

海水中の溶存有機窒素および溶存有機リンの 分析化学的研究

中口 議, 荒木祥子, 山口善敬, 西村 崇

Analytical chemical study on the dissolved organic nitrogen
and dissolved organic phosphorus in sea water

Yuzuru NAKAGUCHI,* Shoko ARAKI, Yoshitaka YAMAGUCHI
and Takashi NISHIMURA

Research Institute for Science and Technology,
Kinki University, Kowakae,
Higashi-Osaka 577-8502, Japan

(Received, December 6, 2004)

Abstract

To elucidate detail distribution of dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic phosphorus (DOP) in the ocean, simultaneous decomposition method of DON and DOP was investigated. Sodium tetraborate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) and potassium peroxodisulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) were used as an oxidizing reagent for the decomposition of DON and DOP. The concentration of $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, the removal of chlorine gas, decomposition temperature and time, the ratio of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ to sample solution were investigated. The recommended decomposition procedure was established. The recommended procedure was applied to the determination of DON and DOP in seawater samples which were collected from the eastern North Pacific.

Key words: Dissolved organic nitrogen, dissolved organic phosphorus, decomposition, nutrients, North Pacific

1.はじめに

近年, 二酸化炭素などの温室効果気体は年々増加する傾向にあり, 地球温暖化による異常気象は避けて通るこ

とは出来ないかもしれない。温暖化への寄与が最も大きい二酸化炭素の起源は陸上生態系, 海洋生態系のほか人為

起源の化石燃料燃焼やセメント生産などがあり、その供給量は毎年約5.4ギガトンと見積もられている。大気中の二酸化炭素は海洋にも吸収され、その量は毎年2.0ギガトンと見積もられている。また、海洋表層には炭素量に換算して1020ギガトン、深層では38100ギガトン蓄えられている¹⁾。海洋に溶け込んだ炭素はその循環が炭酸平衡すなわち無機化学的過程によるアルカリポンプや植物プランクトンが係わる生物ポンプにより支配されている。生物ポンプとは海水に溶け込んだ二酸化炭素を植物プランクトンが光合成により有機物に変える反応で、その際、窒素、リンおよびケイ酸を利用し、窒素は溶存有機窒素 (Dissolved organic nitrogen : DON), リンは溶存有機リン (Dissolved organic phosphorus : DOP) へと溶存形態を変化させる。有光層内で生成されたDONおよびDOPは、バクテリアなどにより分解され無機栄養塩類として再生される。この無機栄養塩は、湧昇により再び海洋表層にもたらされ、植物プランクトン増殖の制限栄養物質となることから、その起源であるDONおよびDOPは、栄養塩濃度を維持するために重要な物質であると考えられてきた^{2~5)}。しかし、海洋におけるDONおよびDOPの分布・挙動は複雑な生物・化学的要因により支配されており、詳細な生成・分解メカニズムや化学的組成などの多くは未だ解明されていない。これまでDONおよびDOPの定量は、様々な分解法を用いて試料中の全ての有機物を分解し、全溶存態窒素 (Total dissolved nitrogen ; TDN) および全溶存態リン (Total dissolved

phosphorus ; TDP) 濃度として定量し、それぞれの濃度より無機態の窒素 ($\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$) およびリン ($\text{PO}_4\text{-P}$) 濃度を差し引くことにより算出してきた^{2~4)}。これまでDONおよびDOPの定量に用いられてきた分解法としては、紫外線照射分解法、高温酸化法および湿式酸化法がある^{2~8)}。Bronk et al. (2000) は、これら三種の分析法について、分解効率やブランク値などの検討を行った結果、他の分析法と比較した場合、ペルオキシ二過硫酸カリウムを用いた湿式分解法は、EDTAやアンチピリン以外の物質に対して最も高い酸化効率を示し、フミン酸などの高分子化合物も効率良く酸化分解できることを示した⁵⁾。しかし、この方法は酸化試薬に含まれるブランク値が高いため、分析の際には注意を要することも指摘されている。また、ペルオキシ二過硫酸カリウムを用いたDOMの湿式酸化法は、対象試料が海水の場合、共存する塩化物イオンによる妨害が大きいことが知られている^{9, 10)}。さらに、湿式分解法によるTDNおよびTDP分析の際に用いられている酸化試薬の濃度は、溶存有機炭素 (Dissolved organic carbon ; DOC) 分析の際に用いられる酸化試薬の濃度と比較して低く、全ての有機物が完全に分解されていない可能性が指摘された^{11, 12)}。

そこで、本研究では海水試料を対象とした湿式酸化法によるDON・DOPの分析法を確立し、海洋におけるDON・DOPの分布、挙動を調査することによりDOMの動態を把握することを目的とした。

