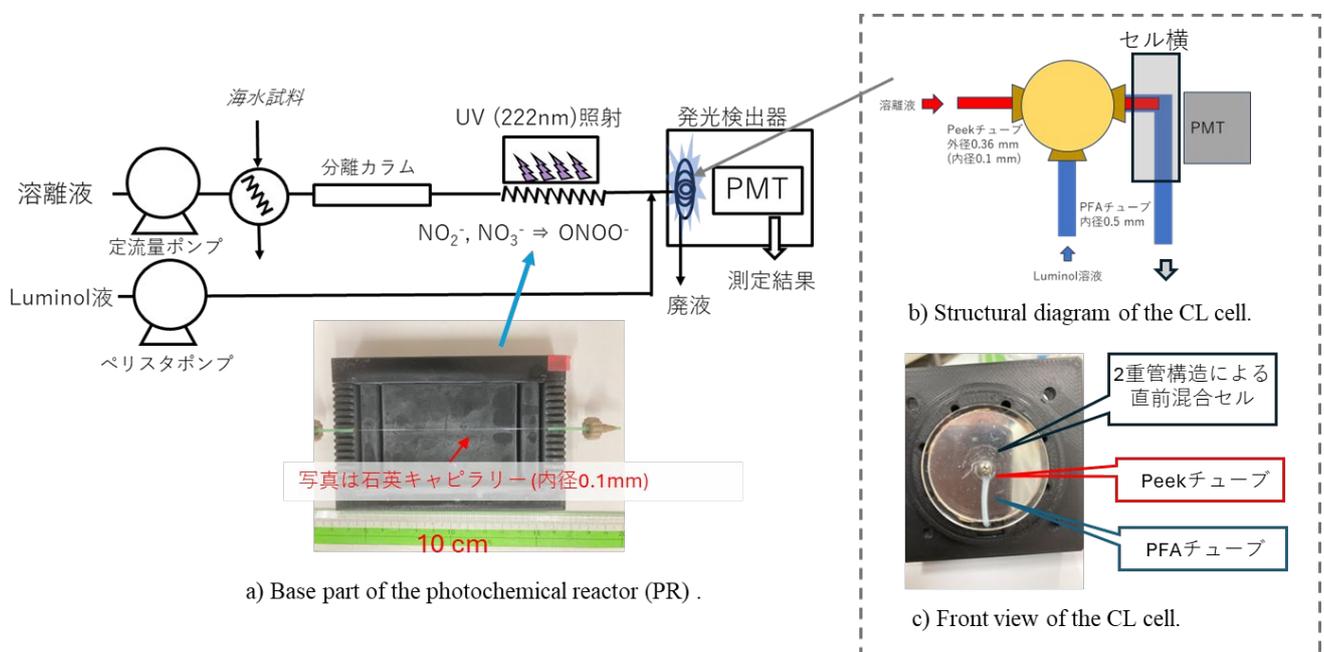


Fig. 1 Schematic diagram of the nitrate and nitrite ion measurement system.

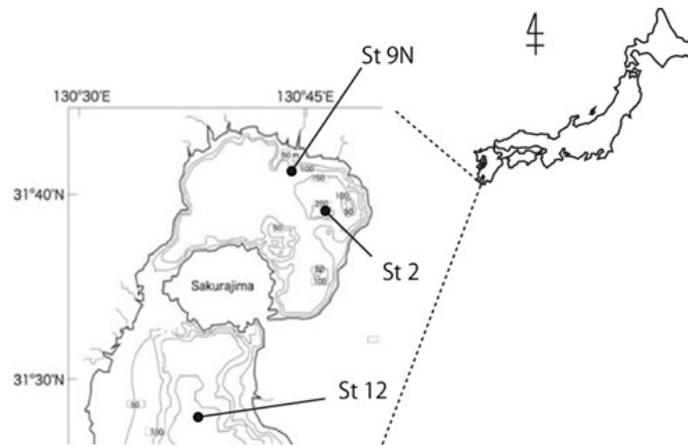


Fig. 2 Survey locations in Kagoshima Bay.
(St.2: presence of a hydrothermal vent; St.9: near a river mouth; St.12: reference site)

