

ノ ー ト

モリブデン酸とマラカイトグリーンのポストカラム誘導体化法を用いるイオン排除型イオンクロマトグラフィー/吸光光度法による河川水中オルトリン酸とケイ酸の同時定量

中谷 暢丈^{®1}, 増田和香子¹, 小崎 大輔¹, 森 勝 伸²,
長谷部 清³, 中越 信和¹, 田中 一彦¹

1 緒 言

リンは、窒素と並んで植物プランクトンの栄養塩類であり、農業用肥料、家庭排水や工場排水等の人為的発生源を主な起源とする。流域から河川を介したダム湖や内湾等の閉鎖性水域へのこれら栄養塩類の過剰な負荷は、アオコや赤潮といった藻類の異常増殖を引き起こし、上水の異味異臭や魚類の斃死等の環境問題につながることから、流域全体の負荷削減に向けた各種排水の濃度管理や総量規制が行われている。他方、岩石の風化を主な起源とするケイ素は、植物プランクトンのケイ藻類にとって重要な栄養塩類である。近年、河川水中ケイ酸濃度の長期的な変化が河口及び沿岸域での植物プランクトンの種構成を変化させている事例¹⁾が報告されており、水質規制のない物質でありながらも、生物地球化学的物質循環における動態や影響を解明する上で重要な水質項目の一つとして考慮される必要がある。

河川水中に存在するリンやケイ素のうち、植物プランクトンに直接吸収利用される化学形態のオルトリン酸及びケイ酸の測定は、共にモリブデン酸とのヘテロポリ酸錯体やその還元体を用いた吸光光度法が一般的である^{2)~4)}。しかしながら、ヘテロポリ酸錯体であるモリブドリン酸とモリブドケイ酸は同じ波長域に吸収帯を有することから、酒石酸添加によるモリブドケイ酸の形成阻害やシュウ酸添加によるモリブドリン酸の分解を行った上で個別に測定されている²⁾⁵⁾。

これまで著者らは、イオン排除型イオンクロマトグラフィーを用いてオルトリン酸とケイ酸をイオン排除的に分離した後、ポストカラム誘導体化反応としてヘテロポリ酸錯

体形成反応に基づく吸光光度法を組み合わせた同時分離計測法について報告してきた^{6)~8)}。しかしながら、一般的に河川水中濃度が数 mg L⁻¹であるケイ酸に対して、これらの方法は十分な感度があるものの、湖沼類型 I における全リンの環境基準である 5 µg L⁻¹を満たす数 µg L⁻¹濃度のオルトリン酸を精度よく測定するには感度が不十分であるため、より高感度な方法が必要とされる。

モリブドリン酸やモリブドケイ酸は、トリフェニルメタン系陽イオン染料のマラカイトグリーンとモル吸光係数の高いイオン会合体を形成することから、オルトリン酸やケイ酸の高感度測定方法として、このイオン会合体形成による吸光光度法⁹⁾¹⁰⁾やフローインジェクション法¹¹⁾¹²⁾がこれまで報告されてきた。そこで本研究では、イオン排除型イオンクロマトグラフィーとポストカラム誘導体化法として各ヘテロポリ酸錯体とマラカイトグリーンとのイオン会合体形成反応を用い、オルトリン酸とケイ酸の同時分離計測方法について検討した。特に、河川水中で低濃度であるオルトリン酸の高感度分析に重点を置き、ポストカラム誘導体化における反応溶液の組成について検討を行ったので、その結果について報告する。

2 実 験

2.1 装置及びカラム

測定装置として、SD-8022型オンラインデガッサ、DP-8020型送液ポンプ2台、CO-8020型カラム恒温槽及びUV-8020型紫外可視検出器から構成される東ソー製イオンクロマトグラフシステムを用いた。このシステムの制御及び得られたデータの解析と管理は、LC-8020 MODEL II データプロセッサを用いて行った。分離カラムには、ポリメタクリレートを担体とする水素型弱酸性陽イオン交換樹脂を充填した東ソー製 TSKgel Super IC-A/C (150 mm × 6.0 mm I.D., イオン交換容量 0.2 meq. mL⁻¹)を用いた。試料注入には、100 µLのサンプルループを接続したレオダイン製六方バルブを使用した。溶離液の送液には、内径 0.25 mm の

¹ 広島大学大学院国際協力研究科開発科学専攻: 739-8529 広島県東広島市鏡山 1-5-1

² 群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻: 376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1