2. 実験

2.1. 試薬

溶存有機炭素・溶存有機リン標準溶液

尿素標準溶液 (有機態窒素) : 尿素 (ナカライテスク株式会社製) 0.6010 g を純水で100 mlに定容し、標準原液 (100 mM) とした。これを適宜20 μM に希釈し、この溶液を標準溶

液として用いた。また、標準原液は冷蔵保存し、1ヶ月毎に再調製した。

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 標準溶液 (有機態窒素) : EDTA (ナカライテスク株式会社製) 1.8612 g を純水で100 mlに定容し、標準原液 (50 mM) とした。これを適宜20 μM に

希釈し、この溶液を標準溶液として用いた。また、標準原液は冷蔵保存し、1ヶ月毎に再調製した。

アデノシン-5-三リン酸二ナトリウム(ATP)標準溶液(有機態リン): ATP(ナカライテスク株式会社製) 0.2756 gを純水で100 mlに定容し、標準原液(5 mM)とした。これを適宜1 μ Mに希釈し、この溶液を標準溶液として用いた。

α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム標準溶液(有機態リン): α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム(ナカライテスク株式会社製) 0.7160 gを純水で100 mlに定容し、標準原液(20 mM)とした。これを適宜4 μ Mに希釈し、標準溶液として用いた。また、標準原液は冷蔵保存し、1ヶ月毎に再調製した。

コカルボキシラーゼ標準溶液(有機態窒素・有機態リン): コカルボキシラーゼ(ナカライテスク株式会社製) 0.4608 gを純水で100 mlに定容し、標準原液(10 mM)とした。これを適宜2 μ Mに希釈し、標準溶液として用いた。また、標準原液は冷蔵保存し、1ヶ月毎に再調製した。

混合酸化試薬

四ホウ酸二ナトリウム十水和物はMERCK社製を、ペルオキシ二硫酸カリウムは和光純薬工業株式会社(窒素・リン測定用)を用いた。

栄養塩元素測定用標準溶液

栄養塩標準溶液は地球規模海洋フラックス計画(Joint Global Ocean Flux Study; JGOFS)プロトコール¹³⁾に基づき、保存用A、B標準溶液および測定用C標準溶液を調製した。

ブランクおよび標準溶液作製に用いた低栄養塩海水(Low Nutrients Sea Water; LNSW)は、太平洋上のLNSW(東京大学海洋研究所白鳳丸KH00-3次航海にて採取)を平均孔径0.45 μ mメンブランフィルター(ADVANTEC社製)を用いろ過した。

保存用標準溶液

リン酸塩、硝酸塩A標準溶液(NO_3^-

37500 μ M, HPO_4^{2-} 2500 μ M): リン酸二水素カリウム(ナカライテスク株式会社製)を再結晶法により精製し、シャーレ上に薄く広げ、110 $^{\circ}$ Cで12時間乾燥し、デシケーター内で放冷後、0.3402 gを精秤した。硝酸カリウム(ナカライテスク株式会社製)を再結晶法により精製し、シャーレ上に薄く広げ、110 $^{\circ}$ Cで6時間乾燥し、デシケーター内で放冷後、3.7912 gを精秤した。これらを純水に溶解し、1000 mlに定容した後、ポリエチレン製容器に保存した。

硝酸塩A標準溶液(NO_2^- 2000 μ M): 亜硝酸ナトリウム(キシダ化学株式会社製) 2~3 gをシャーレ上に薄く広げ、110 $^{\circ}$ Cで6時間乾燥し0.1380 gを精秤した。これを純水に溶解し、1000 mlに定容した後、ポリエチレン容器に保存した。

硝酸塩、リン酸塩B標準溶液(以下B標準溶液)(NO_3^- 750 μ M, HPO_4^{2-} 50 μ M): 硝酸塩、リン酸塩A標準溶液を20 ml加え、1000 mlに定容した後、ポリエチレン容器に保存した。

栄養塩元素発色試薬

イミダゾール溶液: 約800 mlの純水にイミダゾール(和光純薬工業株式会社製) 6.0 g、濃硫酸 1.0 mlを加えて溶解させ、純水で1000 mlに定容した後、50% Triton X-100を2 ml添加混合した。

スルファニルアミド溶液: 約800 mlの純水にスルファニルアミド(キシダ化学株式会社製) 10.0 g、濃塩酸 100mlを加えて溶解させ、純水で1000 mlに定容し、50% Triton X-100を1 ml添加混合した。

