

---

## 報 告

---

### 栄養塩分析の高精度化

宮尾 孝\*・藤原 弘行\*・川村 知裕\*・北川 隆洋\*・永井 直樹\*\*

#### 要 旨

地球温暖化のような全球規模の問題について海洋が果たす役割を見極めるためには国際的な観測データ交換が不可欠であり、その際には比較可能性と追跡可能性を備えた高精度のデータが求められる。気象庁の栄養塩データの品質は、一定の評価を得ていたものの、繰り返し精度や正確さが必ずしも明確ではなかった。気象庁海洋気象課では、栄養塩分析を高精度化するため、観測機器、試薬、標準物質等を周到に準備し、サンプリングから分析に至る全ての段階における誤差要因を洗い出して対策を講じるとともに、統計的手法によるデータ品質管理を実施して、分析データの不確かさを評価している。

#### 1. はじめに

海水中に存在する窒素、リン、ケイ素は生物にとって必須の元素であり、それらの無機塩類（硝酸、亜硝酸、アンモニウム、リン酸、ケイ酸のイオン）を総称して栄養塩と呼ぶ。栄養塩は、植物プランクトンや藻類の成長・増殖を支配する因子となっており、その存在量や供給量は植物プランクトン、これを餌とする動物プランクトン、更にこれを捕食する魚類等の生産量を左右する。そのため、栄養塩は古くから海洋調査において重要な観測対象とされてきた。

海洋における栄養塩の濃度は海域、季節、深度などによって大きく異なる。一般に河川水は豊富な栄養塩を供給するので、沿岸域は外洋域表層よりも栄養塩濃度が高い。亜硝酸塩やアンモニアは、表層の特定深度に濃度極大をもつことが多いが、海洋は全般に酸化的環境にあるため、無機態の窒

素化合物の大半は硝酸塩として存在する。また、植物プランクトンが増殖する季節には、外洋域表層の栄養塩はしばしばほとんど枯渇した状態になる。一方、生物体の死骸や排泄物は酸化分解されつつ沈降するため、硝酸塩、リン酸塩、ケイ酸塩は深度とともに濃度を増す。

こうした生化学的な過程における酸素と栄養塩との当量関係を用いれば、海洋における生物活動の状況を定量的に扱うことができ、人為的起源の二酸化炭素吸収量の評価にも役立てることができる。また、栄養塩濃度の分布から中・深層における海水の流動を追跡することもできる。したがって、地球温暖化や気候変動についての議論を進めるうえでも、栄養塩の分析精度の向上が求められるといえる。

気象庁は、平成 22 年度以降、地球温暖化の観測・監視体制を強化し、北西太平洋における高精度の

---

\* 地球環境・海洋部海洋気象課 \*\* 長崎海洋気象台（現 沖縄気象台）

海洋観測に取り組んでいる。気象庁の観測データの品質は、外部から一定の評価が得られているものの、繰り返し精度や正確さが必ずしも明確ではなかった。また、地球温暖化への取組においては国際的なデータ交換が不可欠であり、比較可能性 (comparability) と追跡可能性 (traceability) を備えていなくてはならない。観測データの品質をこのような要求に応える水準に維持するためには、観測に用いる機器はもとより、試薬、標準物質等についても周到な準備が求められる。また、それらを注意深く監視して良好な状態を保つことも必要である。こうした観点から、平成 21 年度海洋気象技術検討会に向けて「溶存酸素・栄養塩測定の高精度化に向けた検討」が取り上げられ、気象庁海洋気象課と海洋気象台が連携して、様々な実験を行うとともに、分析手法に関する知見の整理・共有を図った。その後もデータの正確さと不確かさを評価するため、観測船上での実験や統計的手法の改善などの努力が続けられている。

本稿では、現行の栄養塩分析の手法と高精度化に向けた試みの一部を紹介する。

## 2. 栄養塩類の測定原理と実際の分析手法

### 2.1 分析操作の自動化

栄養塩の分析では、試料水に試薬を添加して分析対象の栄養塩と反応させ、色のある物質を作る手法が用いられる。色の付いた溶液は特定の波長帯の光を吸収しており、希薄溶液においては呈色した物質の濃度と吸光度は比例する (Lambert-Beer の法則)。したがって、既知濃度の栄養塩標準溶液を用意しておき、試料水と同じ操作を施して比色・定量すれば、容易に吸光度から試料水の栄養塩濃度を計算できる。

