

## 報 文

電気浸透流を抑制した一時的等速電気泳動/  
キャピラリーゾーン電気泳動法による海水中の  
リン酸イオンの定量岡本 孝明<sup>1</sup>, 福士 恵一<sup>®1</sup>, 横田久里子<sup>2</sup>, 竹田さほり<sup>3</sup>, 脇田 慎一<sup>3</sup>

著者らは、海水中のリン酸イオンを定量するために、オンライン濃縮法として一時的等速電気泳動 (TITP) を利用し、検出法として間接吸光法を用いたキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) を開発した。泳動液 (BGE) 中の間接吸収剤として、2,6-ピリジンジカルボン酸 (PDC) を使用した。また、TITP の効果を有効に利用するために、電気浸透流 (EOF) をできるだけ抑制し、分析目的成分ゾーンの拡散を防ぐ目的で BGE 中にヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を添加した。海水中の低濃度リン酸イオンを高濃度塩化物イオンや硫酸イオンから分離し、高感度に検出するために、種々の分析条件について検討した。その結果、以下のような最適条件を確立した: BGE, 0.01% HPMC を含む 5 mmol/l PDC (1 mol/l 水酸化ナトリウムで pH 3.5 に調整); 検出波長, 200 nm; 試料吸引 (5 in. Hg) 時間, 1 秒 (注入量約 21 nl); ターミナルイオン溶液, 500 mmol/l 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES, 1 mol/l 水酸化ナトリウムで pH 4.0 に調整); ターミナルイオン溶液吸引時間, 30 秒 (約 630 nl); 印加電圧, 15 kV (試料吸引側を陰極)。海水中のリン酸イオンは、約 15 分で検出され、検出限界 (LOD,  $S/N=3$ ) は 32  $\mu\text{g/l}$  ( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ), ピーク面積, ピーク高さ, 泳動時間の相対標準偏差 (RSD, 0.4 mg/l  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ,  $n=8$ ) はそれぞれ 2.1, 2.3, 0.81% であった。本法を表面海水試料中のリン酸イオン分析に応用した。

## 1 緒 言

リンは、水圏における植物プランクトンの繁殖にとって重要な栄養塩の一つであるが、陸上から沿岸海域に過剰に流入するとその海域の富栄養化をもたらす。平成 17 年版環境白書<sup>1)</sup>によると、海域における化学的酸素要求量 (COD) の環境基準達成率は、ここ数年横ばい状態であり、内湾、内海などの閉鎖性海域で達成率が低くなっている。また、赤潮発生確認件数についても減少傾向は見られず、東京湾及び三河湾では青潮の発生も報告されている。このように、日本の沿岸海域では依然として富栄養化が進行中であり、海水中のリン濃度を定量することは、海洋環境保全の観点から重要である。リンは水圏において種々の形態で存在するが、生物活動において最も利用されやすい形態はオルトリン酸イオン (以下単にリン酸イオンと示す) であり、その濃度は大洋表面水では 1  $\mu\text{mol/l}$  以下であるとされている<sup>2)</sup>。

海水中のリン酸イオンは、通常、モリブデン青吸光光度

法<sup>3)</sup>により定量されるが、この原理を採り入れた方法も含めて種々の定量法が開発されている。例えば、オートアナライザー<sup>4)5)</sup>、イオンクロマトグラフィー (IC)<sup>6)~9)</sup>、フローインジェクション分析法 (FIA)<sup>2)10)~12)</sup> 等の各種フロー分析法<sup>13)</sup>、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>14)</sup>、バッチインジェクション分析法 (BIA)<sup>15)</sup> 等である。また、低濃度の場合には溶媒抽出、メンブランフィルター<sup>16)~19)</sup>、水酸化マグネシウム共沈<sup>20)~22)</sup>等を利用したオフライン濃縮法やオンライン濃縮法<sup>11)</sup>、あるいは長いキャピラリーセル検出器<sup>23)</sup>が併用されている。モリブデン青吸光光度法は定量操作も簡単で比較的感度も高いが、ヒ素及びケイ素がリン酸イオンの定量を妨害することが知られている<sup>24)</sup>。また、発色試薬として硫酸等の劇物を使用するなど、その調製が多少厄介である。

一方、キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) は、食品、半導体、環境等様々な分野におけるリンを含む陰イオン分析<sup>25)~28)</sup>に応用されている。CZE は泳動液 (BGE) の調製及び操作も簡単であり、有害な試薬を必要とせず、廃液量も少ないなど環境に優しい分析法であるため環境試料分析に適しており、湖水<sup>29)</sup>、火山由来の熱水<sup>30)</sup>、河川水中のリン酸イオン分析に関して報告されている。しかし、著者らの知る限り、海水中のリン酸イオン分析に応用された例は