³ 藤女子大学大学院人間生活学専攻: 061-3204 北海道石狩市花川南 4 条 5

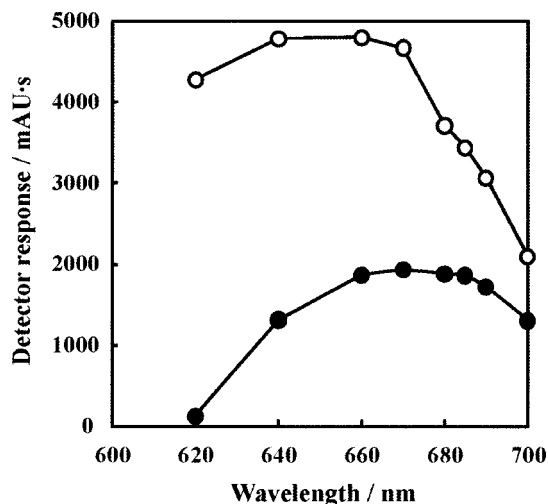


Fig. 1 Dependence of detector responses for orthophosphate and silicate ions upon wavelength

A color-forming reactant, 100 mM H_2SO_4 /10 mM Na_2MoO_4 /0.05 mM malachite green/30% ethanol. Lines—○: orthophosphate ion (0.2 mg L^{-1} as P), ●: silicate ion (2.0 mg L^{-1} as Si)

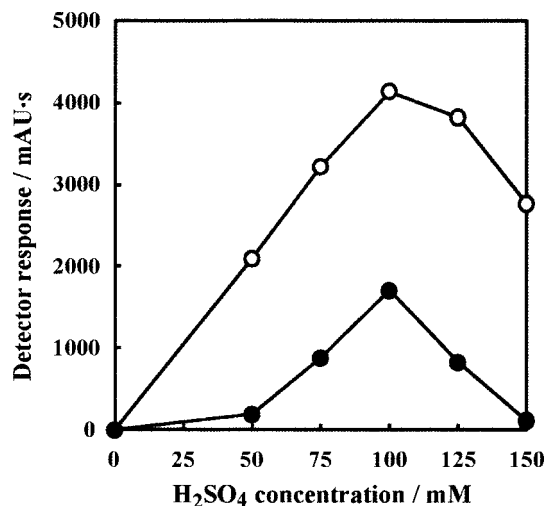


Fig. 2 Effect of H_2SO_4 concentration in the reactant on the detector responses for orthophosphate and silicate ions

The other conditions are as in Fig. 1. Lines—○: orthophosphate ion, ●: silicate ion

PEEK 製チューブを用いたが、反応コイル (長さ 6 m) を含めた反応溶液と接する部分については、内径 0.25 mm の Teflon® PTFE 製チューブを用いた。カラムは反応コイルとともに 45°C のカラム恒温槽内に設置した。溶離液及び反応溶液の流量は、それぞれ 0.4 及び 0.2 mL min^{-1} とした。

2.2 試薬

本実験において使用した試薬は、すべて和光純薬製のものを用いた。オルトリン酸及びケイ酸の標準溶液として、それぞれ市販の水質試験用リン標準溶液 (1000 mg P L^{-1}) 及び原子吸光分析用ケイ素標準溶液 ($1000 \text{ mg Si L}^{-1}$) を適宜希釈して使用した。各試薬溶液の調製及び移動相には、蒸留水を一次水として超純水製造装置 Milli-Q Labo (Millipore 製) で精製した超純水 ($>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) を使用した。モリブデン酸ナトリウム及びマラカイトグリーンは、それぞれ 1 M 及び 5 mM 水溶液をストック溶液として調製した。イオン会合体形成のポストカラム誘導体化反応溶液として、硫酸、モリブデン酸ナトリウム溶液、マラカイトグリーン溶液及びエタノールを適宜混合して超純水で定容し、暗所で 2 時間静置後、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ メンブレンフィルター (DISMIC®-25_{HP} PTFE, Advantec 社) を用いて濾過したものを用いた。