3. 研究結果と考察

3.1 セミマイクロ IC 分離条件の決定

2023 年度の報告の通り、作成した IPC カラムでは海水試料の測定が達成できなかった。そこで、まず海水試料測定が可能であった AS-19 イオン交換カラム(内径 4.0 mm, 長さ 250 mm, Thermo)のセミマイクロカラム(内径 2.0 mm, 長さ 250 mm)を用いて、セミマイクロ条件での光化学反応器および化学発光検出セルの最適化測定を進めた。

内径のみ異なるカラムでは、カラム内を流れる溶液の線速度を一致させれば基本的に同分離が達成されることになる。これまでの内径 4 mm の IC カラムでは、溶離液の流量が 1.0 mL/min であったことから、セミマイクロ IC カラムでは 0.25 mL/min とした。また、溶離液とルミノール溶液の混合割合を一定とするため、これまで 0.5 mL/min であったルミノール溶液の流量を 1/4 の 0.125 mL/min とした。

3.2 発光セル容量の最適化

溶離液およびルミノール溶液の流量変更に伴い、光化学反応器および化学発光検出器のセル容量の変更が必要となる。既報では、内径 1.0 mm の PTFE チューブ 7 cm

を発光セルとして用いていた(セル通過時間 2.2 秒)。しかし、流量が 1/4 となるセミマイクロ条件では 4 倍の通過時間がかかることになる。そこでセル構造の最適化を進めた。

発光セルの素材 (PTFE, PFA), 内径, 長さを変化させたときのセル容量 (検出時間) を最適化した。結果を **Table 1** にしめす。PTFE チューブで構成したセル容量が異なる 3 条件から、セル容量が大きくなるに従いピーク高さの上昇が確認された。しかし、セル容量の増大に伴いピーク幅が広がり、理論段数 (NTP) が低下することも確認された。また PTFE に比べ透明度の高い PFA チューブを用いると、同容量であってもピーク高さは約 2 倍となることが確認された。ただし、溶離液とルミノールの混合のみで生じるバックグラウンド発光 (BG 値) も上昇したため、単純に感度 2 倍とはなっていない。

発光セル容量を増やすことで高感度化が望めるが、分離条件や光化学反応器などの他条件の検討時にピークの拡散等を評価することが難しくなるため、セル容量はできるだけ小さいもの(内径 1.0 mm の PFA チューブ長さ 1.5 cm)として、他条件の検討を進めることにした。

Table 1 Properties (materials and volumes) of various CL cells and their measurement results.

Material		PFA	PTFE	PTFE	PTFE	PFA	
Length (cm)			1.5	1.5	6.5	29	1.5
Inner diameter (mm)			1.0	1.0	1.0	1.0	0.50
Cell volume (μL)			12	12	51	228	3.0
PMT level ^{*1}			100	100	10	10	
Peak height (μV)	NO_2^-		595268	313147	180041	509573	np ^{*2}
	NO_3^-		304405	166885	98494	299712	np
NTP	NO_2^-		5130	5182	4613	2690	np
	NO_3^-		6645	6649	6147	4066	np
BG(mV)			62	40	28	123	np

Sample: 10 μM NO_3^- and NO_2^- (1 μL injection volume), Average values (n = 3)

PR reactor: Quartz capillary (0.25 mm i.d., 9 cm length)

^{*1}The signal output is reduced to about 10% when the PMT level is changed from 100 to 10.

^{*2}np: not performed

3.3 光化学反応器の最適化

次に光化学反応器の素材の最適化を進めた。222 nm の紫外線を効率よく透過する必要があるため、石英、一般的なテフロンで紫外線透過効率が高いとされる FEP、特殊なテフロンである Teflon AF の 3 種類について検討した

Table 2 に光化学反応時のチューブ素材、有効チューブ長(照射時間)と、その条件での 10 mM 亜硝酸イオンおよび硝酸イオンのピーク高さ、理論段数および装置の BG 値をまとめたものを示す。