<sup>1</sup> 神戸大学海事科学部: 658-0022 兵庫県神戸市東灘区深江南町 5-1-1

<sup>2</sup> 千葉科学大学危機管理学部: 288-0025 千葉県銚子市潮見町 3

<sup>3</sup> 産業技術総合研究所関西センター: 563-8577 大阪府池田市緑丘 1-8-31

見当たらない。この理由として、CZEにおいても他の分析法と同様、海水中に含まれる高濃度塩類が妨害となることが挙げられる。特にリン酸イオンのように紫外及び可視部において吸収を持たない場合には、一般に間接吸光法を用いる必要があり、高濃度塩類による妨害を受けやすい。更に、CZEで一般的な吸光度検出器の場合、キャピラリー内径が光路長となるため、濃度感度が低い。したがって、CZEにより、高濃度塩類を含む海水中の微量リン酸イオンを定量する場合には、塩類の妨害を防ぐとともにリン酸イオンを濃縮しなければならない。著者らは、今までに高濃度塩類の妨害を防ぐために人工海水をBGEとし、オンライン濃縮法として一時的等速電気泳動(TITP)を利用したCZEによる海水中の亜硝酸及び硝酸イオン同時定量法<sup>31)</sup>、ヨウ化物及びヨウ素酸イオン同時定量法<sup>32)</sup>を確立した。これらのTITP/CZEにおいては、分析目的陰イオンの電気泳動の向きと電気浸透流(EOF)の向きを同じにするために、塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)や臭化ジラウリルジメチルアンモニウム(DDAB)を用いてEOFを反転した。しかし、TITPの効果を有効に利用するためには、EOFをできるだけ抑制して、分析目的成分ゾーンの拡散を防ぐことが大切であると考えられる。そこで、本研究では、EOFを抑制するために、BGEに0.01%ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)を添加した。このBGEを用い、TITP/CZEによる海水中のリン酸イオン定量法を確立するために、BGEのpH、検出波長、試料注入量、ターミナルイオン溶液のpHと注入量、印加電圧、試料の塩分の影響について検討し、最適分析条件を確立した。次いで、本法を沿岸表面海水試料中のリン酸イオン分析に応用した。

## 2 実 験

### 2.1 装 置

装置は、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を使用した。pH測定には、堀場製カスターニ- LAB pHメーターF-22を使用した。実海水試料は、ひも付きガラス製試薬瓶を用いてポリプロピレン製試薬瓶に採取した。

2,6-ピリジンジカルボン酸(PDC)のスペクトル分析及びモリブデン青吸光光度法における吸光度測定には、日立U-3000分光光度計を使用した。なお、人工海水の塩分は、YSI製Model 85 SCOOTメーターにより測定した。

### 2.2 試 薬

試薬はすべて特級品を使用した。2,6-ピリジンジカルボ

ン酸(PDC)及び2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)はナカライテスク、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)はAldrichから購入した。BGE及びターミナルイオン溶液のpHは、1 mol/l水酸化ナトリウム(ナカライテスク製)を用いて調整した。リン酸イオン標準溶液は、1000 mg/l ( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ )リン酸二水素カリウム(和光純薬製)溶液を適宜希釈して調製した。また、リン酸イオンを定量する際のヒ素による妨害の有無については、亜ヒ酸ナトリウム[As(III), ナカライテスク製]、ヒ酸ナトリウム[As(V), キシダ化学製]から調製した標準溶液を用いて検討した。溶液調製の際に使用した純水は、ヤマト科学WG220型蒸留水製造装置及び日本ミリポア工業Milli-QII純水製造装置により得られたものである。人工海水はJIS潤滑油-さび止め性能試験方法<sup>33)</sup>に基づいて調製した(25°Cで塩分34)。なお、BGE、標準溶液及び海水試料は使用する前に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。

モリブデン青吸光光度法において用いたアスコルビン酸、七モリブデン酸六アンモニウム四水和物、ビス[(+)-タルトラト]ニアンチモン(III)酸二カリウム三水和物、硫酸及びアミド硫酸アンモニウムはナカライテスクより入手した。

### 2.3 定量操作法

海水試料は以下の操作法により分析した。まず、検出器の波長を200 nm、恒温槽温度を30°Cに設定した。新しいキャピラリーの場合には、1 mol/l水酸化ナトリウムで40分、純水で10分洗浄した。次いで、BGE(0.01% HPMCを含む5 mmol/l PDC, pH 3.5)をキャピラリーに3分充填した。試料を真空吸引法(5 in. Hg)により1秒(約21 nl)注入した後、ターミナルイオン溶液(500 mmol/l MES, pH 4.0)を30秒(約630 nl)注入した。試料注入側を陰極として15 kVの電圧を印加した。後述するように、本法では試料中のリン酸イオン濃度が同一であっても塩分が高い場合には、リン酸イオンのピーク高さは高くなるが、ピーク面積は小さくなる。そこで、試料中のリン酸イオン濃度は、得られたピーク面積を3.7で示す方法により補正した後、検量線を用いて求めた。なお、本法は試料の濾過以外、いかなる前処理も必要としない。

## 3 結果と考察

### 3.1 間接吸収剤とBGEのpH

リン酸イオンは紫外及び可視部において吸収を持たないため、CZEでは一般に間接吸光法を用いる必要がある。間接吸光法において、分析目的イオンは、BGEに添加された吸収を持つイオン(間接吸収剤)と置き換わることにより、間接吸収剤の濃度が減少して負のピークとして検出

される。検出法としては汎用性があるが、短所は感度が低いことである。間接吸光法における感度は、以下の式で表される<sup>34)</sup>。

$$C_{\text{LOD}} = C_p / RD_f = N_{\text{BL}} / R\epsilon l \quad (1)$$

ここで、 $C_{\text{LOD}}$  は検出限界 (濃度に基づく)、 $C_p$  は間接吸収剤の濃度、 $R$  は変換率 (1 mol の分析目的イオンによって置き換えられる間接吸収剤の mol 数)、 $D_f$  はバックグラウンド吸収とノイズとの比、 $N_{\text{BL}}$  はベースラインノイズ、 $\epsilon$  は間接吸収剤のモル吸光係数、 $l$  は検出器の光路長 (キャピラリーの内径) である。分析目的イオンについて左右対称のピーク形状を得るとともに  $R$  を最大にするためには、間接吸収剤の移動度は分析目的イオンの移動度にできるだけ近いことが望ましい。したがって、 $C_{\text{LOD}}$  を低下するためには、 $\epsilon$  が大きく、移動度が分析目的イオンの移動度に近い間接吸収剤を選択することである。