N-1-ナフチルエチレンジアミン溶液: 約400 mlの純水にN-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩(キシダ化学株式会社製) 0.5 g、濃塩酸5.0 mlを加えて溶解させ、純水で500 mlに定容した。

リン酸発色用混合試薬: 保存用モリブデン酸試薬(約800 mlの純水にモリブデン酸ナトリウム5.6 g、酒石酸アンチモニルカリウム(和光純薬株式会社製) 0.12 gを加えて溶解した後、

濃硫酸35.0 mlを加えて純水で1000 mlに定容した試薬) 100 mlにL-アスコルビン酸 0.55 g を加えて溶解し、15 % SLS水2 mlを添加混合した。

実験に使用した純水は、まずイオン交換を行い、その後蒸留したものを日本ミリポア社製純水製造装置Milli-Q-SP-TOC Water Reagent Systemに通過させたものを使用した。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

2.2. 装置

栄養塩元素の測定にはBLAN+LUEBBE社製水質自動分析装置(AACS-II型4チャンネル)を使用した。

2.3. 海水試料の採取

海水試料は、東京大学海洋研究所所属白鳳丸KH-00-3次航海(2000年6月20日~7月27日)にてBO-1(40° N, 159° E)およびBO-5(20° N, 175° E)で採取した(Fig.1)。また、採水時に採水チューブからの汚染を防ぐためニスキン採水器から直接ガラス瓶(電気炉内にて450 °Cで1時間加熱済み)に採取した。採取した試料はすみやかにガラス繊維製ろ紙(Whatman社製GF/F: 電気炉内にて450 °Cで2時間加熱処理済み)を用いて吸引ろ過を行った。ろ過後の試料は高密度ポリエチレンボトル(ナルゲン社製)に分取後、冷凍保存して研究室に持ち帰った。

2.4. DON, DOPの定量操作

硝酸態窒素および亜硝酸態窒素(カドミウム・銅カラム還元-ナフチル

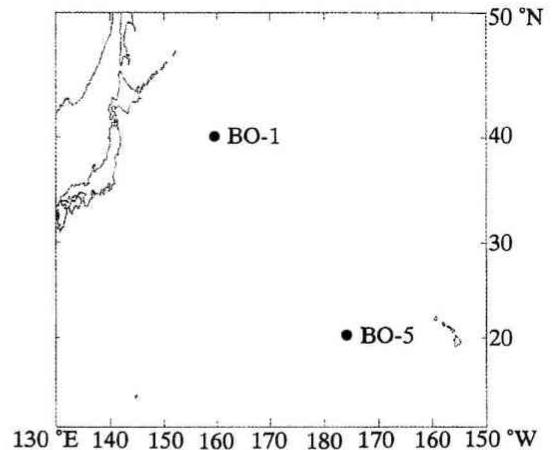


Fig. 1. Sampling Locations

エチレンジアミン吸光度法): 硝酸態窒素はカドミウム反応器により亜硝酸に還元し、試料中の亜硝酸塩とともにスルファニルアミドでジアゾ化し、N-1-ナフチルエチレンジアミンと反応させ、生成した赤紫色を550 nmの吸光度を測定した。

リン酸態リン(アスコルビン酸還元モリブデンブルー法): リン酸塩は酸性溶液中でモリブデン、アンチモンと反応してリン・アンチモン・モリブデンの錯体を生成する。この錯体を、アスコルビン酸を用いて還元し880 nmの吸光度を測定した。

DONおよびDOP濃度: 湿式酸化法を用いて全溶存態窒素(Total dissolved nitrogen; TDN)および全溶存態リン(Total dissolved phosphorus; TDP)濃度を定量し、それぞれの濃度より無機態の窒素($\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$)およびリン($\text{PO}_4\text{-P}$)濃度を差し引くことにより算出した。

3. 結果と考察

3.1. DONおよびDOP同時分解法の検討

Raimbaultらにより報告されているDONおよびDOP同時分解法³⁾を用い、DONおよびDOP標準溶液の分解率を検討した。操作の概略は以下の通りである。

純水およびLNSWを用いて調製した標準溶液5 mlに、混合酸化試薬1 mlを加え、オートクレーブ(120 °C, 1 bar)で1時間加熱した後、室温で放冷した。混合酸化試薬は、40~50 °Cの純水250 mlに30 gの $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ を溶解し、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ を15 g加え調製し