紫外線の透過率が最も高い素材である石英キャピラリーを用いたところ、紫外線照射時間 1.1 秒で最も高い亜硝酸イオン、硝酸イオンのピークが得られた(紫外線照射装置の照射面の長さが 10 cm であったことから、石英キャピラリーが利用できる最大長 9 cm であり、この時の照射時間が 1.1 秒となる。検出器側と反対側を遮光することで 5 cm, 2.5 cm での結果を得ている)。いずれもキャピラリーの長さは同じであるため、理論段数に差はみられなかった。次に FEP チューブで検討したところ、紫外線照射時間 2.4 秒(有効長 5 cm) で最大のピーク高さが得られ、4.7 秒ではピーク高さが減少することが確認された。これは以前の報告でも確認された現象で、過剰な紫外線照射により生成したペルオキシナイトライトが分解したためと考えられる。また、Teflon AF チューブを用いたところ、BG 値が安定するまで一昼夜紫外線照射が必要であり、また他と比べ BG 値が高

い状態であった。BG 値の上昇は、チューブからの何らかの物質の溶出の可能性、また Teflon AF はガス透過性が高いチューブであるため、ガス成分の混入などが高 BG の原因と考えている。

紫外線透過効率を考えると、石英キャピラリー、TeflonAF、FEP の順で高い感度が得られると考えられ、実際に同程度の照射時間(1 秒)では、予測した結果となった。しかし、石英キャピラリーは、加工の難しさと破損の問題、TeflonAF では異常な BG 値の上昇が起こったことから、本研究では、FEP チューブを光化学反応器の素材とした。

次に FEP チューブ内径、全長、有効長(照射時間)と、その条件時の硝酸イオン、亜硝酸イオンのピーク高さと同様に理論段数、BG 値を **Table 3** に示す。内径 0.5 mm の FEP チューブを用いた際、**Table 2** と同様に 2.4 秒で最も高いピーク高さが得られた(**Table 2** と **3** でセル容量が異なる)。

一方、内径 0.15 mm のチューブを用いると 0.9~1.3 秒(20~30 cm) で最も高いピーク高さが得られた。これは、FEP チューブの厚みが異なることにより、より効果的な光化学反応が起こったことによるものと考えられる。また内径を細くしたことで理論段数の向上が確認された。この実験では 0.15 mm チューブの全長を 80 cm として実験したが、必要なチューブ長が決定したため、以降の実験では全長を 30 cm(有効長を 20 cm) にカットして実験を行った。

Table 2 UV irradiation times and corresponding measurement results using various tubing in the PR reactor.

Material (Inner diameter)	Quartz (0.25 mm)	Quartz (0.25 mm)	Quartz (0.25 mm)	FEP (0.50 mm)	FEP (0.50 mm)	FEP (0.50 mm)	Teflon AF (0.23 mm)
Total length (cm)	9	9	9	10	10	10	10
Active length (cm)	2.5	5	9	2.5	5	10	10
Irradiation time (s)	0.3	0.6	1.1	1.2	2.4	4.7	1.0
NO ₂ ⁻ peak height (μV)	108035	187142	348190	233545	364667	276894	259712
NO ₃ ⁻ peak height (μV)	54226	98890	178968	155795	248355	187732	155594
NTP (NO ₂ ⁻)	5025	4977	5064	4215	4236	4644	5503
NTP (NO ₃ ⁻)	6629	6511	6695	5836	5794	6273	7185
BG (mV)	12	23	48	23	44	34	70

Sample: 10 μM NO₃⁻ and NO₂⁻ (1 μL injection volume), Average values (n = 3), PMT level: 100.

CL cell: PFA (1.5 cm length, 1.0 mm i.d.)

Table 3 UV irradiation times and corresponding measurement results using various FEP tubing in the PR reactor

Material (Inner diameter)	FEP (0.50 mm)	FEP (0.50 mm)	FEP (0.50 mm)	FEP (0.15 mm)	FEP (0.15 mm)	FEP (0.15 mm)	FEP (0.15 mm)
Total length (cm)	10	10	10	83	83	83	83
Active length(cm)	2.5	5	10	10	20	30	50
Irradiation time(s)	1.2	2.4	4.7	0.42	0.85	1.3	2.12
NO ₂ ⁻ peak height (μV)	171252	232345	46891	112361	280161	263315	5730
NO ₃ ⁻ peak height (μV)	108423	141268	34720	58881	93828	142049	3428
NTP (NO ₂ ⁻)	4388	4519	5087	5244	5247	5213	5325
NTP (NO ₃ ⁻)	6090	6210	6817	6852	6914	6843	6796
BG (mV)	16.46	23	4.92	13.02	20.32	29	2.39

Sample: 10 μM NO₃⁻ and NO₂⁻ (1 μL injection volume), Average values (n = 3), PMT level: 100.