クロム酸は、無機陰イオン分析を目的とした間接吸光法における間接吸収剤として最も一般的に使用されてきた。しかし、クロム酸の移動度はリン酸イオンの移動度より大きいいため、リン酸イオンのピークがテーリングする傾向があり<sup>26)</sup>、また毒性の点で好ましくない。その後、ピロメリト酸<sup>35)</sup>等種々の間接吸収剤が提案されている<sup>25)</sup>。一方、PDC は比較的大きな  $\epsilon$  ( $436801 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 192 nm) を持ち、その酸解離定数 ( $\text{p}K_{\text{a}1} = 2.16$ ,  $\text{p}K_{\text{a}2} = 6.92$ ) はリン酸イオンの酸解離定数 ( $\text{p}K_{\text{a}1} = 2.12$ ,  $\text{p}K_{\text{a}2} = 7.20$ ,  $\text{p}K_{\text{a}3} = 12.36$ ) に近く、移動度もほぼ同様であると推察される。そこで本研究では、間接吸収剤として、リン酸イオンのような中程度の移動度をもつイオン分析に適した PDC を用いることとした<sup>36)</sup>。

本法では、オンライン濃縮法として TITP を利用した。等速電気泳動 (ITP) とは以下のような現象をいう。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) と小さなイオン (ターミナルイオン) との間に試料イオンが存在した状態で電圧を印加する。分析目的イオン濃度がリーディングイオンイオン及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、リーディングイオンとターミナルイオンとの間において、Kohlrausch の式<sup>37)</sup>を満足するまで濃縮され、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 TITP である<sup>38)</sup>。CZE による陰イオン分析においては、一般に、陽イオン界面活性剤などを BGE に添加し、EOF の向きを反転させるが、海水試料の場合、高濃度塩類とリン酸イオンとの分離が困難であった。また、TITP の効果

を有効に利用するためには、EOF をできるだけ抑制して、分析目的成分ゾーンの拡散を防ぐことが大切であると考えられる。そこで、BGE に 0.01% HPMC を添加し EOF を抑制した。更に、EOF の速度は BGE の pH にも依存する。そこで、BGE の pH を 2.3, 3.0, 3.5, 4.0 と変化させ、20 mg/l のリン酸イオンを添加した人工海水試料を印加電圧 10 kV で分析した。その結果、pH 2.3 の場合、リン酸イオンの解離が十分でないため移動度が小さく、ピークは検出されなかった。pH 3.0 以上では、リン酸イオンのピークは検出されたが、pH 3.5 の場合、塩類との分離状態も良く、最も高いピーク高さが得られた。pH 3.5 におけるリン酸イオンのピーク高さは、pH 3.0 の場合の約 1.5 倍であった。これは、pH 3.5 の場合に PDC とリン酸イオンの移動度が最も接近し、式(1)における  $R$  が最大となったためであると推察された。したがって、以下の実験では、pH 3.5 の BGE を用いることとした。

### 3.2 検出波長

分光光度計により PDC の吸収スペクトルを調べたところ、206 nm 及び 273 nm に極大吸収が見られた。また、PDC を間接吸収剤として用いた CZE による無機及び有機陰イオンの同時定量に関する報告<sup>36)</sup>では、192 nm を検出波長としている。そこで、検出波長を 190, 192, 195, 200, 206, 273 nm と変化させ、3.1 と同様の試料を分析した。その結果、リン酸イオンのピーク高さは、200 nm において最も高く、190 nm の約 1.3 倍、192 nm の約 1.1 倍、195 nm の約 1.2 倍、206 nm の約 1.5 倍、273 nm の約 3.1 倍であった。したがって、検出波長は 200 nm とした。なお、波長が 195 nm 以下ではノイズの増大が顕著であった。

### 3.3 試料注入量

試料吸引時間を 1, 2, 3 秒と変化させ、2.0 mg/l のリン酸イオンを添加した人工海水を試料とし、TITP を用いて分析した。なお、試料吸引時間 1 秒は、試料注入量約 21 nl に相当する。この際、試料注入量が変わると最適なターミナルイオン溶液注入量も変化するため、これについても同時に検討した。その結果、試料を 1 秒、ターミナルイオン溶液 (pH 5.0) を 10 秒注入した場合、リン酸イオンのピーク高さは最も高くなった。試料を 2 秒注入すると、ターミナルイオン溶液が 1 秒しか注入できなくなり、ピーク高さは試料 1 秒注入時に比べて低くなった。試料を 1 秒注入した場合のリン酸イオンのピーク高さは、2 秒注入時の約 1.4 倍であった。試料を 3 秒注入すると、塩類とリン酸イオンとをベースライン分離できなかった。したがって、試料吸引時間は 1 秒とした。

