

令和3年度伊藤光昌氏記念学術助成金(研究助成)成果報告書

研究課題番号	R3-R5
研究課題名	プログラミングマイクロフローインジェクション法を用いた高塩分ブライン水の分析への挑戦
研究代表者	八田 真理子
所属・職 (または学年)	海洋研究開発機構地球環境部門・副主任研究員

1. 研究背景と目的

北極海の水循環や物質輸送は、近年の気候変動、急激な海水の後退により大きく変化している。この物質循環や生物生産の変化を捉えるために、化学成分、特に栄養塩や微量金属のより広範囲かつ高頻度の試料採取および分析が求められる。しかし、現行の船上・陸上の分析手法は煩雑で、分析には高い専門性が求められ、異なる研究機関による高精度・高品質のデータベースの構築・拡大には未だ大きな課題が残る。特に、北極海の表層及び中層水は、河川水の流入、海水の融解水の影響、高塩分の大西洋水などの影響を受けて塩分が大きく異なる(0-40 psu)。さらには、海水形成プロセス上で形成されるブライン水は、その塩分が90 psuにも及ぶという報告もある。一方、現在使用されている船上・陸上での栄養塩の分析手法は、60年前に開発されたエアージェグメント形式のフロー法を採用しており、試料の光屈折率の違いによる塩分の影響を受けるため、直接分析は難しく、試料塩分に合わせた標準溶液の調整や分析値の補正、および希釈などが必要である。そこで、このような様々な塩分を持つ試料を簡便かつ正確に分析する手法の確立が望まれる。

本研究は、近年開発されたプログラム可能なフロー分析法(programmable Flow Injection, pFI) [Hatta et al., 2018; 2019; 2020] を用いて、①塩分の大きく異なる試料を同時に分析できるかを検討し、申請者により既に確立している分析法をモデルケースとして、塩分の異なる試料の化学反応への影響評価、②北極域で想定される様々な塩分を

持つ試料(表層海水、様々な海水の融解水、ブライン水など)を分析することを目的とした。さらに、③実際に北海道の道東に位置するサロマ湖(汽水湖)にて、ブラインの採取を試み、分析した。

2. 分析手法および試料採取

本研究では、Hatta et al (2021) で報告したプログラミング可能なフローインジェクションシステム(Figure 1.) による、ケイ酸塩測定法を用いて行なった。ただし、ケイ酸塩測定法のコイルの温度は、50度設定と30度設定の2種類で分析を行った。結果は、3.1と3.2に示す。試料中の塩分が、それぞれの測定法への影響を調べるため、イオン交換(milli QまたはDI)水、人工海水(塩化ナトリウム水)、低栄養塩水(Low Nutrient Sea Water, SW)をそれぞれ用いて、標準溶液を調整した。

試料水は、2021年10月3日から10月4日の間、観測船「みらい」のMR21-05Cにおいて、表層海水分析室に設置されている表層水ポンプから連続的に組み上げられる海水を採取することで5分ごとのケイ酸塩分析を行った。

積雪、海水及びブライン水の採取は、2022年2月25日・26日に北海道の道東に位置するサロマ湖(汽水湖)にて、Mark IIのアイスコーラー(直径9 cm)のアイスコアを2箇所採取し、長さを約30 cmに切断して、PVCパイプへ10-15分間安置し、サンプルを採取した。PVCパイプは、Miller et al (2015)の方式を参考にして制作した。水試料は、このアイスコアの穴から手動のポンプ