1970 年頃までの船上における栄養塩分析では、分析担当者が手作業で試料水に試薬を添加し、反応終了後に分光光度計でひとつひとつ比色・定量するのが普通であった。しかし、1960 年前後に「連続流れ分析 (CFA; Continuous Flow Analysis)」を自動的に実行するシステムが開発され、急速に海水の栄養塩分析にも応用されるようになっていった。自動化された CFA の概念を第 1 図に示す。システム全体の構成及び各部の役割については宮

尾 (1989) が詳しく紹介している。

CFA の最大の特長は、液流を気泡で分節することにより、試薬と試料水との混合を促進し、均質化させて反応を速める点にある。また、分析条件も一定に保たれるので、分析者の技量による個人差が生じにくい。反応終了を待つことなく比色・定量することができる。更に、反応系と比色計を増設することで容易に多成分同時分析が可能となる。気象庁においても 1970 年代に自動化学分析装置が導入され、主として亜硝酸塩、硝酸塩、リン酸塩及びケイ酸塩の分析に用いられてきた。自動化された手法は Armstrong *et al.* (1967)、Grasshoff *et al.* (1983) などに紹介されているが、分析を行う実験室の環境や観測対象海域における栄養塩濃度などに応じて適宜アレンジされる。

### 2.2 栄養塩類の分析に用いられる化学反応

現在、気象庁で分析対象としている栄養塩は、亜硝酸塩、硝酸塩、リン酸塩及びケイ酸塩の 4 種類である。以下、それぞれの分析原理になっている化学反応について述べる。

#### (1) 亜硝酸塩 (Nitrite; $\text{NO}_2^-$ )

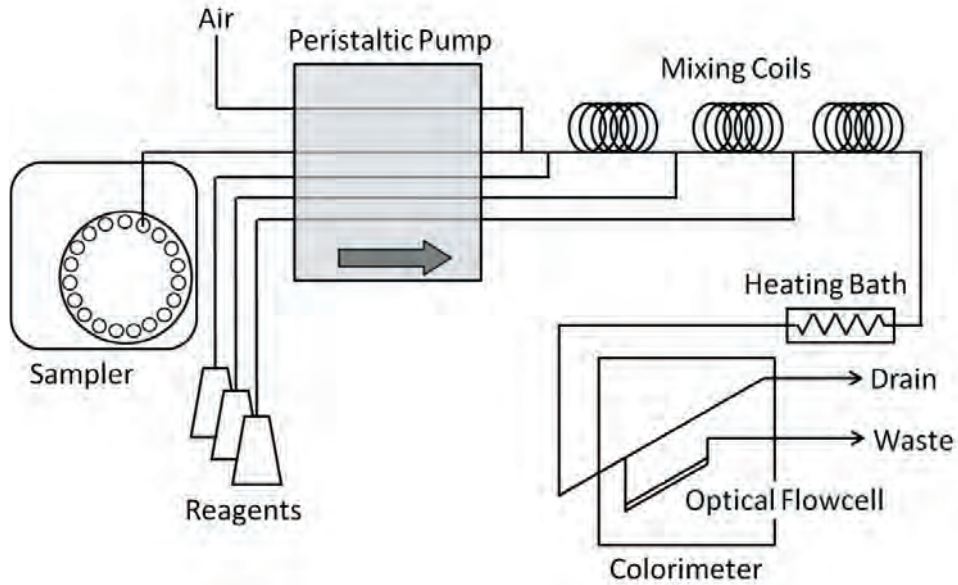
亜硝酸塩の分析法は Bendschneider and Robinson (1952) にもとづいている。

亜硝酸塩は酸性条件下でスルファニルアミドとジアゾ化反応を起こし、更に N-1 ナフチルエチレンジアミン・2 塩酸塩とカップリング反応して、赤色を呈するアゾ色素を形成する (第 2 図)。この色素は 543nm 付近に吸収ピークをもつ。