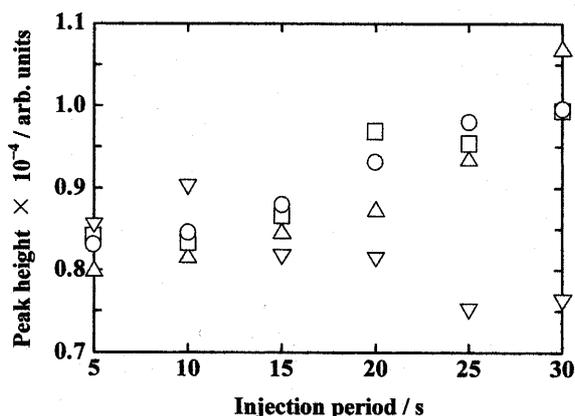


Fig. 1 Effects of pH of terminating ion solution and of its injection period into the capillary on the peak height for phosphate

○ : pH 3.5; △ : pH 4.0; □ : pH 4.5; ▽ : pH 5.0. Electrophoretic conditions: capillary,  $L_{\text{tot}} = 72$  cm,  $L_{\text{det}} = 50$  cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D.  $\times$   $375 \mu\text{m}$  O.D.; BGE, 5 mmol/l 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) containing 0.01% hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) adjusted to pH 3.5 with 1 mol/l sodium hydroxide; voltage, 10 kV with the sample inlet side as the cathode; wavelength for detection, 200 nm; terminating ion solution, 500 mmol/l 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) adjusted to pH 3.5 ~ 5.0 with 1 mol/l sodium hydroxide; vacuum (5 in. Hg) injection period of the terminating ion solution, 5 ~ 30 s (ca. 105 ~ 630 nl). Sample, artificial seawater containing 2.0 mg/l  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ; vacuum injection period, 1 s (ca. 21 nl)

### 3.4 ターミナルイオン溶液の pH と注入量

3.1 で述べたように、TITP によるオンライン濃縮を利用するためには、リーディングイオン及びターミナルイオンがキャピラリー内に存在しなければならない。本法においては、海水試料中に含まれる塩化物イオンがリーディングイオンとして作用するが、適当なターミナルイオンを選択する必要がある。著者らは以前、ターミナルイオンとして、亜硝酸及び硝酸イオンを定量する場合には酢酸イオン<sup>31)</sup>を用い、ヨウ化物及びヨウ素酸イオンを定量する場合にはリン酸イオン<sup>32)</sup>を使用した。BGE が緩衝能を持たない場合、ITP ゾーンの pH は中性に近づくといわれている<sup>30)</sup>。3.1 に示したように、PDC の  $pK_{a1}$  は 2.12 であり、本研究における pH 3.5 の BGE の緩衝能はあまり大きくはないと考えられる。そこで、ターミナルイオン溶液として、中性近傍で移動度が小さい 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES, 500 mmol/l)<sup>40)</sup> を使用することとした。なお、ターミナルイオン溶液として酢酸ナトリウム (600 mmol/l) を用いた場合には、酢酸イオンの移動度と分析目的イオンであるリン酸イオンの移動度とがほぼ等しくなり、ターミナルイオンとして機能しなかった。

ターミナルイオンの移動度は、pH により異なるため、

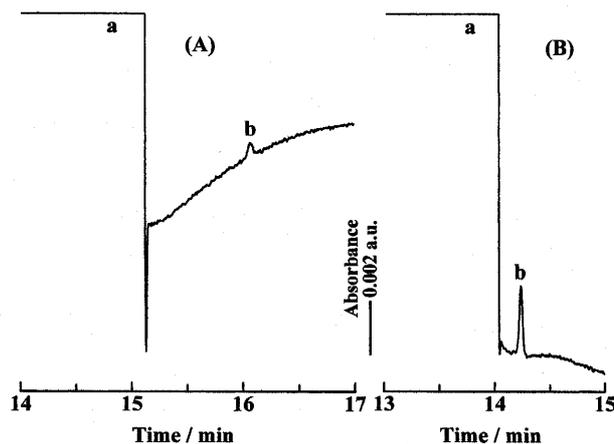


Fig. 2 Concentration effect for phosphate using transient isotachopheresis (TITP)

(A) Without TITP; (B) With TITP; terminating ion solution, 500 mmol/l MES (pH 4.0); vacuum injection period, 30 s (ca. 630 nl). Identification of peaks: a,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$ ; b,  $\text{PO}_4^{3-}$ . Sample, artificial seawater containing 0.4 mg/l  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ; vacuum injection period, 1 s (ca. 21 nl). Other electrophoretic conditions as in Fig. 1 except for 15 kV as the applied voltage.

ターミナルイオン溶液の pH を 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 と変化させ、3.3 と同様に分析を行った。この際、pH が変わると最適なターミナルイオン溶液注入量も変化するため、これについても同時に検討した。Fig. 1 にこれらの結果を示す。リン酸イオンのピーク高さは、pH 5.0 の場合は注入量 10 秒で最も高くなった。pH 4.5 以下では、注入量を増やすほどピーク高さは高くなる傾向があった。ターミナルイオン溶液の pH 4.0, 注入量 30 秒の場合、最も高いピークが得られた。これは、キャピラリー内に存在するターミナルイオン量が多いと、TITP 状態が長く続き、拡散が抑えられたためであると推察される<sup>38)</sup>。Fig. 2 に TITP の濃縮効果を示す。TITP を利用した場合には、利用しなかった場合と比較し、約 4.8 倍のピーク高さが得られた。

### 3.5 印加電圧

分析目的成分ゾーンの拡散を抑えるとともに泳動時間を短縮するためには、印加電圧は高いほうが望ましい。そこで、印加電圧を 10, 15, 20, 25, 30 kV と変化させた。その結果、電圧が高いほどリン酸イオンのピーク高さは高くなったが、15 kV を超えるとベースラインが不安定となった。15 kV の場合、リン酸イオンのピーク高さは 10 kV の場合の約 1.3 倍であり、検出時間は約 2/3 であった。したがって、印加電圧として 15 kV を採用することとした。

