

窒素安定同位体比測定における水試料の濃縮法

大和田茂人 高津有美* 津野田隆敏 大瀧勝 山竹定雄

Concentration Method of Nitrogenous Compounds in Water Samples on Measuring the Nitrogen Stable Isotope Ratio

Shigeto OOWADA, Yumi KOUZU, Takatoshi TSUNODA, Masaru OOTAKI, Sadao YAMATAKE

When measuring the nitrogen stable isotope ratio in environmental water samples, such as groundwater, concentration operation of nitrogenous compounds is needed to achieve the detection sensitivity of the equipment. However, this operation gives the change of the nitrogen stable isotope ratio due to isotope fractionation. The rise of $\delta^{15}\text{N}$ value was considered to be generated from volatilization of $\text{NH}_4\text{-N}$ during concentration operation. Especially, the rise of $\delta^{15}\text{N}$ value was large in the case of alkali water samples, and the difference from the theoretical $\delta^{15}\text{N}$ value was 11 % . Then, the water samples added with phosphate buffer were concentrated using rotary evaporator and measured $\delta^{15}\text{N}$ value. As a result, the difference from the theoretical $\delta^{15}\text{N}$ value became small, but this value did not correspond with the theoretical $\delta^{15}\text{N}$ value perfectly. So, the concentration method of $\text{NH}_4\text{-N}$ with cation exchange resin was studied. This method showed good accuracy and achieved short analysis time compared to the conventional methods.

Keywords : Nitrogen stable isotope ratio, $\delta^{15}\text{N}$ value, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, Cation exchange resin

はじめに

近年、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素による地下水汚染の汚染原因究明法の一つとして、窒素源の由来を知ることができる窒素安定同位体比法が注目されている。

窒素安定同位体比は、空気中の窒素の同位体存在比を基準とし下記の式で求められ、 $\delta^{15}\text{N}$ 値として千分率（‰：パーミル）で表わされる。^{1,2)} $\delta^{15}\text{N}$ 値は、窒素供給源に対し

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left\{ \left(\frac{R_{\text{試料}}}{R_{\text{大気}}} \right) - 1 \right\} \times 1000$$

$$\text{ここで } R = {}^{15}\text{N} / {}^{14}\text{N}$$

$$R_{\text{大気}} = 0.365 / 99.635 = 3.663 \times 10^{-3}$$

ほぼ一定の値を示す性質^{1, 2)}があり、この性質を利用し硝酸性窒素汚染の原因究明に役立てている。

地下水等窒素濃度の低い水試料は、機器の検出感度による制限から前処理として、一般に濃縮操作が必要な場合がある。しかし、濃縮操作中に試料によっては、同位体分別等の作用で同位体比が変わる場合がある。そこで、模擬試水や環境水を使用し、従来地下水の濃縮に用いられるエバポレーター法（以下「EV法」という）や凍結乾燥法（以下「FD

法」という）を用い濃縮操作の問題点を明らかにした。その結果、従来法ではアンモニア性窒素の揮散による同位体分別を完全に防ぐことは困難で、アンモニア性窒素を多く含む試料の濃縮には適していないことが分かった。また、これらの方法には、人手と時間がかかり、大量の試料を濃縮するには適していない等の問題点もある。このため、アンモニア性窒素の揮散による同位体分別を防ぐことを目的として、熱や減圧を使用しない濃縮方法である陽イオン交換樹脂法を検討することとした。本法は、イオン交換樹脂のため短時間での濃縮が可能となることも期待される。

試薬及び装置

1. 試薬

同位体比分析用試薬の還元銅、酸化クロム、酸化銀コバルト、すずカップ及び石英綿はサンティス社製元素分析用試薬、標準物質の塩化アンモニウム及び硝酸ナトリウムは和光純薬(株)製試薬特級、イオン交換樹脂AG50W-X8はBiorad製を使用した。

2. 装置

硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、アンモニア性窒素測定はブラン・ルーベ社製AASC II オートアナライザー、窒素安