この反応は 19 世紀に既に知られていた亜硝酸塩の特性反応である。非常に鋭敏な反応であるうえ、共存塩類の影響を受けにくい特長がある。

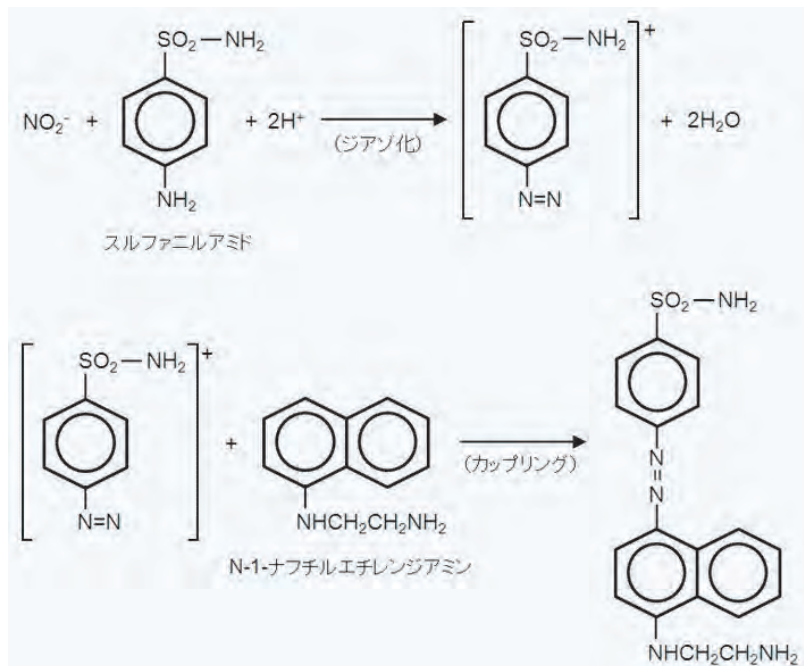
#### (2) 硝酸塩 (Nitrate; $\text{NO}_3^-$ )

亜硝酸塩の分析法は高感度であるため、硝酸塩を何らかの手段で還元し、亜硝酸塩として分析する方法が古くから試みられていた。中でも Wood *et al.* (1967) のカドミウム・銅 (Cd-Cu) カラムを用いた還元法は、還元率の安定性にすぐれていることから広く採用されている。また、カラム内の pH 変動を抑え、カラムの寿命を延ばすために



第 1 図 自動化された連続流れ分析の概念図

- Sampler: 可動式アームで試料水と人工海水を交互に吸入させるサンプラー
- Peristaltic Pump: チューブをしごいて液流を一定流量で送り出す秤量ポンプ
- Air: 流れを気泡で分節するための空気
- Reagents: 発色させるための反応試薬
- Mixing Coils: 流れを繰り返し反転させて混合を促進するコイル
- Heating Bath: 液流を反応に適した温度に保つ恒温槽
- Colorimeter: 特定波長における吸光度を測定する比色計
- Optical Flowcell: 液流が通過する光学セル
- Drain: 比色計の光学セルからのオーバーフロー（気泡が抜ける）
- Waste: 吸光度測定後に排出される液流



第 2 図 亜硝酸塩と発色試薬との反応

上段：酸性下でスルファニルアミドとのジアゾ化反応

下段：N-1-ナフチルエチレンジアミンとのカップリング反応

塩化アンモニウムの緩衝溶液を用いる (Armstrong *et al.*, 1967).

なお、この手法で測定されるものは硝酸塩と亜硝酸塩の和 ( $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ ) であるが、気象庁ではこれを「硝酸塩」濃度として報告している。

### (3) リン酸塩 (Phosphate; $\text{PO}_4$ )

リン酸塩の分析法は、Murphy and Riley (1962) が示した手法にもとづいている。

重合度の低いリン酸塩 (反応性リン酸塩と呼ばれる) は、硫酸酸性下でモリブデン酸塩と反応してリンモリブデン酸の錯体を形成する。この錯体をアスコルビン酸で還元すると青く呈色する (モリブデンプルー)。このモリブデンプルーは 882nm 付近に吸収ピークをもつ。また、試薬中に少量のアンチモン (Sb; ラテン語で *Stibium*, 英語は *Antimony*) を添加することによって反応を速めている。

ヒ素 (As; *Arsenic*) が作る 5 価のヒ酸塩もリン酸塩と同じ反応を起こすが、海水中のヒ酸塩濃度はリン酸塩の 1% に満たないのでほとんど無視できる。また、ケイ酸塩も類似した反応を起こして妨害要因となるが、反応速度の pH 依存性を利用して妨害を抑制する。

### (4) ケイ酸塩 (Silicate; Si)

ケイ酸塩の分析法は Mullin and Riley (1955) にもとづく。

海水中に比較的単純な化学形で存在するケイ酸塩 (可溶性、あるいは反応性ケイ酸塩という) は、硫酸酸性下でモリブデン酸塩と反応して黄色を呈するケイモリブデン酸の錯体を形成する。これを還元すると、810nm 付近を吸収ピークとする強い青色を呈する (モリブデンプルー)。還元剤としては、Grasshoff *et al.* (1983) に準拠してアスコルビン酸を採用している。