### 3.6 検量線

確立された方法により、0 ~ 1.0 mg/l のリン酸イオンを

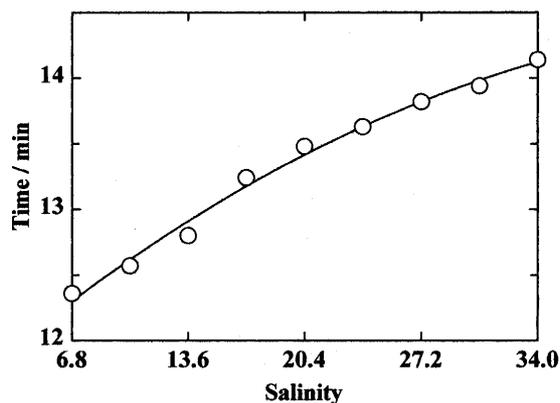


Fig. 3 Effect of salinity of sample solutions on the migration time for phosphate

Electrophoretic conditions and the  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  concentration as in Fig. 2 (B) and Fig. 1, respectively.

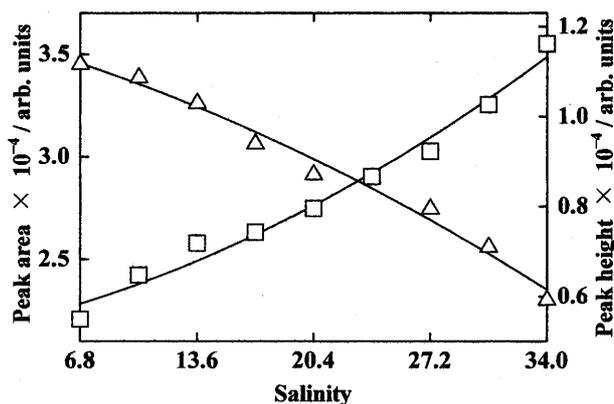


Fig. 4 Effects of salinity of sample solutions on the peak area and peak height for phosphate

$\triangle$ : peak area;  $\square$ : peak height. Electrophoretic conditions and the  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  concentration as in Fig. 2 (B) and Fig. 1, respectively.

添加した人工海水試料 (塩分 34) を用いて検量線を作成した。リン酸イオンのピーク面積, ピーク高さの検量線の回帰式は, それぞれ  $y = 1.10 \times 10^4 x + 25$  ( $y$  はピーク面積,  $x$  はリン酸イオン濃度, 相関係数は 0.9998),  $y = 5.99 \times 10^3 x - 1$  ( $y$  はピーク高さ, 相関係数は 0.9999) であった。また, リン酸イオンの検出限界 (LOD,  $S/N=3$ ) は  $32 \mu\text{g/l}$  ( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ) であった。リン酸イオンの泳動時間, ピーク面積及びピーク高さの相対標準偏差 ( $n=8$ ) は, それぞれ 0.81, 2.1, 2.3% であった (リン酸イオン濃度,  $0.4 \text{ mg/l}$ )。

本法の LOD は, IC の LOD<sup>(6)~(8)</sup> と比較して同程度か低い, それ以外の方法<sup>(2)10)12)14)15)23)</sup> の LOD より高かった。また, IC では塩分の影響を軽減するために, 試料の希釈<sup>(6)</sup>あるいはカラムスイッチング手法<sup>(7)8)</sup>が用いられているが, カラムスイッチング手法の場合には, 試料の塩分が高くなると検量線の傾きが小さくなる傾向がある。また, FIA<sup>(2)</sup>, HPLC<sup>(14)</sup>, BIA<sup>(15)</sup> についても同様の現象が報告されている。3.7 で述べるように, 本法の場合にはこれらとは反対に, 試料の塩分が高くなるとリン酸イオン濃度が同じでもそのピーク高さは高くなる傾向が見られた。

Kaniansky ら<sup>(41)</sup>は, ITP 用のキャピラリーと CZE 用のキャピラリーとをオンラインで接続した ITP/CZE により, 河川水中の主要陰イオンと微量陰イオンを定量した。すなわち, ITP において, 主要陰イオンである塩化物, 硝酸, 硫酸イオンを定量するとともに, 主要陰イオンの除去及び微量陰イオンの濃縮を行い, 濃縮された微量陰イオンを CZE 用キャピラリーに送り, CZE により定量した。リン酸イオンについては, LOD ( $S/N=3$ ) は  $0.2 \mu\text{g/l}$  ( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ , 著者らが換算) と非常に高感度であるが, 試料中に共存する塩化物イオンが  $2000 \text{ mg/l}$ , 硫酸イオンが  $1250 \text{ mg/l}$  以上では妨害となる。海水中の塩化物イオン濃度は約  $20000$

$\text{mg/l}$ , 硫酸イオン濃度は  $2790 \text{ mg/l}$  (著者らが換算) であり<sup>(42)</sup>, この ITP/CZE は海水中のリン酸イオンの定量には適用できない。なお, ITP/CZE では, ITP と CZE をそれぞれ別々のキャピラリーで行うため, 装置が複雑になるが, 本研究の TITP/CZE では, 同一のキャピラリーで行うため, 通常の CE 装置を使用できる。