CL cell: PFA (1.5 cm length, 0.5 mm i.d.)

3. 4 セミマイクロ IC-PR-CL による海水試料の測定

3. 1の結果から、発光セルは内径 0.5 mm の PFA チューブで 1.5 cm (セル容量約 3 mL, 通過時間約 0.5 秒) とし、光化学反応器は内径 0.15 mm の FEP チューブで 30 cm (有効長 20 cm, 紫外線照射時間約 0.9 秒) としたセミマイクロ IC-PR-CL 装置を構築した。

海水の認証標準物質を測定したクロマトグラムを **Fig. 3** に示す。定量の結果、認証値と同じ結果が得られることが確認できた。セミマイクロ IC-PR-CL 装置により、少なくとも既報のシステムに比べ、溶離液量およびルミノール量は 1/4 となり、同量の溶液で 4 倍の測定時間の運転が可能となった。

また、溶離液を 30 mM NaOH-MeOH (98:2, v/v) から、NaOH 濃度やメタノール割合を変化させて分離を確認した。結果を **Fig. 4** に示す。NaOH 濃度の上昇に伴い亜硝酸イオンおよび硝酸イオンの保持時間が短くなり、またピーク高さの低下が確認された。保持時間の低下は予想された結果であるが、ピーク高さの低下は光化学反応の条件が変わったことによるものと考えられた。実際に塩基性が高い条件では、より短い紫外線照射時間でピーク高さが高くなることを確認した。

またメタノールを加えていない溶離液を利用すると塩化物イオンのピークが巨大になることが確認された (**Fig. 4a**)。PR-CL 法による塩化物イオンのピークは、塩化物イオンに紫外線が照射されることで、何らかの酸化性物質 (塩素ラ

ジカルと考えている)が生成し、これがルミノールと反応し生じているものと考えられる。メタノールの割合を増やした Fig. 4b~4d では、Fig. 4a(メタノールなし)、Fig. 3(2%メタノール)と比べ塩化物イオンのピークが低下することが確認

できた。メタノールの存在により、紫外線照射により生成した物質が、ルミノールと発光反応を起こしにくい物質に変化したためと考えられる。

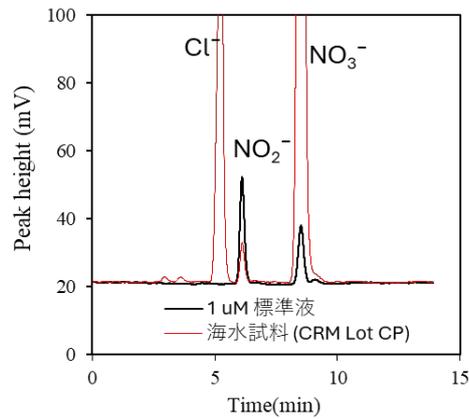


Fig. 3 Typical chromatogram obtained using the semi-micro IC-PR-CL system. Black line: 1 μM standard solution Red line: Seawater sample (CRM Lot CP)