たものを用いた。

実験結果をTable 1に示したが、コカルボキシラーゼ溶液中の窒素の回収率は、純水およびLNSWを用いて調製したいずれの試料もほぼ100%効率良く分解されていることがわかった。一方、リンについては、いずれの試料も、非常に低い回収率を示した。また、純水を用いて調製した α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム溶液中のリンの回収率は95.6%であり、効率良く分解されることがわかった。しかし、LNSWを用いて調製した場合は80.3%と、純水を用いて調製した場合に比べ低い回収率を示した。湿式酸化法は、海水試料を対象とした場合、共存する塩素イオンの妨害により、全ての有機物の分解が完全に行われていない可能性があることが知られている^{9, 10)}。従って、純水を用いて調製した場合に比べ、LNSWを用いて調整した標準溶液は、分解が効率良く行われなかったと考えられる。

Raimbaultの方法をそのまま用いると、海水試料を対象とした場合、DON, DOPが完全に分解されていない可能性が見出された。そこで、湿式酸化法によるDONおよびDOPの同時定量法を再検討することとした。

Table 1 Recovery of nitrogen and phosphorus with the Raimbault's decomposition procedure.

DON and DOP standard solution	Recovery (%)	
	Purified water	LNSW*
Coccarboxylase as DON	100.4	101.0
Coccarboxylase as DOP	19.0	15.6
α -D-Glucose-1-phosphate disodium salt hydrate as DOP	95.6	80.3

*LNSW:Low nutrient sea water

3.2. ペルオキシ二硫酸カリウム濃度の検討

LNSWを用いて調製したコカルボキシラーゼ溶液および α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム溶液各5 mlに、混合酸化試薬1 mlを加え、オートクレーブ(120℃, 1 h)で加熱し、ペルオキシ二硫酸カリウム($K_2S_2O_8$)濃度を変化させ、分解率への影響を調査した。混合酸化試薬は、四ホウ酸二ナトリウム($Na_2B_4O_7$) 12 gを純水100 mlに溶解し、 $K_2S_2O_8$ をそ

れぞれ6, 7, 8, 9 g 加えたものを用い、試料との混合後、最終濃度が0.037, 0.043, 0.049, 0.055 Mとなるように調製した。結果をFig.2に示したが、 α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム溶液においては、全ての条件下で高い回収率(94.5%)が得られた。また、コカルボキシラーゼ溶液中の窒素においては、全ての条件下で高い回収率(109.6%)を得ることができた。しかし、定量値のばらつきが大きく、分解が完全に完了していない可能性が示唆された。一方、コカルボキシラーゼ溶液中のリンの回収率は $K_2S_2O_8$ 濃度を飽和濃度(9.89g / 100 ml)付近まで増加しても52.2%程度であった。なお今後の検討には、 $Na_2B_4O_7$ 12 gおよび $K_2S_2O_8$ 9 gを純水100mlに溶解した混合酸化試薬を用いることとした。

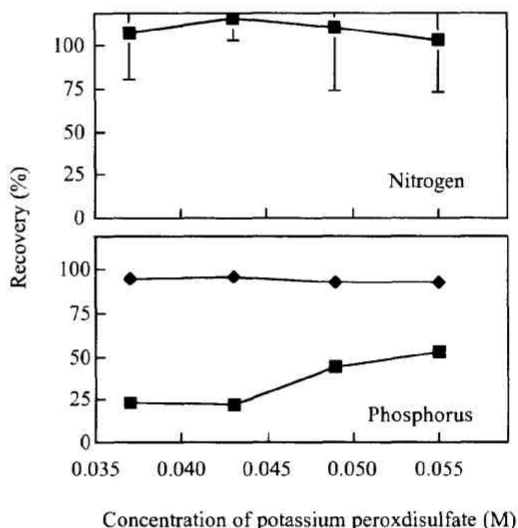


Fig.2 Effect of potassium persulfate concentration on the recovery of nitrogen and phosphorus in purified water.

—■— Coccarboxylase
—●— α -D-Glucose-1-phosphate disodium salt hydrate

次にLNSWを用いて調製したコカルボキシラーゼ溶液および α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム溶液各5 mlに、混合酸化試薬1~5 mlを加え、オートクレーブ(120℃, 1 h)で加熱した。結果をFig.3に示したが、 α -D-グルコース-1-リン酸二ナト

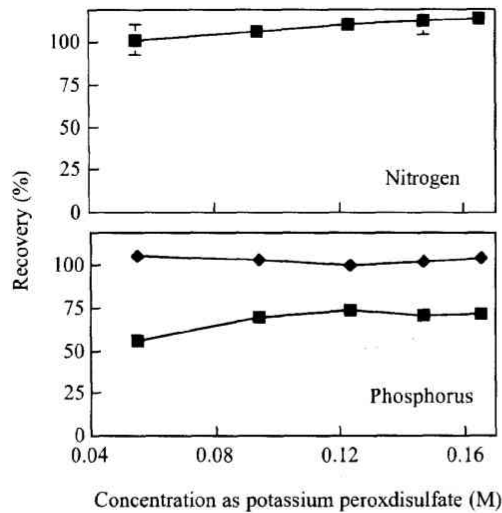


Fig.3 Effect of addition volume of oxydation reagent on the recovery of nitrogen and phosphorus in low nutrient sea water.