基本的にリン酸塩と類似の反応を利用しているが、還元剤を加える前にシュウ酸を添加してリン酸塩の反応生成物を分解するので、リン酸塩による妨害は無視できる。

## 2.3 気象庁の観測船における自動化分析手法

気象庁の観測船に搭載されている自動化学分析装置の設定概念図を第 3 図に示す。現行のリン酸塩及びケイ酸塩の分析法は反応速度に温度依存性があるので、反応系に 37°C のヒーティングバスを組み込んで、室温変動の影響を抑えている。また、硝酸塩の分析系については、四方コックを用いて Cd-Cu カラムの着脱を容易にしている。比色計のフローセル長と干渉フィルタ (測定波長) の設定は第 1 表のとおりである。

なお、分析に用いる試薬類の調製法等は、気象庁 (1999) にしたがっている。

## 3. 標準試料溶液と栄養塩類参照物質

### 3.1 標準試料溶液

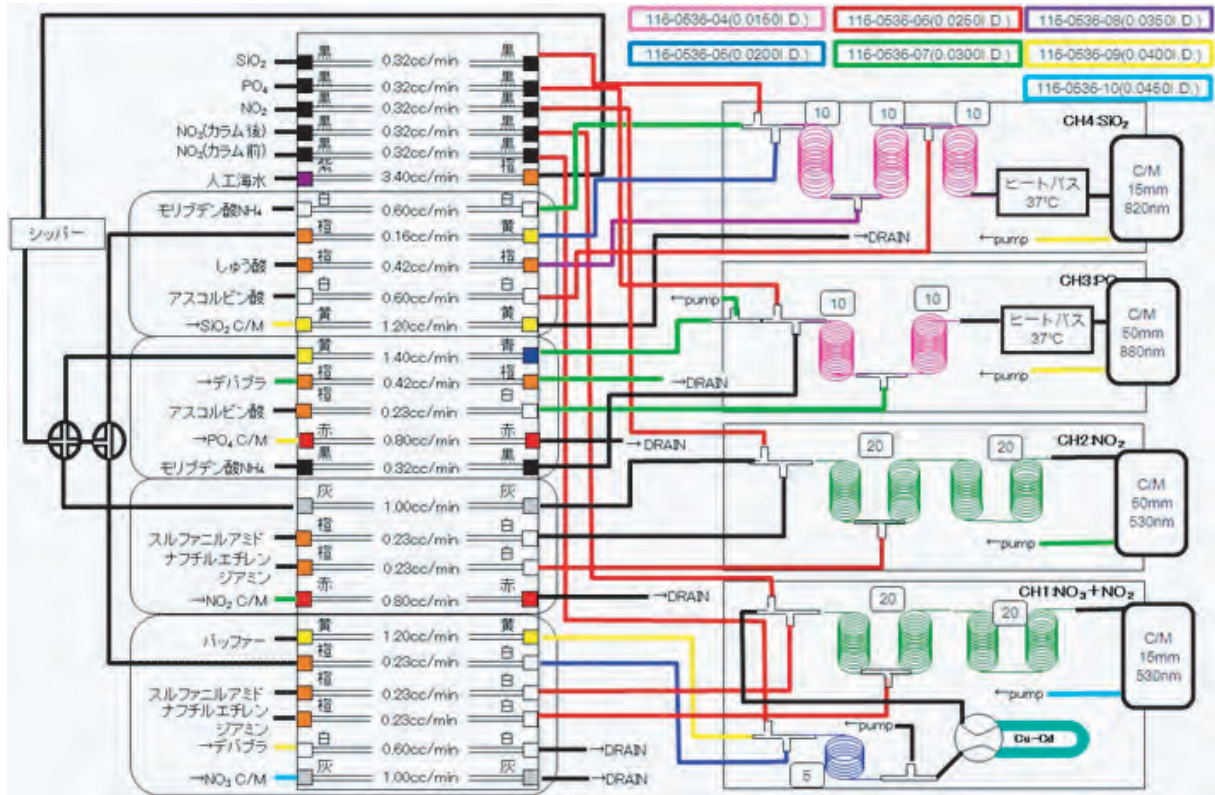
標準試料溶液 (スタンダード) は、陸上の実験室で脱イオン水 (DIW) を用いて調製する長期保存用の A スタンダード、観測船上で A スタンダードから DIW を用いて調製する B スタンダード (亜硝酸塩単独のものとして硝酸塩・リン酸塩・ケイ酸塩を混合したものとを用意)、濾過海水を用いて調製するワーキングスタンダードの 3 段階で管理している。ワーキングスタンダードは分析のたびに B スタンダードから調製するもので、正確な濃度計算の基礎となる。B スタンダードは航海中必要が生じるたびに A スタンダードから調製する。A スタンダードはおおむね 6 か月ごとに調製するもので、これを用いて航海間のクロスチェックを実施し、気象庁内部での比較可能性及び追跡可能性を担保している。

