

簡易分析装置による窒素スペシエーションの信頼性

隅 田 隆

1. はじめに

水産系の現場において、形態別窒素の測定は成長率や生命体の維持のため重要である。一般に窒素の形態別測定方法は確立しており、アンモニウム態窒素ではインドフェノール法⁽¹⁾、硝酸態窒素ではCd-Cuカラム還元スルファニルアミドナフチルエチレンジアミン法⁽²⁾⁽³⁾、また、亜硝酸態窒素では、スルファニルアミドナフチルエチレンジアミン法⁽⁴⁾などが広く知られている。

しかし、実際の分析では、測定に要する試薬類、機器が必要となり、さらに、操作が複雑である程度の慣れが必要となり、ルーチン業務では測定者の負担となっている。そういったなか、自動分析装置として液送型や気泡分節型のFlow Injection Analyzer (FIA)⁽⁴⁾⁻⁽⁶⁾が分析性能も向上し普及しつつある。しかし、FIAは、高価であり、保守管理も大変であり、また小数サンプルを迅速に測定できないことより、水産系の現場などで簡易分析装置が出回ってきた。これは、付属の容器に試料を入れ専用の試薬を加えることにより発色反応を起こし簡単に測定できるものである。

今回は、簡易分析装置が測定値の正確さ、精度において、水産現場で使えるかどうかについて調べたので報告する。

2. 実験方法

アンモニウムイオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンの項目について、以下の試料・装置を用い簡易分析装置と公定法によるFIAの分析結果を比較評価した。

2.1 試料

実試料は魚類飼育に用いている水槽内海水を0.45 μ mセルロース混合エステルメンブランフィルター（アドバンテック東洋）にてろ過したものをを用いた。標準試料としては、アンモニウムイオ

ン（1000mg/l標準溶液、和光純薬）、硝酸イオン（1000mg/l標準溶液、和光純薬）、亜硝酸イオン（1000mg/l標準溶液、和光純薬）をそれぞれ希釈して用いた。溶液調整には純水（WL-100セントラル+Milli-Qlow sp ミリポア）を使用した。

2.2 装置

簡易分析装置はHACH社製DR2010を、また、比較にはFIAのBRAN-LUEBBE社製 autoanalyzer III型を使用した。

3. 結果及び考察

3.1 測定値の確度

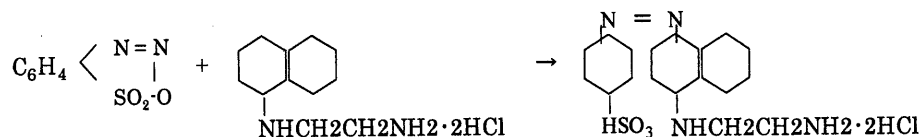
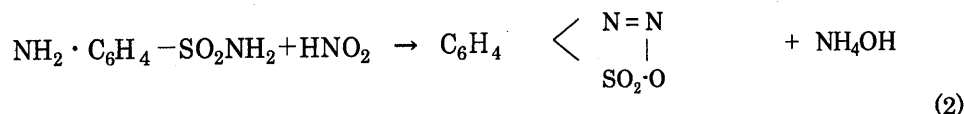
FIAでの自動分析法は、窒素リンなど栄養塩類の公定法原理を用いた測定方法⁽⁷⁾で、信頼できる分析値が得られるようになっている⁽⁸⁾⁻⁽¹²⁾。

今回、アンモニウムイオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンの測定結果よりHach及びFIDとの比較を行った。その結果を図1に示した。アンモニウムイオンにおいて、FIA (X) とHach (Y) との相関係数は0.9511、回帰式 ($Y=0.8823X+0.0882$)、硝酸イオンにおいては、相関係数0.1554回帰式 ($Y=1.4449X-1.542$)、亜硝酸イオンにおいては、相関係数0.9629回帰式 ($Y=1.1283X-0.0231$)であった。アンモニウムイオン及び亜硝酸イオンでは、両法の測定値はよく一致しており相関係数も1に近く、回帰式もほぼ原点を通り傾きが1に近い直線となった。一方、硝酸イオンでは、相関係数が0.1554と低く両法の測定値は一致しなかった。

硝酸イオンの測定では、(1)式による銅カドミウム還元カラムによって亜硝酸イオンに還元する。更に(2)式に示すように生成された亜硝酸イオンは、酸性の条件下でスルファニルアミドとジアゾ化反応をさせ、次にN-1-ナフチルエチレンジアミンとカップリング反応をさせる。生成したアゾ色