3 結果と考察

3.1 測定波長の選択

反応溶液として、 100 mM 硫酸/ 10 mM モリブデン酸ナトリウム/ 0.05 mM マラカイトグリーン/ 30% エタノール

混合溶液を使用した際の測定波長に対するオルトリン酸及びケイ酸のピーク面積の変化を Fig. 1 に示す。オルトリン酸及びケイ酸は、共に 660 nm 付近で最高感度を示したが、このときケイ酸のピークテールはベースラインを大きく下回った。マラカイトグリーン自身やモリブデン酸とマラカイトグリーンとの錯体は、波長 660 nm 以下に光吸収帯を有し、測定対象であるイオン会合体の光吸収帯と重なっている¹²⁾。したがって、使用濃度の高かったケイ酸がイオン会合体を形成する際、マラカイトグリーンやモリブデン酸とマラカイトグリーンとの錯体の大量消費に伴う吸光度の大幅な低下が起こり、その結果ベースラインを下回るピークテールとして現れたものと考えられた。

本研究では、マラカイトグリーンそのものやモリブデン酸とマラカイトグリーンとの錯体の光吸収帯による影響を受けず、オルトリン酸とケイ酸の各ピーク前後がベースライン付近で平坦となった 680 nm を測定波長として選択した。

3.2 反応溶液組成の最適化

低濃度オルトリン酸に対応した高感度測定を目指し、誘導体化反応溶液組成の最適化について検討した。Fig. 2 に各標準溶液のピーク面積に対する反応溶液中硫酸濃度の影響を示す。硫酸濃度 100 mM 付近において最高検出感度を示したことから、本研究では反応溶液の最適硫酸濃度を 100 mM と判断した。同様に、モリブデン酸ナトリウム濃度についても検討を行ったところ、 10 mM において最高検出感度を示したことから、これを最適濃度とした。

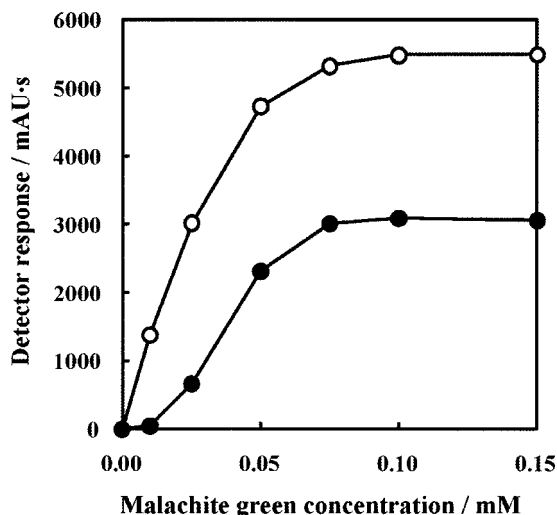


Fig. 3 Effect of malachite green concentration in the reactant on the detector responses for orthophosphate and silicate ions

The other conditions are as in Fig. 1. Lines—○: orthophosphate ion, ●: silicate ions

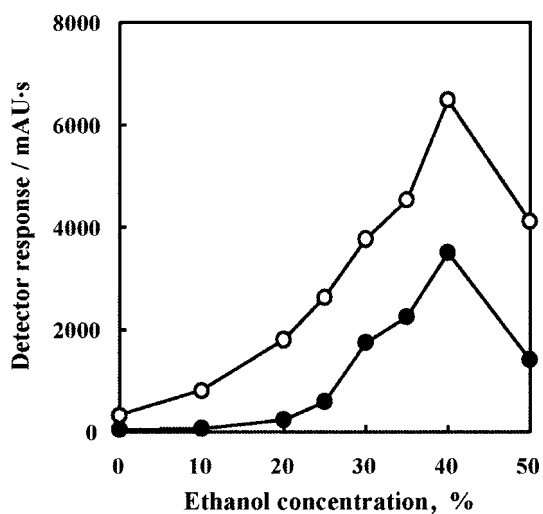


Fig. 4 Effect of ethanol concentration in the reactant on the detector responses for orthophosphate and silicate ions

The other conditions are as in Fig. 1. Lines—○: orthophosphate ion, ●: silicate ion

反応溶液中マラカイトグリーン及びエタノール濃度が検出感度に及ぼす影響について、検討結果をそれぞれ Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。マラカイトグリーン濃度の増加とともに検出感度は増加する傾向にあったが、0.1 mM 以上の濃度においてはほぼ一定の値を示した。エタノールにおいても、その濃度の増加とともに検出感度は増加した。アルコール系有機溶媒の混合によるイオン会合体の検出感度増加は、ヘテロポリ酸錯体生成速度の増加に加えて、マラカイ