なお、スタンダード調整及び管理の詳細は、気象庁 (1999) に記載されている。

第 1 表 各成分の比色計のフローセル長と干渉フィルタの設定

成分名	フローセル長	干渉フィルタ (測定波長)
亜硝酸塩	50mm	530nm
硝酸塩	15mm	530nm
リン酸塩	50mm	880nm
ケイ酸塩	15mm	820nm





第3図 気象庁の観測船における自動化学分析装置の設定概念図  
秤量ポンプにセットするチューブ（流量率とマーカーの色）を詳細に示す。

### 3.2 栄養塩類参照物質

気象研究所地球化学研究部は、栄養塩データの世界的な比較可能性を確立する目的で栄養塩参照物質（RMNS; Reference Material for Nutrients in Seawater）の開発・普及に取り組んでいる。RMNSは硝酸塩、リン酸塩及びケイ酸塩を含み、バッチサイズが大きいうえ長期にわたって安定しているため、分析所内及び分析所間の比較に有用である（Ota *et al.*, 2010）。気象庁海洋気象課は、RMNSの国際比較実験に初期から参加しており、現在は観測船上での分析時にRMNSを試料と同時に測定している。こうしたことによって、データの国際的な比較可能性と追跡可能性を担保している。

## 4. 栄養塩類分析の誤差要因とその対策

### 4.1 純水、試薬及び容量器具

分析に用いる純水の品質は、誤差をもたらす決定的要因となり得る。観測船上ではDIWを使用

している。純水製造装置の稼働状況を定期的に点検し、DIWの電気伝導度が $0.1\mu\text{S}/\text{cm}$ を下回ることを確認する。

分析に用いる試薬はできるだけ高純度のものを選んでいく。特に、標準物質となるものについては、継続的に入手可能であることも重視している。また、試薬類はすべて製造元とロットナンバーを控えており、調製・使用した日時も記録して、不良バッチを追跡できる状態を実現している。

ガラス製の器具からはケイ酸が溶出するので、ケイ酸塩の分析に影響する箇所には使用しない。また、容量器具（メスフラスコ、ピペッター等）は公称公差を確認し、すべてDIWを用いた重量測定によって校正する。重量測定に際しては、気圧、気温、水温も測定して水の密度や浮力の補正を行う。

### 4.2 サンプリング

採水器や試料容器に微生物が棲みついて栄養塩を摂取・生成することを避けるため、頻りに洗浄

して清浄な状態に保つ。一度使用した試料容器は、希塩酸に1時間以上浸漬し、DIWでよくすすいでから乾燥させて次の使用に備える。

採水器から試料水を分取する際には、異物の混入を避けるために細心の注意を払う。Hydes *et al.* (2010) が述べているように、採水チューブの端や試料容器の縁に手を触れてはいけない。人間の指紋は測定可能な量のリン酸塩を含んでおり、手洗いに使用する石けんもリン酸塩のありふれた混入源である（使い捨て手袋の使用が推奨されている）。ロゼットアレーや採水器からしたたり落ちる水滴なども混入させないように留意する。たばこや調理場からの煙も、観測船上では有力な汚染源となり得る。

また、試料水を冷蔵庫で保存していても、長時間保存すると栄養塩濃度が変化するので、可能な限り採水直後に分析する。冷蔵庫の温度に保たれた試料水は、深海の微生物が通常活動する環境とよく似た条件になっている。

#### 4.3 共存塩による妨害

海水を分析する際には、呈色反応に対する共存塩類の影響がしばしば問題となる。分析に用いるワーキングスタンダードにも試料海水と同じ塩類が含まれていると、共存塩類の妨害をキャンセルできるので好都合である。海水の塩組成は複雑なので、ワーキングスタンダードの調製には人工海水等ではなく濾過海水を用いている。これは植物プランクトンの増殖が終わって、栄養塩がほとんど枯渇している、夏季の外洋表面水を濾過して数か月保管したものである。

#### 4.4 吸光度の補正

まず、分析の最初と最後の人工海水の吸光値を比較し、その差を経過時間で内挿することにより、システムの電氣的あるいは光学的なゼロオフセットのドリフト分を補正する（ベースライン補正）。また、CFAでは試料と試料の間を区切るためにも人工海水を吸入させるが、それでも前の試料がわずかに残留することにより誤差が生じる。これはキャリアオーバーと呼ばれており、ある試料とその前の試料の濃度差（ひいては吸光度の差）に