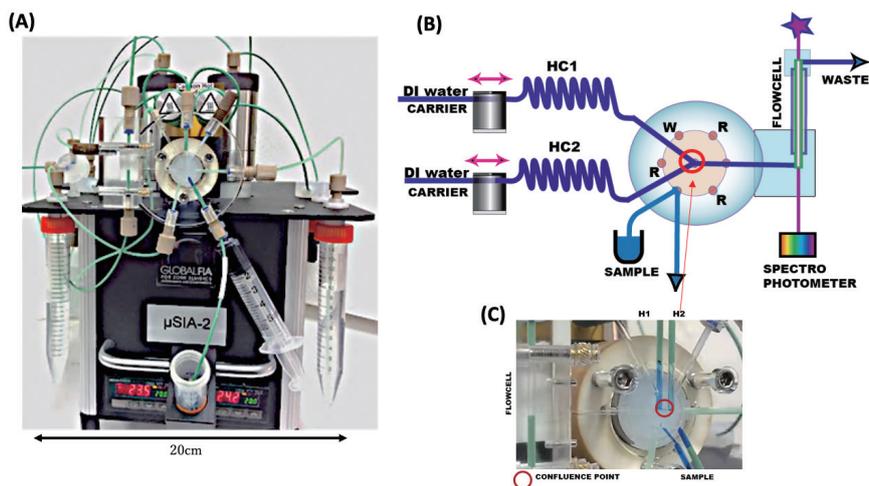


Figure 1. (A) mini-SIA2 platform. This analyzer has a same basic instrumentation as a Sequential Injection Analysis (SIA) Lab-on-valve (LOV) system. (B) Lab-on-valve manifold for programmable Flow Injection. HC1 and HC2—holding coils, 1–6 ports. W: Waste port, R: Reagent port. (C) a photo of the confluence point within the LOV.

を用いて、表層水、海水直下水、及び水深 85 cm の深さから採取し、さらに、サンプリング地点の水塊構造を把握するために、RINKO プロファイラーを用いて、水温、塩分、溶存酸素、濁度、蛍光度を測定した。得られたサンプルは、現場近くの建物内へ持ち帰って、積雪及び海水は室温で解凍し、ブライン水はそのまま冷蔵保存して、翌日 0.22 μm のディスクフィルターを通して濾過し、ケイ酸塩濃度を分析した。

3. 結果および考察

3.1. 高塩分水によるケイ酸分析の影響評価

本研究では、まず、人工海水（塩化ナトリウム添加）、低栄養塩海水 (SW)、イオン交換 (milliQ) 水にそれぞれ既知の対象成分を添加し、手動で分析装置にサンプルを導入する形で測定を行なった。また、キャリア液 (milliQ 水) と混合するステップを導入することで、自動希釈法も行なった。先に述べたように試薬の調整法と分析手法は Hatta et al (2021) と同じである。ただし、コイルの温度を 50 度設定から 30 度設定へ変更して行なった。これは、次に示す 2 つの理由に基づいている。まず、観測船「みらい」での北極航海中 (MR21-05C) に、表層海水分析室にて、海水サンプルを 1 カ月以上連続測定した際、コイル中に白い結晶が析出

したためである (Figure 2)。さらに、北海道の簡易ラボにて、miniSIA-2 システムのヒートコイルの温度が設定値よりも高くなってしまったことがわかり (50 度設定で 60 度以上になる)、システムが高温状態になり、分析装置にダメージ及び分析へ支障をきたすことが懸念されたため、急遽設定温度を 30 度とした。得られたデータを Figure 3 に示す。

Figure 3 は milliQ 水による検量線の傾き (青) は、人工海水 (NaCl) または低栄養塩海水 (SW) に比べて高い結果を示した。一方、海水マトリックスの標準溶液は、その塩分濃度が異なっても、検量線の傾きはほぼ一定であることを示した。さらに、人工海水を自動希釈法で分析した結果、Figure 3 で示されるように、SiO₂ ゼロを除いて (milliQ 水のゼロと同じものであり、吸光度も一致)、低栄養塩海水で調整した検量線の傾きと一致した。この結果から、自動希釈法を用いた場合、既知の標準溶液のケイ酸濃度と共に、海水自体も希釈されるため、希釈倍率が大きくなるにつれて塩分の影響も小さくなるが、本研究ではこの差は識別できなかったといえる。近年、Reference Material Nutrient Seawater (RMNS) の値は、分析の「正確さ (Accuracy)」を示す指標として使用されており、本研究でも、海水の検量線上に分布しており、正確さを伴う分析法といえる。