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*現 西条地方局保健部生活衛生課

定同位体比測定はTermo Finigan社製FlashEA1112及びDELTAplusXPを使用した。

窒素安定同位体比の測定方法

1. 固体試料

すずカップ（直径5mm×高さ9mm）に窒素として80 μg になるよう分取し、そのまま窒素安定同位体比質量分析計で測定した。

2. 液体試料

各濃縮法で濃縮した後、濃縮液の窒素濃度を測定した。その濃度に応じて、すずカップに窒素として80 μg になるよう分取し、液体窒素で凍結させ、凍結乾燥機を用いて一晚凍結乾燥した後測定した。

なお、窒素濃度が高く凍結量の少ない試料は直径5mm×高さ9mmのカップを用い、窒素濃度が低く凍結量の多い試料は直径10mm×高さ10mmのカップを用いた。

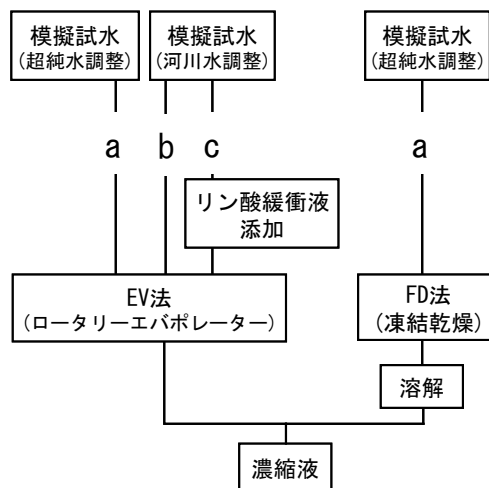


図1 全窒素濃縮法測定フロー

結果及び考察

1. 全窒素濃縮法の検討

1) 濃縮操作の影響

濃縮操作が $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響を検討するため、硝酸性窒素溶液とアンモニア性窒素溶液をEV法（湯浴温度70℃）とFD法を用いて濃縮し比較した（図1のa）。試料は、硝酸ナトリウムと塩化アンモニウムを超純水に窒素としてそれぞれ20mg/Lになるように溶解した。比較のため、硝酸ナトリウムと塩化アンモニウムの粉末の $\delta^{15}\text{N}$ 値を直接測定し理論値とした。その結果を図2に示す。硝酸性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、EV法、FD法ともに理論値と比べほとんど差はみられなかった。一方、アンモニア性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、FD法、EV法ともに理論値と比べ差がみられ、特にFD法に大きな差がみられた。これらのことから、アンモニア性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、濃縮操作の影響を受けやすいことがわかった。

2) pHの影響

$\delta^{15}\text{N}$ 値に影響する要因として、pHの影響も考えられる。そこで、アルカリ性の影響を検討するため、アルカリ性の硝酸性窒素溶液とアンモニア性窒素溶液をEV法を用い、濃縮を行った（図1のb）。試料は、窒素をほとんど含まない河川水（pH8.5）に塩化アンモニウム、硝酸ナトリウムを加え、窒素として40mg/Lになるように調製した。その結果を図3に示す。硝酸性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、理論値と比べ差は小さかった。一方、アンモニア性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、理論値と比べ差が、11%と大きく値も上昇していた。このことは、朴らの報告³⁾と同様に、アンモニア性窒素の揮散に伴う $\delta^{15}\text{N}$ 値の上昇が原因と推察され、これらの濃縮法においては、濃縮時の試料のpHが $\delta^{15}\text{N}$ 値の測定において重要であることが示唆された。