### 3.7 試料の塩分の影響

本法では, 試料中の塩化物イオンが TITP におけるリーディングイオンに相当するため, 試料の塩分が変わるとリン酸イオンのピーク面積, ピーク高さ, 泳動時間も変化することが予想された。そこで, これを確かめるために,  $2.0 \text{ mg/l}$  のリン酸イオンを含み, 塩分が  $6.8 \sim 34$  の人工海水試料を調製し, 分析した。Fig. 3 に示すように, リン酸イオンの泳動時間は, 試料の塩分にほぼ比例して長くなった。これは, 試料のイオン強度が高い場合, 試料ゾーンの電場の強さが弱くなり, それに比例してリン酸イオンの移動速度が遅くなったためであると思われる。また, Fig. 4 に示すように, 試料の塩分が高くなるに従ってリン酸イオンのピーク高さはほぼ直線的に高くなったが, 逆にピーク面積は減少した。一般に ITP では, ゾーン中の各イオン濃度は, リーディングイオンの濃度と移動度及び分析目的イオンの移動度によって決まる<sup>(37)</sup>。試料の塩分が高いということは, リーディングイオンである塩化物イオン濃度が高く, 後に続くリン酸イオン濃度も高くなったためであると考えられる。

試料中のリン酸イオン濃度は, 試料の塩分がほぼ  $34$  の場合には 3.6 において得られた検量線より求められ, また, 塩分が  $34$  と異なる場合には標準添加法を用いればよい。しかし, 本研究では, 以下のように塩分補正を行い,

Table 1 Analytical results for phosphate in seawater<sup>a)</sup>

Sampling site <sup>b)</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P			MBS <sup>d)</sup> /mg l <sup>-1</sup>
	Added/mg l <sup>-1</sup>	Found/mg l <sup>-1 e)</sup>	Recovery, %	
Port of Amagasaki	0	ND	—	0.001
Nishinomiya harbor	0	0.041	—	0.038
Inside of the KU harbor	0	0.021	—	0.023
Inside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0	0.017	—	—
Inside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0.1	0.120	103	—
Inside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0.2	0.243	113	—
Inside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0.3	0.383	122	—
Outside of the KU harbor	0	ND	—	0.024
Outside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0	ND	—	—
Outside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0.1	0.102	102	—
Outside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0.2	0.211	106	—
Outside of the KU harbor <sup>f)</sup>	0.3	0.333	111	—

a) Electrophoretic conditions as in Fig. 2 (B); b) Sampling date: March 27, 2006; c) Results using corrected peak area and working curve; d) Molybdenum blue spectrophotometry; e) Kobe University; f) 1.1-fold diluted

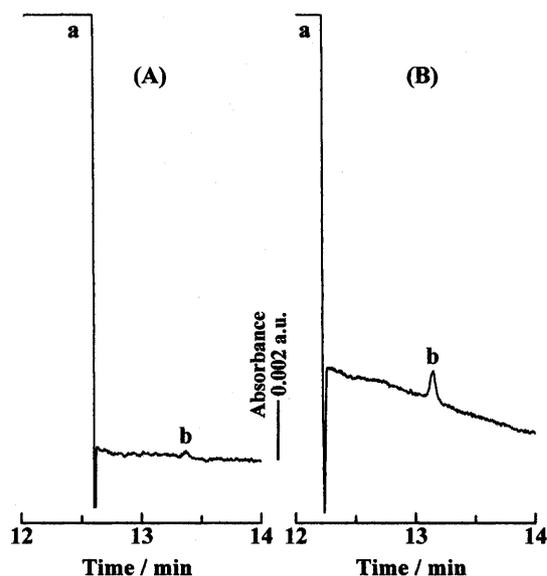


Fig. 5 Electropherograms of surface seawater (A) Sample, non-diluted surface seawater from the inside of the harbor at Kobe University (KU). (B) Sample, the same sample that was diluted 1.1-fold adding 0.2 mg/l PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P. Electrophoretic conditions and identification of peaks as in Fig. 2 (B).

試料中のリン酸イオン濃度を求めることを試みた。すなわち、Fig. 3より、試料の塩分とリン酸イオンの泳動時間との関係を表す次式を得た。

$$t = -1.10 \times 10^{-3} c^2 + 1.12 \times 10^{-1} c + 11.59 \quad (r = 0.9956) \quad (2)$$

ここで、 $t$ はリン酸イオンの泳動時間(分)、 $c$ は試料の塩分である。また、Fig. 4より、試料の塩分とリン酸イオ

ンのピーク面積との関係を表す次式を得た。

$$A = -4.58 c^2 - 2.19 \times 10^2 c + 3.63 \times 10^4 \quad (r = 0.9916) \quad (3)$$

ここで、 $A$ はリン酸イオンのピーク面積である。まず、実際の海水試料を分析して得られたリン酸イオンの泳動時間を式(2)に代入し、試料の塩分を求めた。次に、得られた塩分値を式(3)に代入し、その塩分値に相当するピーク面積を求めた。これは、得られた塩分における2.0 mg/lのリン酸イオンのピーク面積に相当する。更に、式(3)より、塩分34における2.0 mg/lのリン酸イオンのピーク面積を求めた。これら二つのピーク面積値を用いて、海水試料を分析して得られたリン酸イオンのピーク面積値を補正した。その補正値を用い、3・6に示した検量線よりリン酸イオン濃度を求めた。本補正法は、多少煩雑ではあるが、検量線法により試料中のリン酸イオンを求める場合、塩分の影響を補正するの一つの手段であると考えられる。