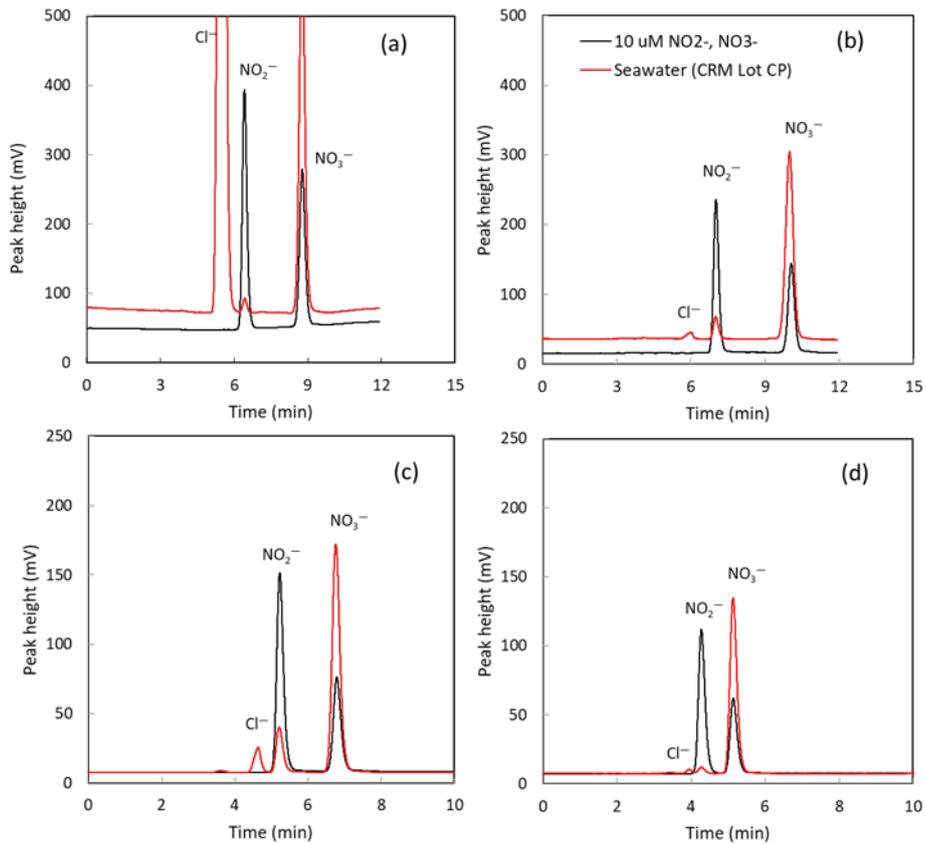


Fig. 4 Typical chromatograms obtained using the IC column with four different eluents. Eluent: (a) 30 mM NaOH (b) 30 mM NaOH-methanol (90:10, v/v) (c) 50 mM NaOH (10% MeOH), (d) 100 mM NaOH (10% MeOH)

3. 5 IPC カラムによる各種溶離液の検討

次に IC カラムより高速な分離を達成するため、IPC カラムでの分離の検討を進めた。光化学反応器および発光検出セルを最適化したことから、昨年度に検討したものと同一 IPC カラムで再度検討を行った。しかしながら、昨年度と同様に亜硝酸イオンのピーク形状が崩れることが確認された (Fig. 5)。分離面の問題であることが確認できたことから、これまで使用していた NaOH 溶離液に Na_2CO_3 や Na_2SO_4 を添加することで分離を確認した。

結果を Fig. 6 に示す。5 mM の CTA^+ を付加したカラムを利用し、炭酸イオンや硫酸イオンを加えたことで、硝酸イオンの保持時間が減少し、また炭酸イオンの添加では亜硝

酸イオンのピークも確認することができた。特に興味深い結果として、炭酸イオンを添加した際、亜硝酸イオンの前方にでる塩化物イオンのピークが硫酸イオンを加えたときに比べ大きく低下することが確認された。これは、メタノールと同様に塩化物イオン由来の物質が炭酸イオンと反応したためであると考えられる。また炭酸イオンを加えると硫酸イオンに比べ亜硝酸イオンと硝酸イオンのピーク高さの低下と、BG の上昇が確認された。