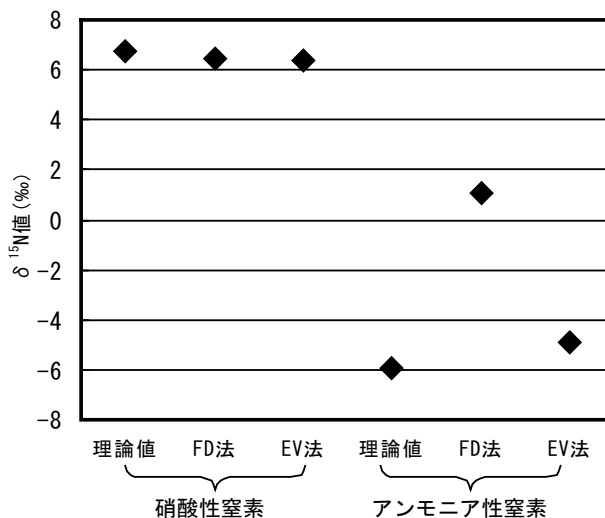


図2 濃縮操作の $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響

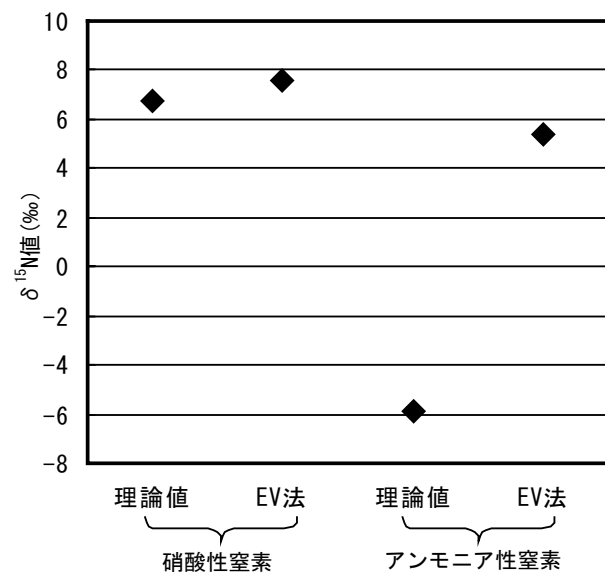


図3 pHの $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響

3) 緩衝液の添加によるアンモニア性窒素揮散防止の効果

アンモニア性窒素の揮散防止効果を検討するため、アルカリ性の試料にリン酸緩衝液 (pH5.8) を添加しpHを弱酸性に調整して、EV法を用い濃縮を行った (図1のc) . 試料は、窒素をほとんど含まない河川水 (pH8.5) に塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム溶液を加え、窒素として40mg/Lになるように調製した。その後、リン酸緩衝液を2.5mL添加しpHを5.8に調整したものをを用いた。その結果を図4に示す。リン酸緩衝液を添加しなかったときと同様に、硝酸性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、理論値と比べ差は小さかった。一方、アンモニア性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、理論値と比べ差が4.7%となり、リン酸緩衝液を添加しなかったときと比べ、理論値に近づく傾向を示した。

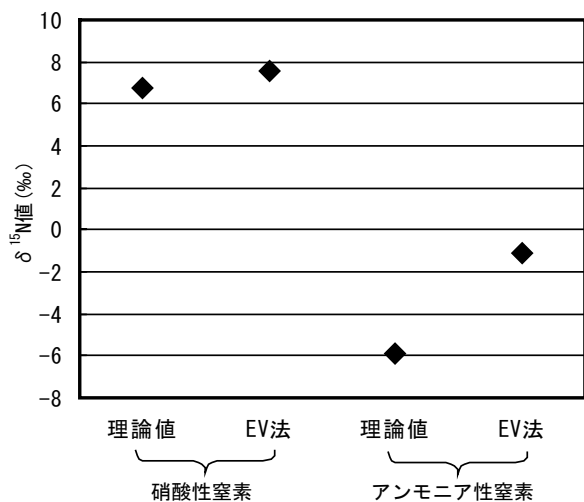


図4 緩衝液の効果

このことから、リン酸緩衝液には、アンモニア性窒素の揮散を防止する効果がみられたが、理論値との差を完全に防ぐことができなかった。このため、窒素を形態別に分別して測定する方法を検討することとした。

2. 形態別濃縮法 (陽イオン交換樹脂法) の検討

窒素を形態別に測定する方法として、変化しやすいアンモニア性窒素に焦点を絞り、陽イオン交換樹脂を用いて分離濃縮する方法を検討した (図5) .