### 3・8 海水試料の分析

本学沿岸海域より表面海水試料を採取し、本法及びモリブデン青吸光光度法(JIS法)によりリン酸イオンを定量した。また、1.1倍に希釈した海水試料に0.1, 0.2, 0.3 mg/lのリン酸イオンを添加し、回収率を求めた。これらの結果をTable 1に示す。本学構内港の内側で採取した試料及び同じ試料を1.1倍に希釈し、0.2 mg/lのリン酸イオンを添加した試料のエレクトロフェログラムをFig. 5に示す。Fig. 5 (A)に示すように、本学構内港の内側の試料を分析した際には、LOD付近の小さなピークが観察された。回収率が103~122%と多少高めであった原因として、本法のLODが十分に低くないことやリン酸イオン

濃度を求める際, 補正法を用いていることが考えられるが, 今後の検討を要する. また, モリブデン青吸光光度法との正確な比較はできないが, 本法の海水中にリン酸イオン定量法としての有用性が示唆された.

本法におけるヒ素による妨害の有無を調べるために, 0.4 mg/l (As として) のヒ素を添加した人工海水試料 (塩分 34) を調製し, 本法により分析した. その結果, それらに相当するピークは検出されなかった. そこで, 20 mg/l のヒ素を含む人工海水試料を調製し, TITP を利用しないで分析した. その結果, 亜ヒ酸は全く検出されなかった. 亜ヒ酸の酸解離定数 ( $pK_a = 9.22$ )<sup>43)</sup> から, 本法の BGE (pH 3.5) では, 亜ヒ酸イオンとして存在しないためであると推察された. 一方, ヒ酸 ( $pK_{a1} = 2.22$ ,  $pK_{a2} = 6.98$ ,  $pK_{a3} = 11.4$ )<sup>43)</sup> はリン酸イオンとほぼ同じ泳動時間に検出された. ただし, 2.0 mg/l のヒ酸イオンを含む人工海水試料を TITP により分析しても明確なピークとして検出されなかった. 一方, ケイ素は, 天然水中では  $H_4SiO_4$  の形で溶存することが多いが, 酸解離定数 ( $pK_{a1} = 9.70$ ,  $pK_{a2} = 11.70$ ,  $pK_{a3} = 12$ ,  $pK_{a4} = 12$ , 著者らが換算) から考えると, 亜ヒ酸と同様に, 本法の BGE (pH 3.5) では, イオン状のケイ酸として存在することはないものと考えられる<sup>44)</sup>. 以上より, 本法ではリン酸イオンの定量に対して, 亜ヒ酸は妨害せず, ヒ酸は通常の海水中濃度 (2.3  $\mu\text{g/l}$ )<sup>42)</sup> では妨害しないことが分かった. また, ケイ素についても影響されないものと推察された.

#### 4 結 言

本法は, 比較的高濃度のリン酸イオンを含む海水分析に適用できることが分かった. 今後, より長いキャピラリーを用いて試料注入量を増加し, 本法の高感度化について検討する予定である.