依存するとみなして補正することができる（気象庁, 1999）。

また、試薬自体に含まれる不純物や人工海水に含まれる栄養塩による発色も誤差要因となるので、不純物を含まないDIWを分析の初めと終わりに測定し、試薬ブランクを求めて補正する。しかし、DIWと海水試料では光の屈折率が異なる。手作業による比色分析では数mmの幅の光学セルを使用するが、CFAのフローセルの内径は1.5mm程度であり、フローセルを通過する光の屈折によるみかけの吸収が無視できない。このため、呈色反応を起こす試薬を抜いて、発色しない状態でDIWと海水試料の吸光度を比較し、屈折エラーを求めて補正する。

なお、硝酸塩やケイ酸塩の分析で特に顕著なことだが、高濃度域ではLambert-Beerの法則が厳密には成り立たないことが以前から経験的に知られていた。これは呈色が強すぎて吸光度が頭打ちになることによるもので、試料を希釈するか、吸収ピークからずれた波長で測定するなどの対策が考えられる。また、Hydes *et al.* (2010) は硝酸塩の分析において検量線の選択によってフルスケール40 $\mu\text{mol/kg}$ に対し、最大0.6 $\mu\text{mol/kg}$ の分析所間差が生じた例を示している。こうした場合、検量線（濃度と吸光度の関係式）を2次曲線にすることによっても、誤差を最小限に抑えることができる。船上ではワーキングスタンダードの0, 1/4, 2/4, 3/4及びフルスケールの濃度をもつ液列を用いて2次の検量線を作成している。

#### 5. 統計的手法によるデータ品質管理

取得したデータの不確かさや再現性は、統計的手法によって評価できる。この目的を実現するため、スタンダードやRMNSを活用すると同時に、必要に応じて試料を重複させて採取し、各種の管理図を作成している。管理図のプロットに一定の変化傾向やギャップなどの異常が現れた場合は、分析装置、標準液、器具類のコンタミ等の問題が発生していないか、分析システム全体にわたるチェックを実施する。



### 5.1 チェックスタンダード及びRMNS

試料水の列に数本のチェックスタンダード（ワーキングスタンダードと同じもの）を挿入し、その濃度をチェックすると同時に、分析システム全体の状況監視に役立っている。例として、凌風丸 10-05 次 (WHP-P9 revisit) 航海において作成したチェックスタンダードの変動係数 (%CV : チェックスタンダード濃度の平均値に対する標準偏差の大きさ) の管理図を第 4 図に示す。変動係数は観測全体をつうじてほぼ 0.2% 以下であった。また、RMNS 分析値についても平均濃度と標準偏差を求めるなど、同様の管理を実施している (第 5 図)。同一バッチの RMNS 分析値が  $36.8 \pm 0.2 \mu\text{mol/kg}$  に収まっていた。これらのことから、分析システムは良好な状態であったと判断された。

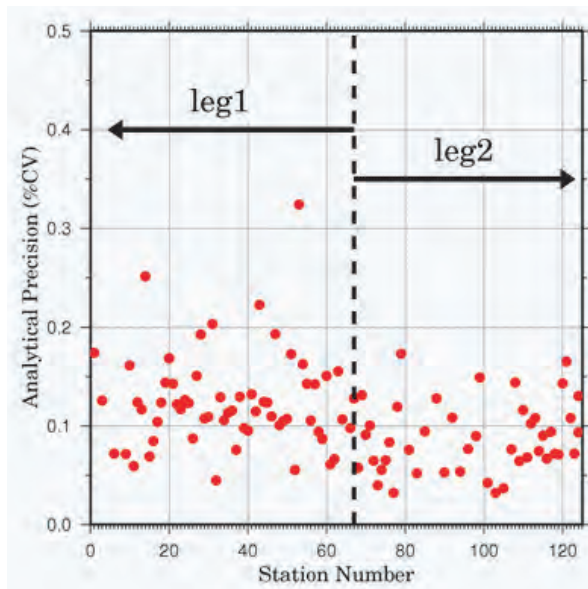
### 5.2 replicate 及び duplicate 試料の分析

ひとつの採水器から取り分けた複数の試料を“replicate sample (複製試料)”，また、同一層で複数の採水器を閉じて採取した試料を“duplicate sample (重複試料)”と呼ぶ。replicate 及び duplicate 試料からは本来同じ分析値が得られるは