1) 溶離液の検討

陽イオン交換樹脂に吸着させたアンモニア性窒素の溶離液として、塩化カルシウム溶液 (2mol/L) , 塩化マグネシウム溶液 (2mol/L) , 塩酸 (2mol/L) , リン酸 (0.67mol/L) の4種類の溶離液を用いた (図5の①) . 各溶離液に対するアンモニア性窒素の回収率を示す (図6) . 塩化マグネシウム溶液と塩化カルシウム溶液は高い回収率を示したが、塩酸とリン酸は低い回収率を示した。また、塩化カルシウム溶液では、凍結乾燥後、測定までの間に吸湿性を示し、同位体比測定の上で感度低下等の悪影響を及ぼすことがわかった。そこで、溶離液として次に回収率の高い塩化マグネシウム溶液を採用した。

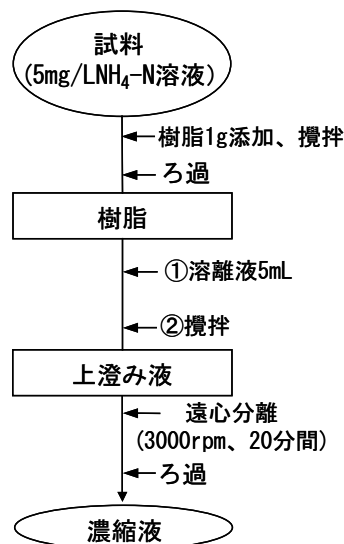


図5 樹脂測定フロー

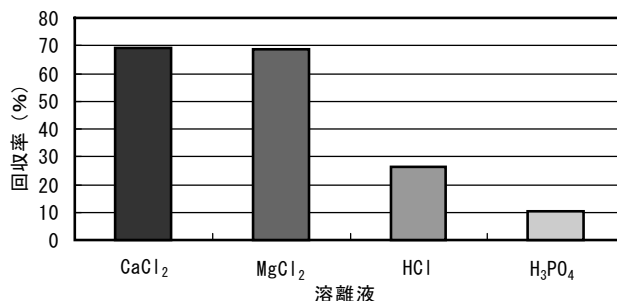


図6 溶離液と回収率の関係

2) 溶離時間の検討

樹脂に吸着させたアンモニア性窒素を溶出させる時間を検討するため、攪拌時間を10分から3時間まで変えて溶出を行った (図5の②) . 溶離液は、塩化マグネシウム溶離液 (0.5mol/L) を用いた。溶離時間に対するアンモニア性窒素の回収率及び $\delta^{15}\text{N}$ 値を示す (図7) . 回収率は、いずれの溶離時間の間にも有意な差は認められず ($p > 0.01$) , $\delta^{15}\text{N}$ 値も理論値である塩化アンモニウム粉末の値との間にも有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) . このため、安全を見込み溶離時間を30分とした。

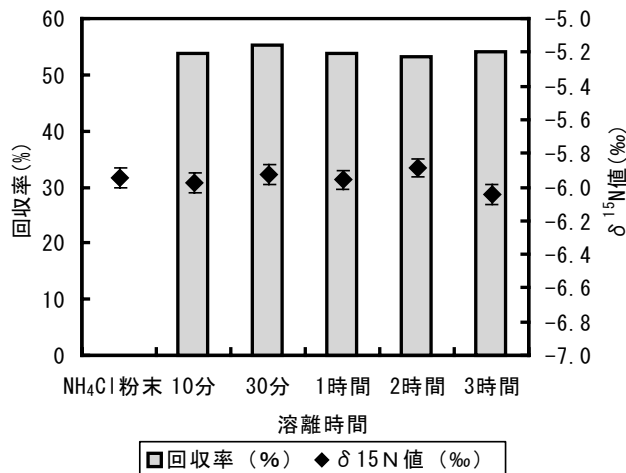


図7 溶離時間に対する回収率及び $\delta^{15}\text{N}$ 値の変動

3) 回収率の影響の検討

アンモニア性窒素の回収率が、 $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響を検討するため、塩化マグネシウム溶離液濃度を0.5~0.05mol/Lとすることで回収率を変化させ、溶出を行った(図5の①)。各溶離液濃度に対するアンモニア性窒素の回収率と $\delta^{15}\text{N}$ 値を示す(図8)。溶離液濃度の減少と共に回収率は減少した。しかし、 $\delta^{15}\text{N}$ 値は理論値と比べ、いずれの溶離液濃度の $\delta^{15}\text{N}$ 値の間にも有意な差は認められなかった($p>0.05$)。