#### 文 献

- 環境白書 (平成 17 年版) (2005).
- A. J. Lyddy-Meaney, P. S. Ellis, P. J. Worsfold, E. C. V. Butler, I. D. McKelvie: *Talanta*, **58**, 1043 (2002).
- JIS K 0102, 工場排水試験方法 (1998).
- A. Aminot, R. Kerouel: *Anal. Chim. Acta*, **248**, 277 (1991).
- F. Azzaro, M. Galletta: *Mar. Chem.*, **99**, 191 (2006).
- S. Carrozzino, F. Righini: *J. Chromatogr. A*, **706**, 277 (1995).
- I. Dahllöf, O. Svensson, C. Torstensson: *J. Chromatogr. A*, **771**, 163 (1997).
- P. Bruno, M. Caselli, G. de Gennaro, B. De Tommaso, G. Lastella, S. Mastrolitti: *J. Chromatogr. A*, **1003**, 133 (2003).
- V. Ruiz-Calero, M. T. Galceran: *Talanta*, **66**, 376 (2005).
- I. D. McKelvie, D. M. W. Peat, G. P. Matthews, P. J. Worsfold: *Anal. Chim. Acta*, **351**, 265 (1997).
- S. Motomizu, Z.-H. Li: *Talanta*, **66**, 332 (2005).
- Y. Udnan, I. D. McKelvie, M. R. Grace, J. Jakmune, K. Grudpan: *Talanta*, **66**, 461 (2005).
- J. M. Estela, V. Cerdá: *Talanta*, **66**, 307 (2005).
- J. L. Haberer, J. A. Brandes: *Mar. Chem.*, **82**, 185 (2003).
- J. C. Quintana, L. Idrissi, G. Palleschi, P. Albertano, A. Amine, M. E. Rhazi, D. Moscone: *Talanta*, **63**, 567 (2004).
- K. Hiiro, T. Tanaka, A. Kawahara, M. Adachi, K. Fukushima: *Bunseki Kagaku*, **31**, E401 (1982).
- S. Taguchi, E. Ito-Oka, K. Masuyama, I. Kasahara, K. Goto: *Talanta*, **32**, 391 (1985).
- 田口 茂, 波多宣子, 嶋田 香, 菓子由恵, 小宮山敏夫, 笠原一世, 後藤克己: 水処理技術, **27**, 739 (1986).
- J. Shida, H. Takahashi, Y. Sakamoto: *Talanta*, **41**, 143 (1994).
- 福士恵一, 日色和夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **34**, 21 (1985).
- D. M. Karl, G. Tien: *Limnol. Oceanogr.*, **37**, 105 (1992).
- P. Rimmelin, T. Moutin: *Anal. Chim. Acta*, **548**, 174 (2005).
- F. I. Ormaza-González, P. J. Statham: *Anal. Chim. Acta*, **244**, 63 (1991).
- P. J. Worsfold, L. J. Gimbert, U. Mankasingh, O. N. Omaka, G. Hanrahan, P. C. F. C. Gardolinski, P. M. Haygarth, B. L. Turner, M. J. Keith-Roach, I. D. McKelvie: *Talanta*, **66**, 273 (2005).
- P. Doble, P. R. Haddad: *J. Chromatogr. A*, **834**, 189 (1999).
- T. Wang, S. F. Y. Li: *J. Chromatogr. A*, **834**, 233 (1999).
- B. Paull, M. King: *Electrophoresis*, **24**, 1892 (2003).
- S. Y. Chang, W.-L. Tseng, S. Mallipattu, H.-T. Chang: *Talanta*, **66**, 411 (2005).
- M. Pantisar-Kallio, P. K. G. Manninen: *Chemosphere*, **31**, 3699 (1995).
- E. Santoyo, R. García, R. Abella, A. Aparicio, S. P. Verma: *J. Chromatogr. A*, **920**, 325 (2001).
- K. Fukushima, Y. Nakayama, J. Tsujimoto: *J. Chromatogr. A*, **1005**, 197 (2003).
- K. Yokota, K. Fukushima, S. Takeda, S. Wakida: *J. Chromatogr. A*, **1035**, 145 (2004).
- JIS K 2510, 潤滑油一さび止め性能試験方法 (1998).
- C. Johns, M. Macka, P. R. Haddad: *Electrophoresis*, **24**, 2150 (2003).
- T. Ehmman, L. Fabry, H. Rüfer, L. Kotz, S. Pahlke, C. Mantler: *J. Chromatogr. A*, **995**, 217 (2003).
- T. Soga, G. A. Ross: *J. Chromatogr. A*, **767**, 223 (1997).
- 宮崎 浩, 加藤和夫: “等速電気泳動法”, p. 6 (1980), (講談社).
- 福士恵一, 竹田さほり: *ぶんせき (Bunseki)*, **2006**, 52.
- 廣川 健, 岡本 光, 徐 中其, 育田夏樹: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 1069 (2003).
- T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, A. R. Timerbaev: *Electrophoresis*, **24**, 2328 (2003).
- D. Kaniansky, I. Zelenský, A. Hybenová, F. I. Onuska: *Anal. Chem.*, **66**, 4258 (1994).
- 角皆静男, 乗木新一郎: “海洋化学—化学で海を解く”, 西村雅吉編, p. 53 (1986), (産業図書).
- 藤永太一郎, 関戸栄一: “イオン平衡—分析化学

における一”, p. 248 (1984), (化学同人); H. Freiser, Q. Fernando: “*Ionic Equilibria in Analytical Chemistry*”, (1963), (John Wiley and Sons Inc., New York).

44) 三宅泰雄, 北野 康: “新水質化学分析法”, p. 172 (1985), (地人書館).

## Determination of Phosphate in Seawater by Transient Isotachopheresis/Capillary Zone Electrophoresis with Suppressed Electroosmotic Flow

Takaaki OKAMOTO<sup>1</sup>, Keiichi FUKUSHI<sup>1</sup>, Kuriko YOKOTA<sup>2</sup>, Sahori TAKEDA<sup>3</sup> and Shin-ichi WAKIDA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Maritime Sciences, Kobe University, 5-1-1, Fukaeminami-machi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658-0022

<sup>2</sup> Faculty of Crisis Management, Chiba Institute of Science, 3, Shiomi-cho, Choshi-shi, Chiba 288-0025

<sup>3</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Kansai, 1, Midorigaoka, Ikeda-shi, Osaka 563-8577

(Received 14 April 2006, Accepted 19 July 2006)

We developed capillary zone electrophoresis (CZE) with indirect UV detection for the determination of phosphate in seawater using transient isotachopheresis (TITP) as an on-line concentration procedure. As a high-UV-absorbing compound in a background electrolyte (BGE), 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) was used. Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was added to the BGE to suppress electroosmotic flow (EOF) and the dispersion of an analyte zone for the purpose of maximizing the concentration effect by TITP. Several analytical conditions were examined to separate low concentrations of phosphate from high concentrations of chloride and sulfate in seawater and to detect phosphate with high sensitivity. The following optimum conditions were established: BGE, 5 mmol/l PDC containing 0.01% HPMC adjusted to pH 3.5 with 1 mol/l sodium hydroxide; wavelength for detection, 200 nm; vacuum (5 in. Hg) injection period of sample, 1 s (*ca.* 21 nl); terminating ion solution, 500 mmol/l 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) adjusted to pH 4.0 with 1 mol/l sodium hydroxide; vacuum injection period of the terminating ion solution, 30 s (*ca.* 630 nl); applied voltage, 15 kV with the sample inlet side as the cathode. Phosphate in seawater samples was detected for approximately 15 min. The limit of detection (LOD) for phosphate was 32  $\mu\text{g/l}$  ( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ) at a signal-to-noise ratio of three. The respective values of the relative standard deviation (RSD) of the peak area, peak height, and migration time for phosphate were 2.1, 2.3, and 0.81%. The proposed method determined phosphate in surface seawater samples.

**Keywords** : seawater analysis; phosphate; capillary zone electrophoresis; transient isotachopheresis; indirect detection.