今後、IPC カラムの長さを現行の 30 mm から長くし、 CTA^+ の付加密度の変更や、メタノールや硫酸イオンなどの添加により分離と検出の最適化を進める。

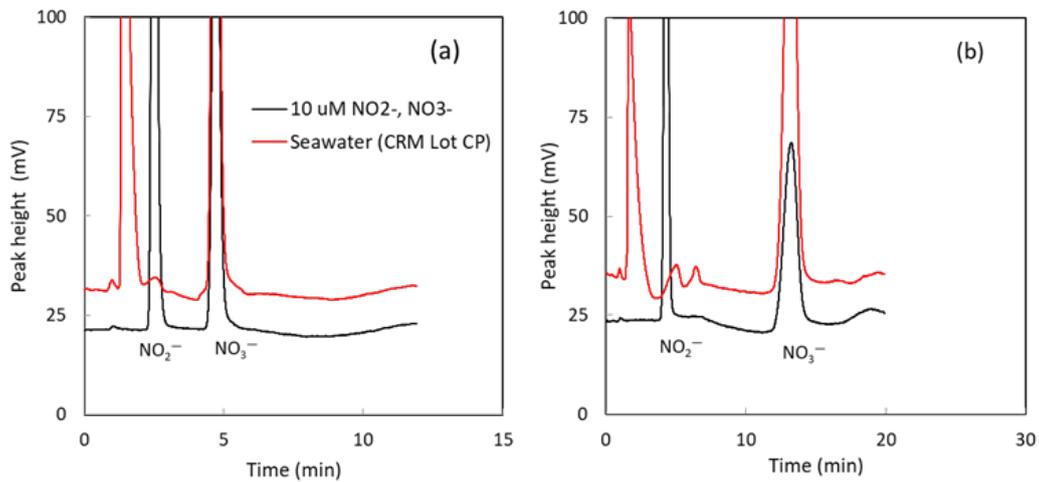


Fig. 5 Typical chromatograms obtained using two different IPC columns functionalized with CTA^+ at (a) 0.5 mM and (b) 5.0 mM. Eluent: 30 mM NaOH-MeOH (98:2, v/v)

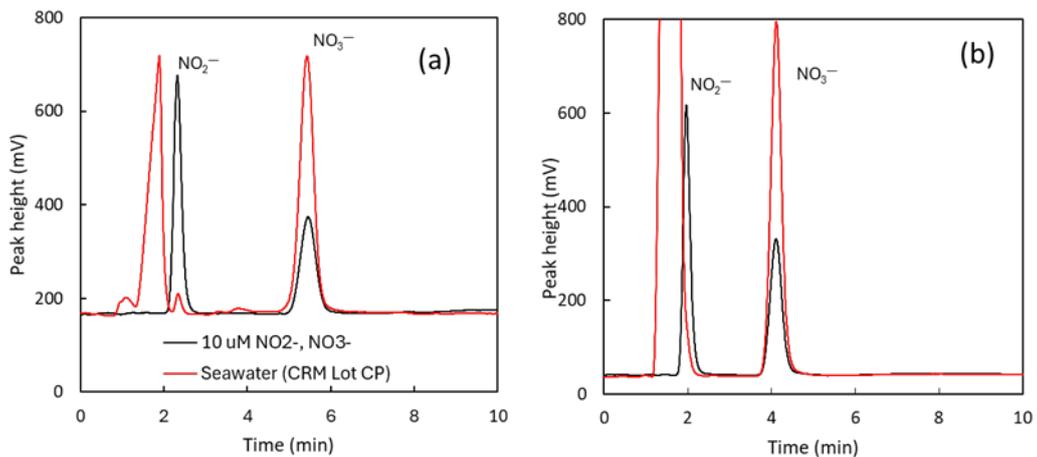


Fig. 6 Typical chromatograms obtained with the IPC column (5 mM CTA^+) using two different eluents. Eluent: (a) 5 mM Na_2CO_3 in 10 mM NaOH (b) 5 mM Na_2SO_4 in 10 mM NaOH

3. 6 鹿児島湾海水の硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度

セミマイクロ IC-PR-CL 装置により、冷凍保管していた鹿児島湾海水の測定を進めた。2022 年 12 月～2024 年 8 月の測定結果を Fig. 7 に示す。

亜硝酸イオンについては、採取地点により大きな違いが確認された。St.2 の深層で亜硝酸イオン濃度の上昇が確認された。特に 2023 年 10 月の試料では水深 180 m で 10 mM に近い濃度の亜硝酸イオンが検出され、一方、同深度の硝酸イオン濃度は急激に低下していた。このことは、深層で硝酸イオンから亜硝酸イオンへの還元が起こっていることを示唆していると言える。同様の結果を過去にも報告

しており、その時も 10 月の試料であった。水温が上昇し、温度躍層が形成され、海底熱水噴気孔からの噴出物が閉じ込められ、pH 等の低下、酸素濃度の減少などにより、還元反応が進んでいるものと考えている。

硝酸イオンについては、表層で濃度が低く、深層ほど濃度が高くなり 10～20 mM 付近となる傾向が全地点で確認された。しかし、St.9N だけは表層でも硝酸イオン濃度が高い時期が確認された。これらの試料については、電気伝導率の低下も確認されていることから、近くに河口がある天降川からの河川水の流入の影響を受けているものと考えている。