素を、吸収極大波長で比色定量される。(2)式の反応は、亜硝酸イオンの定量においても同様の原

理であり、亜硝酸イオンの定量では、(2)式のみを行う。



今回、硝酸イオンの測定でFIAと相関性がない原因を考えると、(2)式アゾ化においては、同じ反応原理である亜硝酸イオンで相関性がよいことより、(1)式における硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元反応に原因があると考えられた。一般にFIAを含む公定法ではカドミウム金属に銅コーティングしたカラムを用い、そのカラムに測定試料を通すことにより還元反応が起こっている⁽⁷⁾⁽⁸⁾。一方、

Hachでは、銅をコーティングしたカドミウムパウダーを試料に混合放置することにより還元反応させている。このことより、Hachでは、混合時間・放置時間により還元率が変化し、FIA法の結果とに差が生じたものと考えられた。これらのことよりHachでは標準溶液を用い還元率を十分確認することが重要と思われる。

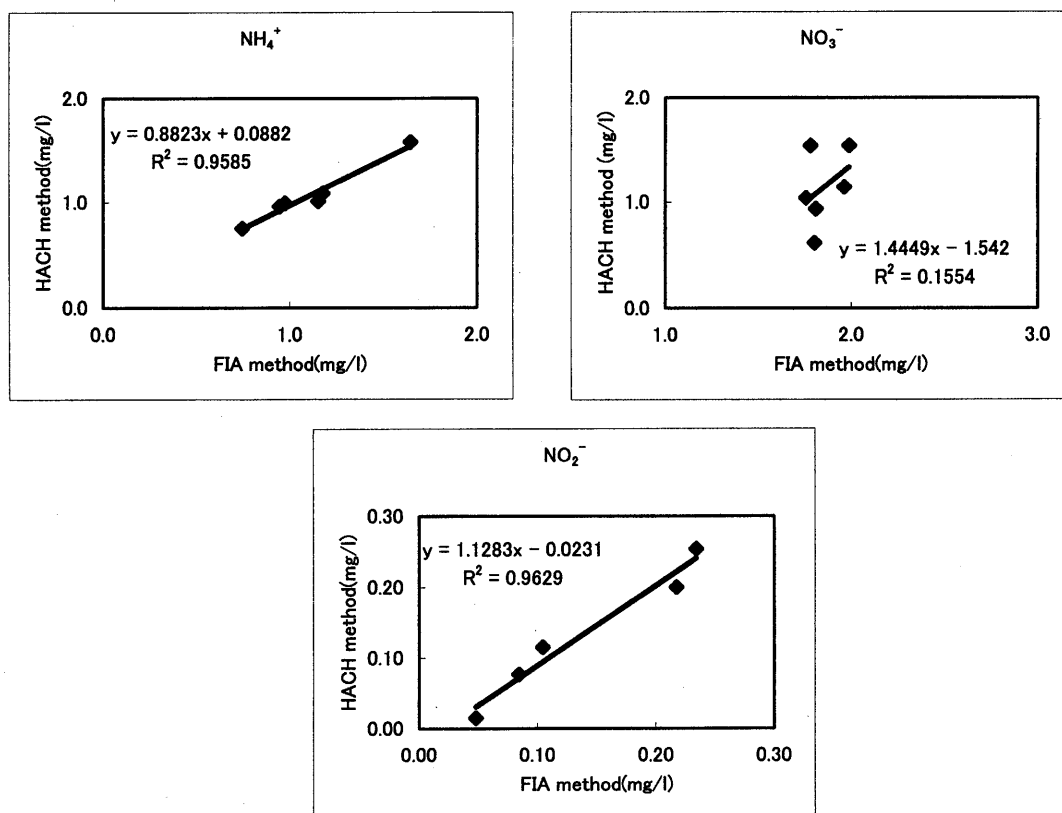


Fig.1 Correlation of the measured value of HACH method and FIA method.

3.2 測定値の再現性

次に無機体窒素の測定における繰り返し精度(再現性)を調べた。表1にその結果を示す。硝酸イオンは標準偏差3.0、相対標準偏差率28%、亜硝酸イオンは標準偏差0.008、相対標準偏差率28%で、ばらつき程度は大きい結果となった。それに対しアンモニウムイオンでは、標準偏差0.06、相対標準偏差率6.1%で比較的ばらつきは少なかった。

Table 1 Reproducibility. (n=6)

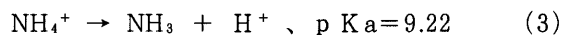
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻
Standard deviation	0.06	3.0	0.008
Relative SD(%)*	6.1	28	28

*:RSD were calculated from six replicate HUCK procedures.