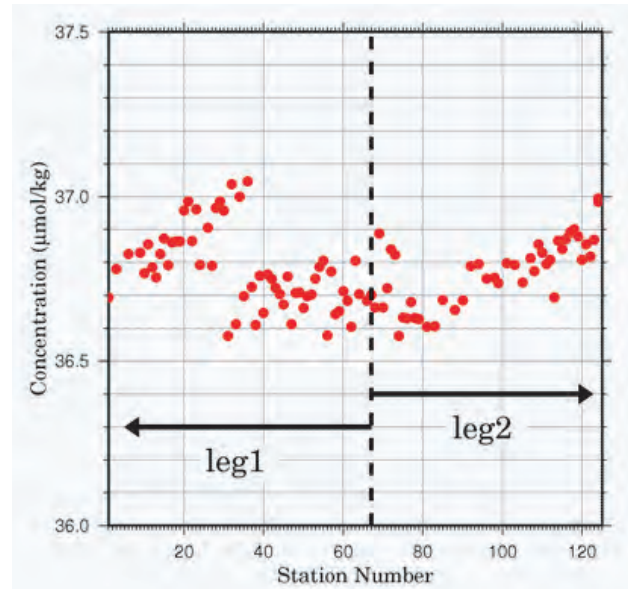
ずであるが、通常多少の差が生じる。これは、採水器から試料を分取する人やタイミング、分析されるまでの経過時間やその間の環境変化など、試料ごとの条件が全く同じではないことに起因すると考えられる。そこで replicate 及び duplicate 試料の分析値についても管理図を作成して、データ品質管理に役立っている。上述の航海において作成したものを第 6 図及び第 7 図に掲げる。6 割以上の replicate 及び duplicate 試料の組が硝酸塩濃度差  $0.04 \mu\text{mol/kg}$  の範囲に収まっており、特段の異常はないと判断された。

### 6. まとめ

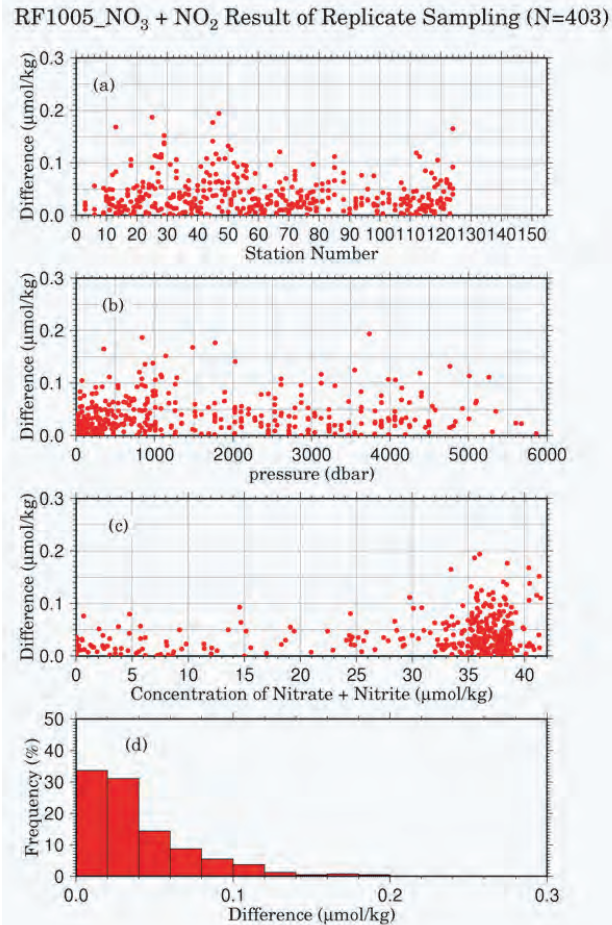
栄養塩のデータ品質を高めて比較可能性と追跡可能性を備えたものとするため、分析装置、器具類、試薬、標準物質等の準備・管理を適切に行い、データを得るまでの全ての段階における誤差要因を洗い出して対策を講じるとともに、統計的手法によるデータの品質管理を実施している。これらの取組により、従来明確にできなかった分析データの不確かさの評価が可能になった。航海ごとに作成された品質管理図表等から、Aoyama *et al.* (2008) が見積った自動化学分析装置を用いた