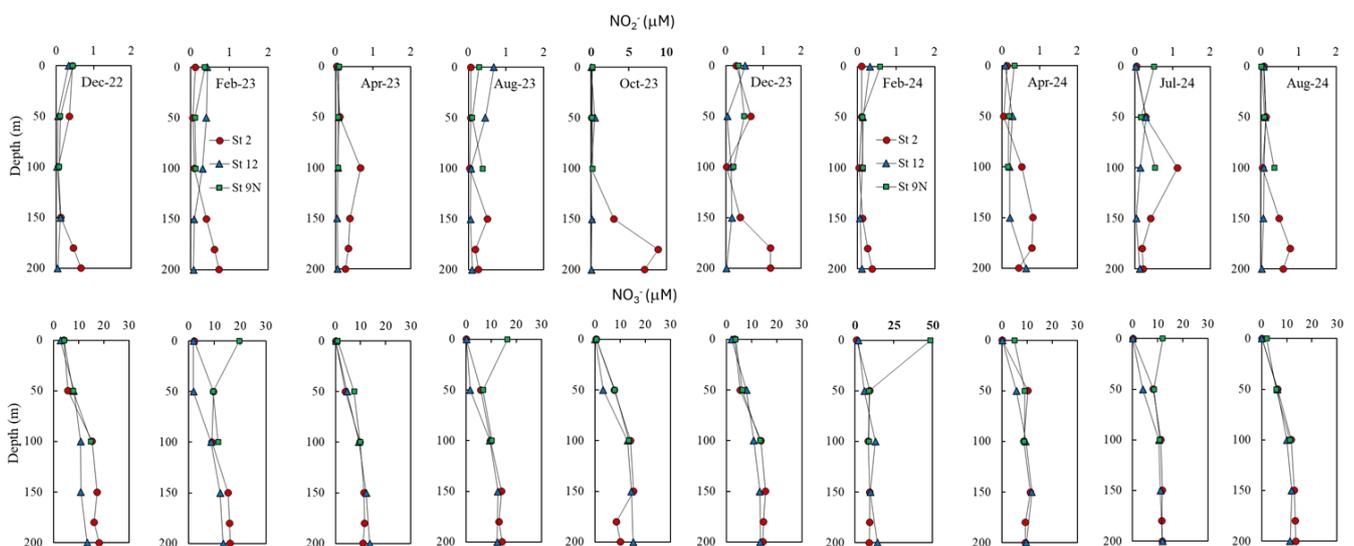


Fig. 7 Seasonal variations in the vertical distribution of nitrite (top) and nitrate (bottom) ion concentrations in seawater from Kagoshima Bay (December 2022 – August 2024)

4. 今後の課題

本年度は、セミマイクロ IC カラムを用い発光セルおよび光化学反応器の最適化を進め、セミマイクロ IC-PR-CL 装置により、問題なく海水中の亜硝酸イオン、硝酸イオンの同時測定が可能であることを確認した。これにより少なくとも低溶媒化(稼働時間 4 倍)は達成された。一方、分離については、溶離液組成を変更することで多少の高速化(1 試料 10 分から 8 分へ)は達成できることは確認できたが、より高速な測定を可能とするため、引き続き IPC カラムによる分離の最適化を進める予定である。また、PR-CL 法の開発当初からの継続的な問題として、超純水を試料としても数 nM の亜硝酸イオンのピーク(保持時間が同じピーク)が生じる状況があり、この解消には至っていない。これについては、利用している

オートサンプラーの構造上の問題と考えており、他装置を用いてその確認を進めていく予定である。

5. 文献

- 1) Zhang, J.-Z.; Ortner, P. B.; Charles J. Fischer. *US EPA Method 353.4: Determination of Nitrate and Nitrite in Estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis*; 1997.
- 2) Kodamatani, H.; Yamazaki, S.; Saito, K.; Amponsaa-Karikari, A.; Kishikawa, N.; Kuroda, N.; Tomiyasu, T.; Komatsu, Y. Highly Sensitive Method for Determination of N-Nitrosamines Using High-Performance Liquid Chromatography with Online UV

Irradiation and Luminol Chemiluminescence Detection. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (1).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.025>.