■ Cocarboxylase
 ● α -D-Glucose-1-phosphate disodium salt hydrate

リウム溶液中のリンは、全ての条件下で高い回収率（103.3%）が得られた。また、コカルボキシラーゼ溶液中の窒素においても全ての条件下で高い回収率（109.2%）を得ることができた。しかし、コカルボキシラーゼ溶液中のリンの回収率は、混合酸化試薬の添加量すなわち分解時の $K_2S_2O_8$ 濃度の増加に伴い高くなるが、混合酸化試薬を試料と同量の5 ml添加した場合（ $K_2S_2O_8$ の最終濃度0.165 M）においても71.7%であった。この結果からは混合酸化試薬を5 ml以上添加し、溶液中の $K_2S_2O_8$ 濃度を増加させ、更に高い回収率を得ることができると予想されるが、低濃度の海水試料を対象とする際、混合酸化試薬を過剰に添加すると溶液の体積が増し、目的物質を希釈してしまうことになり、分析機器の検出限界を下回る可能性がある。そこで、混合酸化試薬の添加量を5 mlに固定し、分解温度および分解時間の検討を行うこととした。さらに、溶液中の $K_2S_2O_8$ 濃度を増加させ海水中の湿式分解を行った際には、多量の塩素ガスが発生し、分析時にピークの乱れ等の妨害が生じることが確認された。

そこで、まず酸化分解により生じる塩素ガスの溶液中からの除去方法を検討することにした。

3.3. 分解後の試料中の塩素ガス除去

LNSWを用いて調製したコカルボキシラーゼ溶液および α -D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム溶液各5 mlに、混合酸化試薬5 mlを加え、オートクレーブ（120℃, 1 h）で加熱した。分解後の試料に、高純度空気を0, 5, 10, 15分間通気した。結果をTable 2に示したが、通気時間による発色率の違いは認められなかった。しかし、高純度空気を通気しない場合は、測定時のサンプル吸引の際にサンプラーが気泡を吸引するため、ピークに乱れ等が生じることが確認された。従って、今後、分解後の試料は、塩素臭が確認されなくなるまで約10分間、高純度空気を通気させた後、測定することとした。

Table 2 Effect of bubbling time of high purity air on the recovery of nitrogen and phosphorus in low nutrient sea water.

DON and DOP standard solution	Bubbling time (min.)			
	0	5	10	15
Cocarboxylase as DON	83.6	94.9	97.0	98.0
Cocarboxylase as DOP	82.7	79.0	81.0	79.8

unit:%

3.4. 分解温度および分解時間の検討

LNSWを用いて調製したコカルボキシラーゼ溶液5 mlに混合酸化試薬5 mlを加え、オーブン120~180℃にて、0.5時間~5時間加熱し、分解温度および分解時間の検討を行った。結果をFig. 4に示したが、分解温度を120℃に設定した場合の窒素の回収率は、分解時間とともに増加した。また、分解温度150℃では1時間後、180℃では0.5時間後に約100%となり、その後はほぼ一定の値を示した。

一方、リンの回収率は、分解温度120℃または150℃にて0.5時間加熱した場合、約14%と非常に低い値を示し、120℃では5時間、150℃では1時間以上、180℃では0.5時間以上加熱する必要があることがわかった。しかし、180℃で加熱した場合、分解容器の内

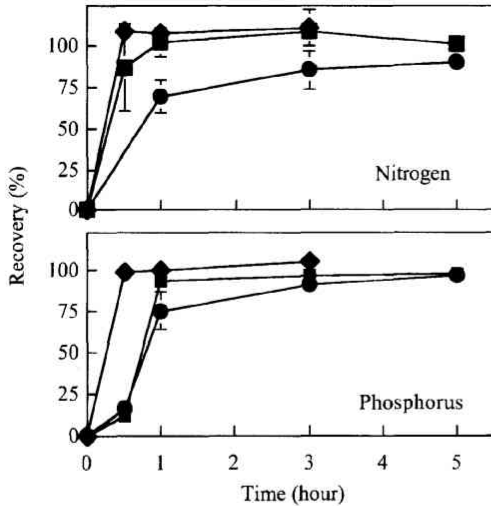


Fig. 4 Effect of heating temperature and time on the recovery of nitrogen and phosphorus in low nutrient sea water.