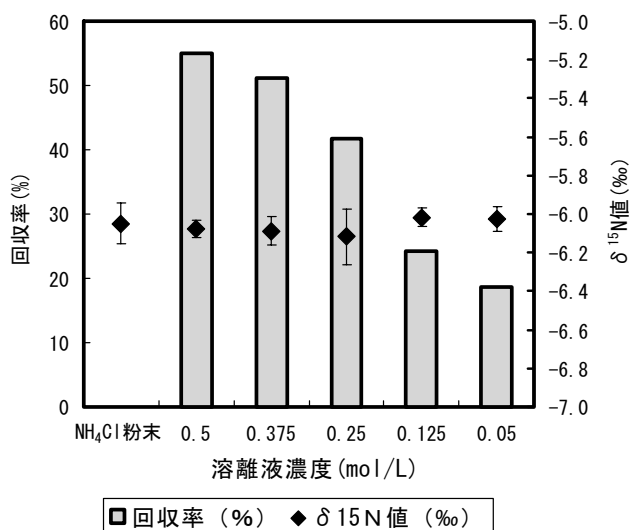


図8 溶離液濃度に対する回収率及び $\delta^{15}\text{N}$ 値の変動

4) 濃縮方法及び濃縮時のpHの検討

濃縮方法とpHの影響を検討するため、酸性試料(pH5.6)とアルカリ性試料(pH8.0)を用いて濃縮を行った。前者は塩化アンモニウムを超純水に溶解し、後者は、塩化アンモニウムを超純水に溶解後、5%炭酸水素ナトリウム溶液でpH8.0に調整した。これら二種類の試料を樹脂法、EV法及びホットプレート法(試料温度80℃)(以下「HP法」という)の三種類の方法で濃縮操作を行い比較した。

a) 回収率に及ぼす影響

各濃縮方法ごとに回収率を比較すると、樹脂法ではどちらのpHの試料でもばらつきは少なく、安定した回収率が得られた(図9)。一方、EV法とHP法では、アルカリ性試料においてばらつきが見られ、樹脂法より低回収率となった。以上の結果から、樹脂法による回収率は、EV法、HP法に比べpHの影響が少ないことがわかった。

b) $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響

酸性試料における各濃縮方法の $\delta^{15}\text{N}$ 値を示す(図10)。樹脂法は、理論値との間に有意な差は認められなかった($p>0.05$)が、EV法とHP法では理論値との間に有意な差が認められた($p<0.01$)。アルカリ性試料における各濃縮方法の $\delta^{15}\text{N}$ 値を示す(図11)。樹脂法は、理論

値との間に有意な差は認められなかった($p>0.05$)が、EV法とHP法では、理論値との間に有意な差が認められた($p<0.01$)。以上の結果からも、アンモニア性窒素の $\delta^{15}\text{N}$ 値の測定には、アンモニア性窒素の揮散等同位体分別を防ぐ濃縮方法が必要であることが再確認された。そして、樹脂法は同位体分別を起こさない濃縮方法であり、アンモニア性窒素の濃縮に適していることが分かった。