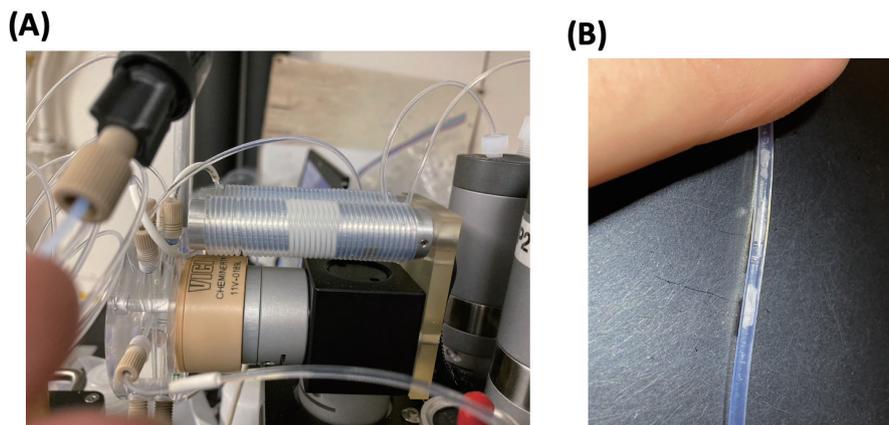


Figure 2. Photo of the 50C Holding coil (HC2) after the use of one month for the silicate assay at sea. The salt has been precipitated from the seawater sample during the continuous use.

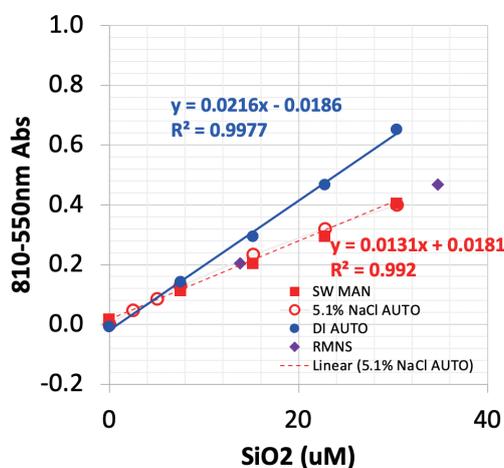


Figure 3. Standard curve of the silicate determination with the various matrix.

本研究では、マトリックスの違いによって（塩分差）、その吸光度に大きな差が出るという結果となった。これは、先行研究（Hatta et al., 2021）で得られた塩分の影響はほとんど見られなかった知見（分析精度以下）とは全く異なっている。先行研究で得られたイオン交換水ベース、海水ベースの検量線の傾きはそれぞれ、0.0371と0.0359（Hatta et al., 2021）と0.0216と0.0131（本研究）であった。つまり、本研究では、先行研究に比べて、低い感度であった（58%と36%）。検量線の傾きは、調整時の試薬（特にアスコルビン酸）の新鮮さなどが強く影響することがわかっているが、本研究では、このアスコルビン酸も分析の直前に行ったものであったため、試薬による違いとは考えにくい。一方、本研究と先行研究との大きな違いは、コイルの設定温度である。先に示した理由

により、コイルの温度設定を50度から30度へ引き下げたため、今回の結果は、反応速度の温度依存のために起こったと考えられる。ケイ酸分析においてモリブデン濃度と酸度の最適な測定条件は、リン酸分析の最適条件に比べてその幅が狭いことがわかっており、温度を低く設定したために、反応が完了していなかった、または海水の反応速度がイオン交換水の化学反応速度よりも極端に遅いため、差が発生したと考えられる。本報告書の「船上分析」での結果の項目でも述べるが、ケイ酸分析のコイルの温度設定を50度とした場合には、イオン交換水と海水ベースの検量線の傾きはほぼ同じであった。つまり、ケイ酸分析では温度依存が顕著であり、マトリックスの違いへも大きく影響するといえる。今後、より詳細な試薬調整の最適条件の検討を行い、コイルの温度に依存し

ない手法の開発を行いたい。

本研究の結果から、高塩分試料水の分析においては、コイルの設定温度を 30 度とした場合、サンプルの塩分の影響を強く受けるため、海水で調整した検量線を用いる必要があるといえる。

3.2. 実試料の分析：ケイ酸塩の船上自動分析

河川水の影響を強く受ける海域を想定し、2021 年 10 月 3 日から 10 月 4 日の間、観測船「みらい」(MR21-05C) の表層海水分析室に、サンプルを連続的に採取できる設備を整えて、5 分ごとのケイ酸塩分析を行った (Figure 4)。ただし、コイルの温度を 50 度設定として分析を行なった。塩の析出がないかを注意深く目視し、連続分析は 24 時間までとした。