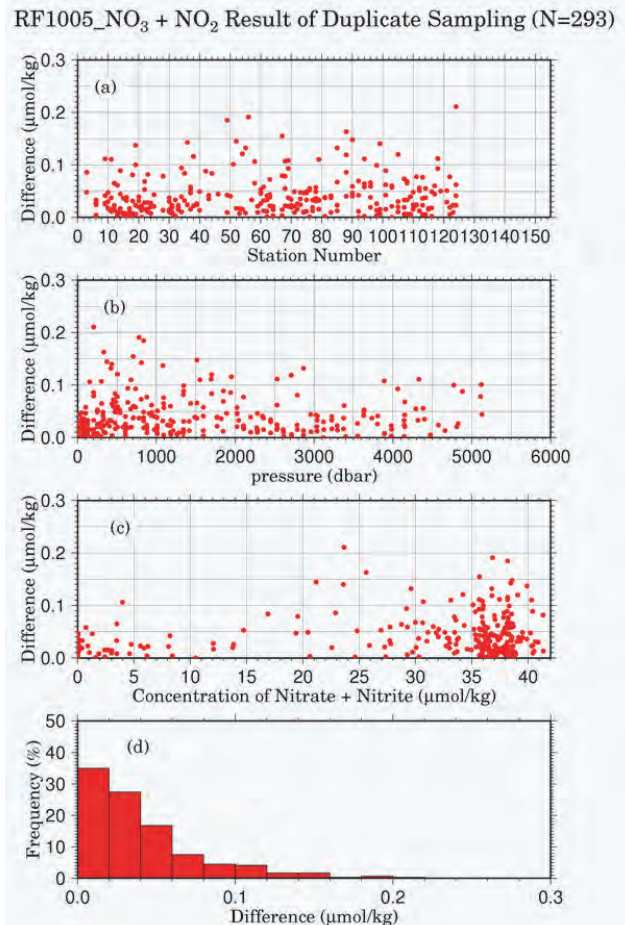
第 4 図 凌風丸 10-05 次 (WHP-P9 revisit) 航海 (2 航程) において作成したチェックスタンダードの硝酸塩濃度の変動係数 (%CV) 管理図  
縦軸は変動係数、横軸は通算の観測点番号。



第 5 図 栄養塩類参照物質の硝酸塩分析値の管理図  
縦軸は参照物質の硝酸塩分析値、横軸は通算の観測点番号。第 4 図と同じ航海について作成したもの。



第 6 図 replicate 試料の硝酸塩分析値の管理図  
 (a) 通算の観測点番号, (b) 採水深度 (圧力で表示),  
 (c) 硝酸塩濃度のそれぞれに対する replicate 試料の濃度  
 差と (d) 濃度差出現頻度のヒストグラム. 第 4 図と同じ航海について作成したもの.



第 7 図 duplicate 試料の硝酸塩分析値の管理図  
 duplicate 試料について第 6 図と同様に作成したもの.

栄養塩分析の精度 (0.2 ~ 0.4%) は確保されていると判断している.

謝辞

査読者からいただいた多くの有益なコメントと, 筆者らとの議論に加わって分析手法への理解を深めてくれた海洋気象課化学・分析班の職員に感謝します.

参 考 文 献

Armstrong, F. A. J., C. R. Sterns and J. D. H. Strickland (1967): The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon Autoanalyzer and associated equipment. Deep-Sea

Research, 14, 381-389.  
 Bendschneider, K. and R. J. Robinson (1952): A new spectrophotometric determination of nitrite in sea water. J. Mar. Res., 11, 87-96.  
 Grasshoff, K., M. Ehrhardt and K. Kremling (1983): Methods of Seawater Analysis, 2nd ref. ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 419pp.  
 Hydes, D. J., M. Aoyama, A. Aminot, K. Bakker, S. Becker, S. Coverly, A. Daniel, A. G. Dickson, O. Grosso, R. Kerouel, J. van Ooijen, K. Sato, T. Tanhua, E. M. S. Woodward and J. Z. Zhang (2010): Determination of Dissolved Nutrients (N, P, Si) in Seawater with High Precision and Inter-Comparability using Gas-Segmented Continuous Flow Analysers. The GO-SHIP Repeat Hy-



- drography Manual: A Collection of Expert Reports and Guidelines, IOCPP Report No.14, ICPO Publication Series No. 134, Version 1, 2010.
- 気象庁 (1999) : 栄養塩. 海洋観測指針 [※追録 3号 (2010)], 63-98.
- 宮尾 孝 (1989) : 自動化学分析装置による海水中の栄養塩分析法. 測候時報, 56, 115-121.
- Mullin, J. B. and J. P. Riley (1955): The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 12, 162-176.
- Murphy, J. and J. P. Riley (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27, 31-36.
- Ota, H., H. Mitsuda, M. Kimura and T. Kitano (2010): Reference Material for Nutrients in Seawater: Their Development and Present Homogeneity and Stability. In: *Comparability of nutrients in the world's ocean*, (eds.) M. Aoyama, A. G. Dickson, D. J. Hydes, A. Murata, J. R. Oh, P. Roose and E. M. S. Woodward, Tsukuba, Japan, : MOTHER TANK, 2010, 11-30.
- Wood, E. D., F. A. J. Armstrong and F. A. Richards (1967): Determination of Nitrate in Sea Water by Cadmium-Copper Reduction to Nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 47, 23-31.