■ 150 °C ◆ 180 °C ● 120 °C

蓋に使用されているO-リングの激しい劣化が認められた。また、150℃にて1時間加熱した場合の回収率は変動幅が大きかったため、今後、分解温度および分解時間を150℃、3時間に設定し、以降の検討を行うこととした。

3.5. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度比の検討

窒素はアルカリ性溶液下、リンは酸性溶液下の湿式分解により効率よく分解される^{2, 3)}。従って、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ および $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度比による分解時のpH変化が、湿式分解時の窒素およびリンの回収率に影響を与えると考えられる。そこで、混合酸化試薬中の $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度比を検討した。

LNSWを用いて調製したコカルボキシラーゼ5 mlに混合酸化試薬5 mlを加え、オープン(150 °C)で3時間加熱した。混合酸化試薬は、純水100mlに $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ を0, 1.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 g 溶解し、それぞれに $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ を3, 5, 7, 9 g 加えたものを用いた。この時の $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ の最終濃度は0, 0.019, 0.039, 0.053, 0.066, 0.079, 0.092, 0.105, 0.118, 0.131, 0.114, 0.157 Mであり、また $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ の最終濃度は0.056, 0.093, 0.130, 0.167 Mで

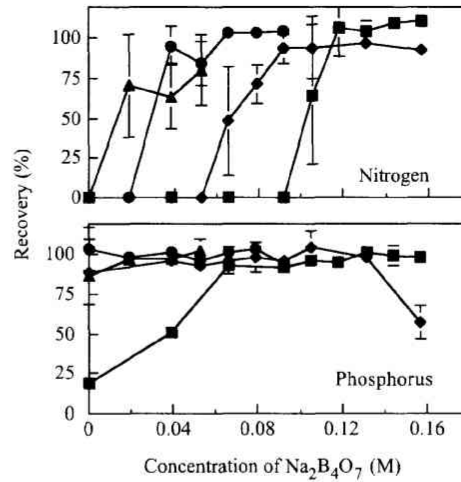


Fig. 5 Effect of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ratio on the recovery of nitrogen and phosphorus in low nutrient sea water

■ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 0.167M ◆ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 0.130M
● $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 0.093M ▲ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 0.056M

ある。

結果をFig.5に示したが、窒素の回収率は、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度が0.093 M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度が0.066 M以上の混合酸化試薬を用いたとき約100 %であった。また、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度が0.130 M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度が0.092 M以上、および $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度が0.167 M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度が0.118 M以上の混合酸化試薬を用いたとき窒素の回収率は約100 %であった。その他の混合酸化試薬を用いた場合は検出不可能または低い回収率を示した。

分解後に測定した試料のpHをFig.6に、また栄養塩標準試薬を用いた試料のpHが発色に与える影響をFig.7に示した。これより、分解後の試料のpHは、硝酸+亜硝酸塩の発色に影響しないと考えられる。一方、酸性条件下での窒素の分解は、 NO_3^- だけではなく、 NOCl 等の他の物質を生成することが知られている³⁾。従って、窒素の回収率は分解後のpHが下がるとともに低下し、データにばらつきが生じる。この原因としてはアルカリ性条件下では窒素の分解が効率が悪く、しかも定量的に進行していないことが考えられる。

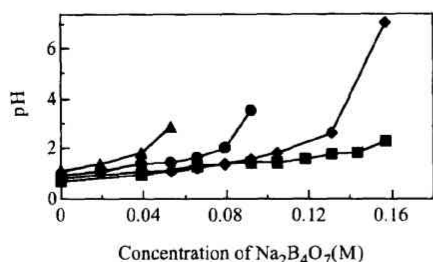
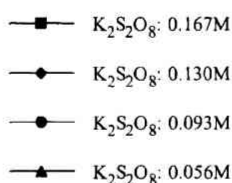


Fig. 6 Effect of $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ratio on the pH value after decomposition.



リンの回収率は、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度が 0.130 M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度が 0.157 M の混合酸化試薬を用いた場合、 57.2 ± 10.4 % であり、分解後の試料の pH は 7.01 であった。Fig. 7 より、分解後の試料の pH がリン酸塩の発色に影響をおよぼさないことがわかった。リンは、酸性条件下の $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ により酸化分解されるため^{2, 3)}、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度が 0.130 M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度が 0.157 M の混合酸化試薬では、リンの分解は不十分であると考えられた。 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度が 0.167 M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度が 0.066 M 以下では、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ の濃度が減少すると共に回収率も減少する傾向が認められた。また、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ のみで分解した場合、回収率にばらつきが生じ、やや低い回収率を示した。先に述べたように、リンは、酸性条件下の $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ により酸化分解されるため、酸化剤のみで分解した場合でも分解可能であると考えられる。pH が 1 以下の場合、リン酸塩の発色率は徐々に減少し、pH が 0.95 のとき、95.0 % であった (Fig. 7)。0.167 M の $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ のみで分解した場合、分解後の試料の pH は 0.77 であり、その他の濃度においても 1 以下であった。従って、酸化剤のみの条件では分解後の試料の pH がリン酸塩の発色に影響を与えていると考えられた。以上の結果より、DON および DOP の同時分解は、混合酸化試薬の最終濃度は最低でも、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度として 0.093