本研究で得られた結果 (Figure 4B) は、先行研究 (Hatta et al., 2021) で得られた知見 (分析精度以下) とほぼ一致した。3.1 でも先に述べたように、コイルの温度が 50 度である場合は、塩分の影響はほとんどないといえる。また、本研究で得られたケイ酸濃度は、船上に設置された別の栄養塩分析装置で得られた分析結果とも比較し、よく一致していた。

3.3. ブラインの分析

当初予定していた米国アラスカ州の定着水の海水中のブラインの分析は、コロナの影響により、行えていない。海水コアサンプルは、米国アラスカ大学フェアバンクス校の Aguilar-Islas 准教授らのチームの協力により、2021 年 4 月-6 月において行われた。得られた海水中のブライン試料は、適切な処理を行ったのち、現在ハワイ大学の研究室へ一旦輸送された。来年度、このサンプル分析を進める予定である。

3.4. ブラインの採取手法の確立と分析

当初のブライン水分析が予定通り進まなかったため、本研究では、北海道のサロマ湖において、実際に海水コアを採取し、ブライン水を採水する手法開発を行った。実際のサンプル採取は、Figure 5 に示すサンプラーを設置し、海水を設置し、10-15 分程度安置した。得られたサンプルは、持ち帰って、0.22 μm のディスクフィルターで濾過したのち、ケイ酸を測定し、結果は Table1 に示した。また、観測点における積雪、海水、海水、及びブラインのケイ酸濃度を Figure 6 に示した。

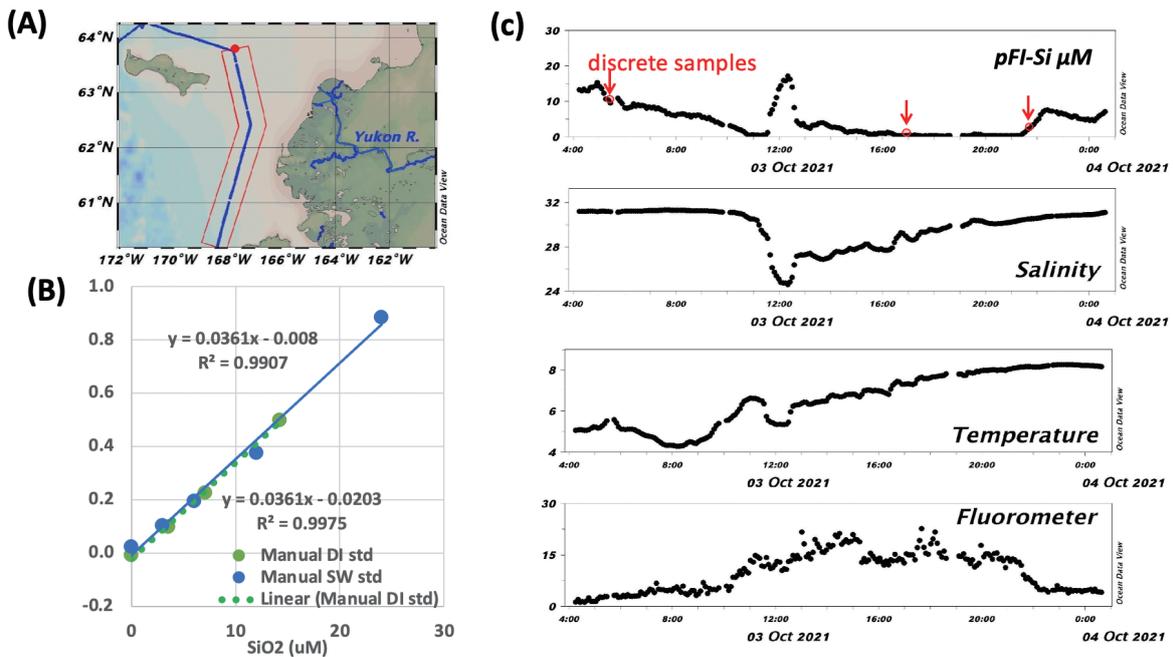


Figure 4. (A) Sampling Map, (B) Standard curve of the silicate determination with the various matrix. (Y axis is 810 nm minus 510 nm) (C) the obtained results of Si, Salinity, Temperature, and Fluorometer.