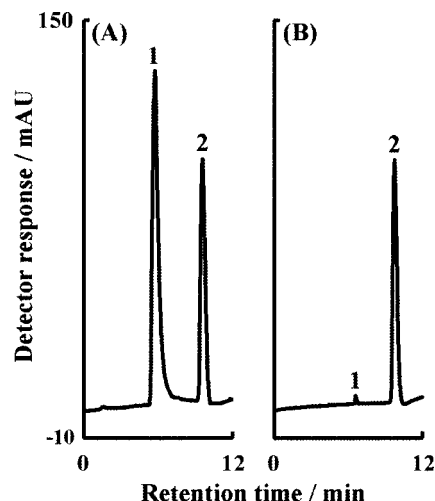


Fig. 5 Typical chromatogram of orthophosphate and silicate ions obtained using optimized analytical conditions in (A) standard solution ($200 \mu\text{g P L}^{-1}$ and $2000 \mu\text{g Si L}^{-1}$) and (B) river water sample (5 times diluted)

The other conditions are as in Fig. 1. Peaks—1: orthophosphate ion, 2: silicate ion

トグリーンの1価陽イオン体の存在割合の増加によるイオン会合体形成の促進による効果である¹²⁾。しかしながら、エタノール濃度が40%を超えると検出感度は急激に低下した。反応溶液の調製時、エタノール濃度が40%を超える溶液では、モリブデン酸ナトリウムを加えると白色沈殿の形成が認められたことから、高濃度のエタノール溶液ではモリブデン酸ナトリウムの溶解度が低く、その結果として検出感度が低くなったものと考えられた。更に、0.075 mM 以上のマラカイトグリーン又は35%以上のエタノールの条件では、ベースラインのドリフトやノイズの増加が顕著であったことを考慮して、本研究では、それぞれ0.05 mM マラカイトグリーン及び30%エタノールを最適濃度として選択した。

3.3 検量線、検出限界値及び再現性

最適化した反応溶液(100 mM 硫酸/10 mM モリブデン酸ナトリウム/0.05 mM マラカイトグリーン/30% エタノール混合溶液)を用いて検量線を作成したところ、オルトリン酸は $0 \sim 200 \mu\text{g L}^{-1}$ 、ケイ酸は $0 \sim 2000 \mu\text{g L}^{-1}$ の濃度範囲で良好な直線性(共に $r^2 = 0.998$)を示した。標準溶液のクロマトグラムを Fig. 5A に示す。なお、これら各検量線の最大濃度を越えた場合、特にケイ酸において顕著な頭打ちとなった。これは、ケイ酸の物質質量に対するマラカイトグリーンの物質質量が不十分のため、存在するケイ酸の物質質量に相当したイオン会合体が形成されなかったためと考えられた。

オルトリン酸及びケイ酸の検出限界値($S/N = 3$)は、そ

れぞれ $0.3 \mu\text{g P L}^{-1}$ 及び $2.5 \mu\text{g Si L}^{-1}$ であった。これらのうちオルトリン酸の検出限界値は、モリブデンイエロー ($4.8 \mu\text{g P L}^{-1}$)⁶⁾ やモリブデンプルー ($1.5 \mu\text{g P L}^{-1}$)⁷⁾ を誘導体化法としたイオン排除型イオンクロマトグラフィーと比べて5~10倍高感度な結果であった。

オルトリン酸 $20 \mu\text{g P L}^{-1}$ 及びケイ酸 $200 \mu\text{g P L}^{-1}$ におけるピーク面積の相対標準偏差 ($n=5$) はそれぞれ3.2%及び1.4%であり、保持時間の相対標準偏差はそれぞれ1.6%及び0.5%と良好であった。しかしながら、時間とともに徐々にベースラインノイズの増大とドリフトに加え、長時間の測定においては反応コイル内や検出セル内にイオン会合体が吸着・析出する問題があり、今後の課題となっている。

3・4 実試料への適用

実試料への適用として、広島県東広島市黒瀬川の河川水試料(5倍希釈)を用いたときのクロマトグラムをFig. 5Bに示す。更に本法の信頼性を確認するため、河川水試料への添加回収試験を行ったところ、オルトリン酸及びケイ酸においてそれぞれ97.2%及び102.5%と良好な結果が得られた。

4 結 言

本研究では、イオン排除型イオンクロマトグラフィーによりオルトリン酸とケイ酸を分離した後、ポストカラム誘導体化法としてモリブデン酸とマラカイトグリーンとのイオン会合体形成反応による吸光光度法を用いた同時分離測定において、反応溶液の最適化を行うことで、特に低濃度のオルトリン酸に対応した測定が可能になった。ベースラインノイズの増加やドリフト、長時間の測定におけるイオ