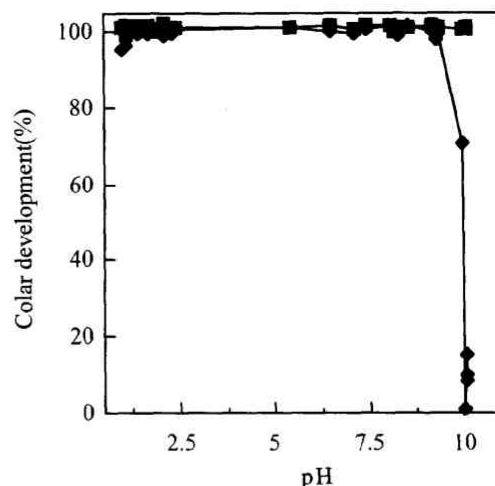


Fig. 7 Effect of pH on the color development of nitrogen and phosphorus



M、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度として 0.079 M 必要であることがわかった。この濃度は、従来から用いられている方法^{2, 3)}の $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度の 2.7 ~ 7.5 倍である。また、Raimbault et al. (1999) により報告されている DON および DOP の同時分解で用いられている混合酸化試薬は、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度 1 に対し、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度 0.7 の割合で調製したものの、Koroleff (1983) はホウ酸緩衝溶液 1 に対し、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度 0.4 の割合で調製したものをを用いている。しかし、本実験結果からは、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度 1 に対し、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度 1 ~ 1.5 の割合で調製したものが適していると考えられた。

3.6. 混合酸化試薬添加量の検討

DON, DOP が低濃度の海水試料を対象とする際、混合酸化試薬の添加により溶液中の目的物質濃度が希釈され、分析機器の検出限界を下回る可能性がある。そこで、混合酸化試薬の最終濃度を、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度 0.079 M、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 濃度 0.093 M となるように固定し、添加量を検討した。LNSW を用いて調製したコカルボキシラーゼ 5 ml に混合酸化試薬 a, b, c, d を 2 ~ 5 ml (Table 3) を加え、150 °C に設定したオープンで 3 時間加熱した。結果を Fig. 8 に示した。

Table 3 Components of oxidizing reagent

Solution	Added(g/100ml)	
	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	K ₂ S ₂ O ₈
a	6.00	5.00
b	6.74	5.63
c	7.99	6.67
d	10.50	8.75

混合酸化試薬2 ml添加した場合においても、5 ml添加時と同様、窒素およびリンは共に高い回収率を示した。湿式酸化法においては、共存する塩素の妨害は、試料の塩素濃度が0.02 M以下となるよう希釈するか反応時間を増大させる、あるいはK₂S₂O₈濃度を増やすことにより改善できることが知られている⁹⁾。海水試料5 mlに対して混合酸化試薬2 ml添加した場合は、150 °Cに設定したオープンで3時間加熱することにより、共存する塩化物イオンの影響を受けることなく効率よく分解できていることがわかった。これまでの検討結果を基に最適分解条件にて、様々な有機態窒素およびリン化合物の標準溶液の分解率を調査した。すなわちLNSWを用いて調製した標準溶液 5 mlに混合酸化試薬2 mlを加え、150 °Cに設定したオープンで3時間加熱した。混合酸化試薬は、純水100 mlにNa₂B₄O₇·10H₂Oを10.50 g 溶解し、K₂S₂O₈を8.75 g 加えたものを用いた。標準溶液には、尿素(20 μM)、EDTA(20 μM)、ATP(1 μM)、α-D-グルコース-1-リン酸二ナトリウム(4 μM)、コカルボキシラーゼ(2 μM)を用いた。

Table 4 Recovery of nitrogen and phosphorus of some DON and DOP reagents decomposed by the recommended procedure.