このばらつきについては、同一試料の操作間に生じる混合時間、放置時間の差が考えられ、繰り返しの操作による操作条件の統一に注意する必要があると考えられた。これらのことより、実際の測定では、アンモニウムイオンの測定値では5%強のばらつきを考慮、硝酸・亜硝酸イオンでは30%弱のばらつきを考慮する必要がある。

3.3 アンモニウムイオン濃度よりアンモニア濃度の計算

最近、水産現場での魚類飼育において非解離のアンモニアが魚類に対して強い毒性を有すると言われている⁶⁾。3.1および3.2の結果よりアンモニウムイオンの測定は比較的正確な値が得られることがわかった。そこで、アンモニウムイオン値よりアンモニア濃度の計算方法を調べてみた。弱電解質であるアンモニアは水と不完全解離し、(3)式の部分的解離がおこる。⁶⁾



(3)式は(4)式に表すことができる。ここで、[H⁺]と[NH₄⁺]はpHと測定したアンモニウムイオン濃度でわかっているので、結果的に(5)式により求めることができる。

$$[\text{NH}_3] \cdot [\text{H}^+] / [\text{NH}_4^+] = K_a = 5.5 \times 10^{-10} \quad (4)$$

$$[\text{NH}_3] = 5.5 \times 10^{-10} \times [\text{NH}_4^+] / [\text{H}^+] \quad (5)$$

(5)式よりアンモニア濃度はpHに依存しpHが低下するほどアンモニア濃度が高くなることが考えられる。今回使用した試料より(5)式を用いアンモニア濃度を計算してみた。アンモニウムイオン=1.6mg/l、pH=7.4の時、アンモニア0.02mg/lとなり、アンモニア濃度はアンモニウムイオン濃度と比較して2桁下の値となった。

4. まとめ

以上の結果より、アンモニウムイオン、亜硝酸イオンの測定は公定法と近い値が得られたが、硝酸イオンでは比較的精度に欠けた。また、再現性では、アンモニウムイオンが比較的再現性があったが、硝酸・亜硝酸イオンでばらついた測定値となった。これらは、反応時間など操作手順が原因と考えられた。実際、測定を行う場合、測定者が事前に反応時間など標準試料を用い、測定者自身の手順を決めておく必要があると思われた。

水産現場での使用は、測定値がアンモニウムイオンで5%強、硝酸・亜硝酸イオンで30%弱の範囲内で濃度目安となり、精度を要する測定ではFIAとの併用が望ましい。しかし、Hachの分析性能を理解した上での使用は、簡便性に優れ、魚類飼育上の測定で有効と思われる。

また、理論式によりアンモニウムイオン濃度からアンモニアの濃度を推定でき、水産現場でのアンモニア濃度制御の目安となると考えられる。

5. 参考文献

- (1) M.I.Liddicoat, Susan Tibbitts, and E.I.Butler, *Limnol. Oceanogr.*, 20, 131-132 (1975)
- (2) E.D.Wood, F.J.Armstrong, F.A.Richards, *J. Mar.Biol. Ass.U.K.*, 47, 23 (1967)
- (3) J.D.H.Strickland and T.R.Parsons *A Practical Handbook of Seawater Analysis. Fisheries Research Board of Canada Ottawa*, Bulletin 167 (1972)
- (4) J.F.van Staden, A.E.Joubert, H.R.van Vliet, *Anal. Chem.*, 325, 150 (1986)

- (5) A.Al-Wehaid, A.Townshend, *Anal.Chim.Acta*, 186, 289 (1986)
- (6) S.Motomizu, H.Mikasa, K.Toei, *Anal.Chim.Acta*, 193, 343 (1987)
- (7) 財団法人日本気象協会, 海洋観測指針 (気象庁編), (1990)
- (8) H.Muraki, K.Higuchi, M.sasaki, T.Korenaga, K.Toei, *Anal.Chim.Acta*, 261, 345 (1992)
- (9) 多田哲子, 筒井剛毅, 第3回オートアナライザー研究会講演要旨集, P23 (1996)
- (10) 後藤妙子, 第4回オートアナライザー研究会講演要旨集, P22 (1997)
- (11) 才野敏郎, 第5回オートアナライザー研究会講演要旨集, P1 (1998)
- (12) 草川智子, 岡田亜希子, 第6回オートアナライザー研究会講演要旨集, P15 (1999)
- (13) 日本工業規格, JISK0102工業排水試験方法, (1998)
- (14) 吉野博之, D.E.Gruenberg, 渡部勇, 宮嶋克己, 佐藤修, 水産増殖, 47(2), 289 (1999)
- (15) A.J.Bard, 松田好晴・小倉興太郎共訳, 溶液内イオン平衡 (理論と計算) P148 (1983)