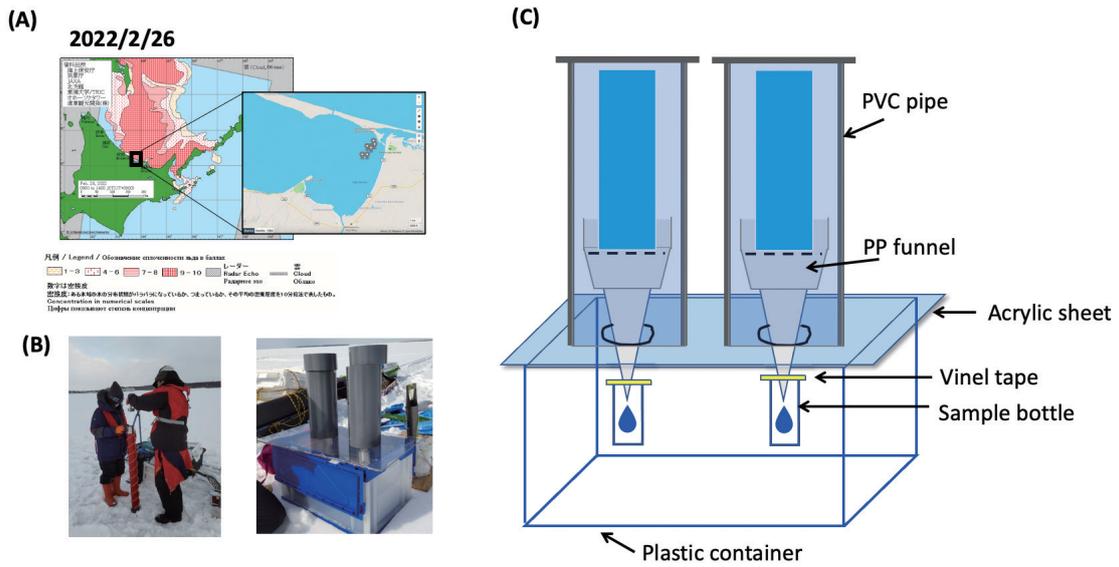


Figure 5. (A) The sea ice concentration during the sampling and the sampling location in Saroma Lake. (B) The photos of coring with Mark II and the handmade brine sampler. (C) Design of the home-made brine water sampler.

Table 1. プラインのケイ酸濃度

	SiO ₂
B1	121.0
B2	129.6
B3	143.6
B4	130.5
B5	133.7

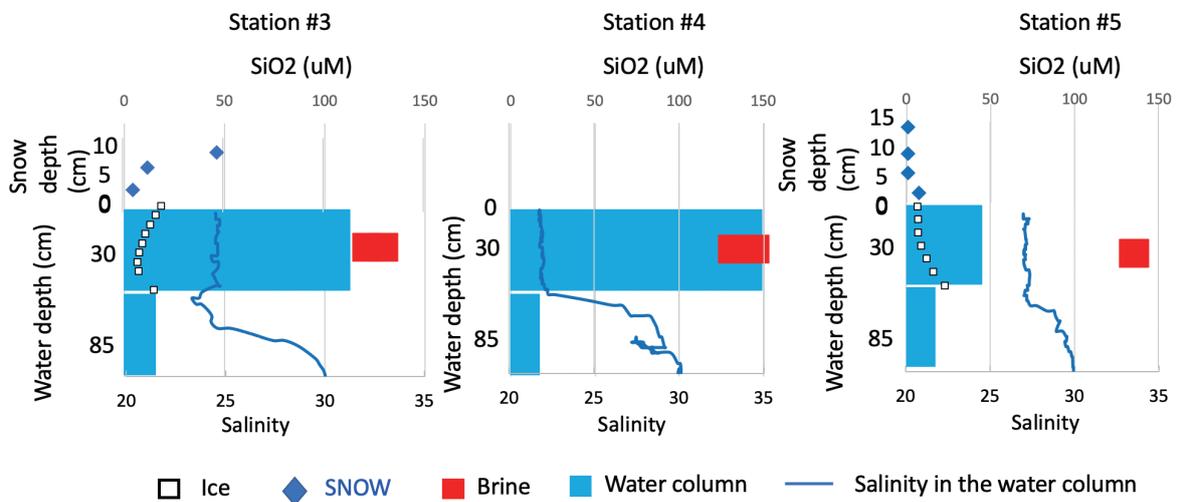


Figure 6. Silicate concentrations of each samples in the Saroma Lake.