	Reagent	Recovery(%)	S.D.(n=5)
DON	Urea	106.1	2.8
	EDTA	111.4	1.4
	ATP	108.2	2.3
	Coccalboxylase	102.2	3
DOP	ATP	111.8	1.3
	Coccalboxylase	103.9	1.8
	α-D-Glucose-1-phosphate disodium salt hydrate as DOP	103.1	2.1

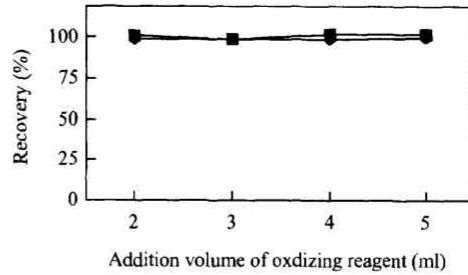


Fig. 8 Effect of addition volume of oxidizing reagent on the recovery of nitrogen and phosphorus

◆ Nitrogen ■ Phosphorus

結果をTable 4に示したが、EDTAや酵素等の化合物は、従来から用いられている湿式分解法および紫外線照射法において酸化分解されにくいことが知られている^{2, 3)}。しかし、本論にて検討した湿式酸化法の分解条件により、全ての標準溶液で高い回収率が得られ、高精度での定量が可能であることがわかった。以上の結果より、海水試料 5 mlに対し、混合酸化試薬 ((Na₂B₄O₇·10H₂O; 10.50 g + K₂S₂O₈; 8.75 g) / 純水100 ml) 2 mlを加え、150 °Cに設定したオープンで3時間加熱することにより、精度良いDONおよびDOPの定量を可能にした。

3.7. 海水試料の分析

確立した溶存有機窒素および溶存有機リンの同時分解法を、海水試料に適用した。西部北太平洋試料採点BO-1およびBO-5におけるDOC, DONおよびDOPの鉛直分布をFig.9に示した。

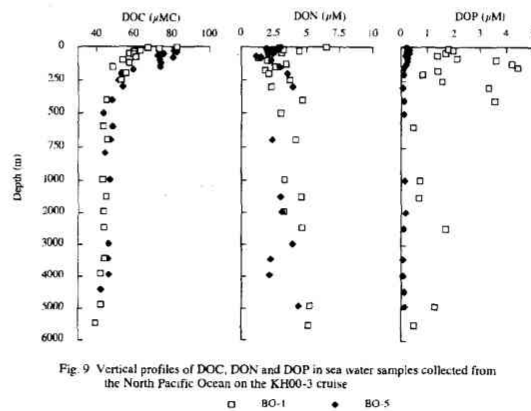


Fig. 9 Vertical profiles of DOC, DON and DOP in sea water samples collected from the North Pacific Ocean on the KH00-3 cruise

□ BO-1 ● BO-5

4.まとめ

海洋における溶存有機窒素および溶存有機リンの動態解明を行う目的で、全窒素および全リン同時分解方法について検討した。その結果、海水試料5mlに対し混合酸化試薬（純水100mlに対してペルオキソ二硫酸カリウム10水和物を8.75g、四ホウ酸ナトリウム十

水和物を10.5g加えたもの）を2ml加え、150℃で3時間加熱した場合、有機窒素ならびに有機リン標準溶液に対し、効率良く分解できることが確認できた。また確率した分解法を西部北太平洋海水試料に適用し、鉛直分布を明らかにした。

5.参考文献

- 1) IPCC第2次報告書：地球温暖化の実態と見通し，気象庁編（1996）p. 13.
- 2) D. Bronk, M. Lomas, P. Glibert, K. Schukert and M. Sanderson(2000) *Mar. Chem.*, 69, 163-178.
- 3) P. Raimbault, W. Pouvesle, F. Diaz and N. Garcia (1999) *Mar. Chem.*, 66, 161-169.
- 4) F. Koroleff (1983) *Method of seawater analysis 2nd ed.*, K. Groff, M. Ehrhardt, and M. Kremling (eds), Verlag Chemie, p.168-172.
- 5) J. Valderrama (1981) *Mar. Chem.*, 10, 109-122.
- 6) Y. Maita and M. Yanada (1990) *Geochem. J.*, 24, 245-254.
- 7) F. Nydahl (1978) *Water Research*, 12, 1123-1130.
- 8) D. Peat, I. McKelvie, G. Matthews, P. Haygarth and P. Worsfold (1997) *Talanta*, 45, 47-55
- 9) G. Aiken(1992) *Environ. Sci. Technol.*, 26, 2435-2439.
- 10) J. McKenna and P. Doering (1995) *Mar. Chem.*, 66, 161-169.
- 11) D. Menzel and R. Vaccaro (1964) *Limnol. Oceanogr.*, 9, 138-142.
- 12) J. Sharp (1973) *Mar. Chem.*, 1, 211-229.
- 13) *Protocols for Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements(1994)* A. Knap, A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dickson (eds), p. 43-91.