- 3) Kodamatani, H.; Roback, S. L.; Plumlee, M. H.; Ishida, K. P.; Masunaga, H.; Maruyama, N.; Fujioka, T. An Inline Ion-Exchange System in a Chemiluminescence-Based Analyzer for Direct Analysis of N-Nitrosamines in Treated Wastewater. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1553*, 51–56.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.030>.
- 4) Kodamatani, H.; Yamazaki, S.; Saito, K.; Komatsu, Y.; Tomiyasu, T. Rapid Method for Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate in Water Samples Using Short-Column Ion-Pair Chromatographic Separation, Photochemical Reaction, and Chemiluminescence Detection. *Anal. Sci.* **2011**, *27* (2), 187–192.
<https://doi.org/10.2116/analsci.27.187>.
- 5) Kodamatani, H.; Yamazaki, S.; Saito, K.; Tomiyasu, T.; Komatsu, Y. Selective Determination Method for Measurement of Nitrite and Nitrate in Water Samples Using High-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Photochemical Reaction and Chemiluminescence Detection. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (15).
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.096>.
- 6) Kodamatani, H.; Kubo, S.; Takeuchi, A.; Kanzaki, R.; Tomiyasu, T. Sensitive Detection of Nitrite and Nitrate in Seawater by 222 Nm UV-Irradiated Photochemical Conversion to Peroxynitrite and Ion Chromatography-Luminol Chemiluminescence System. *Environ. Sci. Technol.* **2023**.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00273>.
- 7) Nagashima, H.; Okamoto, T. Determination of Inorganic Anions by Ion Chromatography Using a Graphitized Carbon Column Dynamically Coated with Cetyltrimethylammonium Ions. *J. Chromatogr. A* **1999**, *855* (1), 261–266.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00654-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00654-8).

Development of a Simple and Highly Sensitive Method for the Measurement of Nitrate and Nitrite in Seawater

Hitoshi Kodamatani, Takashi Tomiyasu

Kagoshima University

Summary

The concentrations of nitrate and nitrite ions in seawater are essential indicators for understanding the marine environment. We have been developing an analytical system that separates these ions using a semimicro ion-pair chromatography (IPC) technique, converts them into peroxyxynitrite via UV irradiation at 222 nm (PR: photochemical reaction), and detects them through a luminol-based chemiluminescence reaction (CL). This combined system is called IPC-PR-CL. As part of the 2023 fiscal year outcomes supported by this grant program, we developed an IPC column by coating a graphite carbon narrow-bore column (2.1 mm i.d., 30 mm length) with cetyltrimethylammonium. This enabled the separation and quantification of nitrite and nitrate ions within 3 minutes. However, quantitative analysis of real seawater samples was not successfully achieved with this configuration.

To overcome this challenge, the present study utilized a commercially available narrow-bore ion chromatography (IC) column (2.0 mm i.d., 250 mm length) to ensure sufficient separation performance. And then, we optimized the chemiluminescence detection cell and the photochemical reactor. As a result, an IC-PR-CL system incorporating a 1.5 cm PFA tube (0.5 mm i.d.) for the CL detection cell and a 20 cm FEP tube (0.15 mm i.d.) for the PR reactor—corresponding to approximately 1 second of UV exposure time—was established. Using an eluent flow rate of 0.25 mL/min, this configuration successfully enabled the detection of nitrate and nitrite ions in seawater samples. The analysis time per sample remained unchanged from the previous system at 8 minutes, but the eluent consumption was reduced to one-fourth that of previous systems. Under these optimized PR-CL detection conditions, we further explored the feasibility of converting the IC column to the IPC column and modifying the eluent composition to facilitate rapid analysis of seawater samples. It was found that eluent components such as carbonate ions significantly affect not only chromatographic separation but also the PR-CL detection process. Using the established semimicro IC-PR-CL system, we conducted measurements of nitrate and nitrite ions in seawater from three locations in Kagoshima Bay. In particular, at a site known for active submarine hydrothermal venting, higher concentrations of nitrite and a notable decrease in nitrate concentrations were observed compared to other locations. These results suggest that hydrothermal fumarolic activity may be responsible for the reduction of nitrate to nitrite.