今回の観測で得られたサンプルが“ブライン”であるかを検討した。まず、全ての観測点において、“ブライン”として採取したサンプルのケイ酸濃度は120–140 μM であった。一方、積雪や海水中のケイ酸値は、これらの“ブライン”サンプルと比べて1桁以上低かった。さらに、海水直下の海水のケイ酸値は、“ブライン”サンプルとほぼ同等か、それよりも低い値を示した。このことから、今回採取した“ブライン”として採水したサンプルは、そのほとんどが、周りの海水または、ブラインであると推測できる。より詳しくブラインの特性（そのほかの栄養塩、塩分、酸素同位体比）を調べるために、残ったサンプルは冷凍して実験室に持ち帰り、今後測定する予定である。また、採取した海水の物理的性質は、国立極地研究所の伊藤優人（共同研究者）の剥片解析などにより、より詳しい知見が得られると期待する。

4. 今後の展望

近年着手してきたマイクロ法は、微量（100–600 μL ）の溶液を2つのポンプの同時稼働により、試薬とサンプルを完全に混合でき、さらにフローを「一時停止」すること、また完全に混合している溶液のみを「ハートカッティング」することで、既存フロー法の問題点であった試料とキャリア水間の光屈折率の違いによる塩分の影響を克服できることがわかってきた（Hatta et al., 2018; 2019; 2020）。また本法は、この「一時停止」間に、バッチ法や既存のフロー法では得られなかった化学反応速度をモニタリングできるという利点がある。そのため、本研究では、塩分と化学反応の関係を詳しく調べることができた。

先行研究では、ケイ酸分析はこの塩分による違いはほとんど存在しないと見られていたが、本研究では、設定温度によっては、化学反応速度に大きな影響を与えることがわかった。今後、よりケイ酸分析法の試薬混合に関して、より詳しい最適化を行いたい。さらに、今回着手できなかったアラスカのブラインの分析を今後進めていく。

簡便・簡略・自動化が可能なプログラミング可能なフロー分析法を海洋化学の研究分野に応用することは、データベース構築の拡大に貢献できる。塩分の異なる試料の分析が可能となれば、恒常的な低栄養塩海水の使用を制限できる。さらに、この手法は、装置を完全にコンピューター制御可能であり、人為的ミスの可能性を最小限にでき、ひいては、今後、より正確な栄養塩や微量金属の分布把握、その輸送量や、生物地球化学的役割の解明が期待できる。

参考文献

- Miller, L.A., Fripiat, F., Else, B.G.T., Bowman, J.S., Brown, K.A., Collins, R.E., Ewert, M., Fransson, A., Gosselin, M., Lannuzel, D., Meiners, K.M., Michel, C., Nishioka, J., Nomura, D., Papadimitriou, S., Russell, L. M., Lotte Sørensen, L., Thomas, D.N., Tison, J-L., van Leeuwe, M.A., Vancoppenolle, M., Wolff, E. W., Zhou, J. (2015) Methods for biogeochemical studies of sea ice: The state of the art, caveats, and recommendations. *Elementa: Science of the Anthropocene* doi:10.12952/journalelementa.000038.
- Hatta, M., Measures, C.I., Ruzicka, J. J. (2018). Programmable Flow Injection. Principle, methodology and application for trace analysis of iron in a sea water matrix. *Talanta* 178. 698–703. 2018. doi: 10.1016/j.talanta.2017.10.007.
- Hatta, M., Measures, C.I., Ruzicka, J.J. Determination of traces of phosphate in sea water is automated by programmable flow injection, and optimized by means of novel information on kinetics of formation and spectra of phosphomolybdenum blue. *Talanta* 191. 333–341. doi: 10.1016/j.talanta.2018.08.045.
- Hatta, M. Ruzicka, J., Measures, C.I. The performance of a new linear light path flow

cell is compared with a liquid core waveguide and the linear cell is used for spectrophotometric determination of nitrite in sea water at nanomolar concentrations. *Talanta*. Volume 219, 1 November 2020, 121240. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121240

Hatta, M., Ruzicka, J., Measures, C.I., Davis, M.

(2021) Programmable flow injection in batch mode: Determination of nutrients in sea water by using a single, salinity independent calibration line, obtained with standards prepared in distilled water, *Talanta*. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122354.