ン会合体の反応コイルや検出セル内への吸着・析出の課題があるが、本法は河川水実試料に適用できることを確認した。

東ソー(株)バイオサイエンス事業部の皆様方には、多くのご協力をいただいたことを深謝します。また、本研究は国土交通省中国地方整備局からの委託研究の一部である。

(2008年5月16日、第69回分)
析化学討論会において一部発表)

文 献

- 1) V. Ittekkot, C. Humborg, P. Schäfer: *Bioscience*, **50**, 776 (2000).
- 2) L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, R. R. Trussell: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 17th Edition, (1989), (American Public Health Association, Washington DC).
- 3) JIS K 0101, 工業用水試験方法 (1998).
- 4) JIS K 0102, 工場排水試験方法 (2008).
- 5) C. X. Galhardo, J. C. Masini: *Anal. Chim. Acta*, **417**, 191 (2000).
- 6) M. Ikedo, M. Mori, K. Kurachi, W. Hu, K. Tanaka: *Anal. Sci.*, **22**, 117 (2006).
- 7) N. Nakatani, D. Kozaki, W. Masuda, N. Nakagoshi, K. Hasebe, M. Mori, K. Tanaka: *Anal. Chim. Acta*, **619**, 110 (2008).
- 8) N. Nakatani, W. Masuda, D. Kozaki, R. Goto, N. Nakagoshi, M. Mori, K. Hasebe, K. Tanaka: *Anal. Sci.*, **25**, 379 (2009).
- 9) S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Tôei: *Analyst*, **108**, 361 (1983).
- 10) S. Motomizu, M. Oshima, Y. Ojima: *Anal. Sci.*, **5**, 85 (1989).
- 11) S. Motomizu, T. Wakimoto, K. Tôei: *Talanta*, **30**, 333 (1983).
- 12) 本水昌二, 安田祐子, 大島光子: 日本化学会誌, **1991**, 1624.

Simultaneous Determination of Orthophosphate and Silicate Ions in River Water by Ion-Exclusion Chromatography with Postcolumn Spectrophotometric Detection Using Molybdate and Malachite Green

Nobutake NAKATANI¹, Wakako MASUDA¹, Daisuke KOZAKI¹, Masanobu MORI²,
Kiyoshi HASEBE³, Nobukazu NAKAGOSHI¹ and Kazuhiko TANAKA¹

¹ Graduate School for International Development and Cooperation, Hiroshima University, 1-5-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-shi, Hiroshima 739-8529

² Graduate School of Engineering, Gunma University, 1-5-1, Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376-8515

³ Faculty of Human Life Sciences, Fuji Women's University, Hanakawa, Ishikari-shi, Hokkaido 061-3204

(Received 11 November 2008, Accepted 25 December 2008)

The simultaneous determination of orthophosphate and silicate ions in river water was examined using ion-exclusion chromatography with spectrophotometric detection at 680 nm after derivatization with molybdate and malachite green. In this study, optimization of the color-forming reactant composition to form the ion association complex of heteropolyacids with malachite green was examined. The optimum concentration of ethanol (30%) in the reactant accelerated the formation of the ion-association complex, resulting in high sensitivity for the detection of ions. Using the optimized reactant containing 100 mM H₂SO₄/10 mM Na₂MoO₄/0.05 mM malachite green/30% ethanol, the calibration curve of orthophosphate and silicate ions was linear in the range of 0~200 µg L⁻¹ as P and 0~2000 µg L⁻¹ as Si with a good correlation coefficient of 0.998. The relative standard deviations of the peak areas and the retention time of orthophosphate and silicate ions were between 0.5 and 3.2% for five repeated measurements. The detection limits of orthophosphate and silicate ions were 0.3 and 2.5 µg L⁻¹, respectively. The detection limit for the orthophosphate ion was 5 to 10-times improved when compared with those of previous studies using molybdenum-yellow or molybdenum-blue as a derivatization with molybdate. The recovery tests using river water for orthophosphate and silicate ions were 97.2% and 102.5%, respectively. The developed method was successfully applied to the simultaneous determination of orthophosphate and silicate ions in practical river-water samples.

Keywords : ion-exclusion chromatography ; malachite green ; molybdate ; orthophosphate ion ; silicate ion.