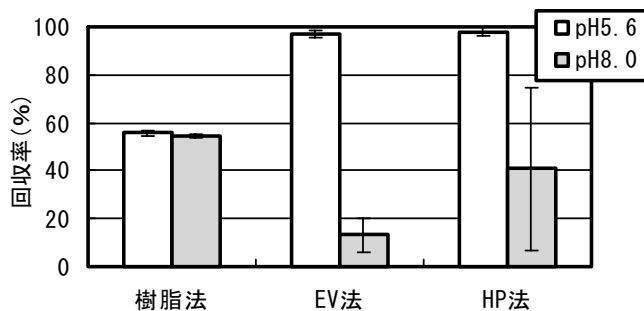


図9 回収率に及ぼす影響

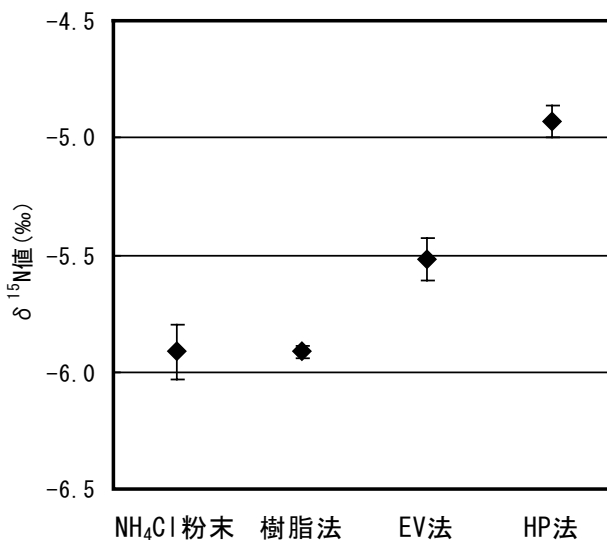


図10 $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響 (pH 5.6)

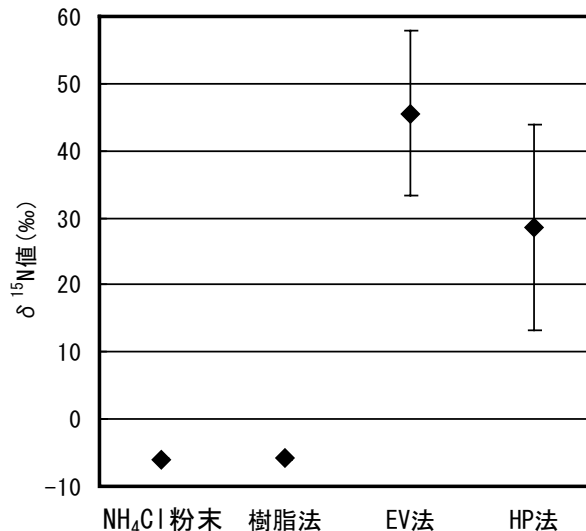


図11 $\delta^{15}\text{N}$ 値に及ぼす影響 (pH 8.0)

まとめ

水試料を濃縮することで、理論値と比べ $\delta^{15}\text{N}$ 値が変わる要因を明らかにし、窒素安定同位体比測定における適切な濃縮法を検討した。その結果、従来地下水等環境水の測定で用いられることの多いEV法やFD法では、濃縮操作によるアンモニア性窒素の揮散の影響とみられる $\delta^{15}\text{N}$ 値の上昇がみられた。特に、その影響はアルカリ性の試料で強く、理論値との差は11%と大きかった。このため、pHの変動を防ぐことを目的として、リン酸緩衝液を用い、EV法で濃縮を行ったところ、アンモニア性窒素の理論値との差は4.7%と小さくなったが、理論値とは一致しなかった。このことから、窒素を形態別に測定する方法に着目し、アンモニア性窒素を陽イオン交換樹脂で単離濃縮して測定する方法を検討した。アンモニア性窒素のみを対象とした場合、本法は、従来法に比べ短時間で正確に測

定が可能になった。今後、今回の結果を踏まえ、全窒素安定同位体比測定への応用を検討していきたい。

文 献

- 1) 公害研究対策センター（環境省水環境部地下水・地盤環境室監修）：硝酸性窒素による地下水汚染対策の手引き、平成14年3月25日発行
- 2) 熊本県保健環境科学研究所：硝酸性窒素による地下水汚染機構解明調査報告書、平成12年10月1日発行
- 3) 朴 光来ほか：日本土壤肥科学雑誌, 67(3), 314-316 (1996)
- 4) 重窒素圃場利用研究会：15Ninformation, No.13
- 5) Moritz F. Lehmannほか：Anal. Chem, 73.4717-4721 (2001)