

海水中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの簡易で高感度な測定システムの開発

児玉谷 仁, 富安 卓滋

鹿児島大学大学院理工学研究科・理学部

概要

海水中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオン濃度は、海洋環境を把握するために重要な測定項目である。最近、報告者らは、塩基性水溶液条件下 222 nm の紫外線を硝酸イオン、亜硝酸イオンに照射することで、これらイオンを効率よく強い酸化力を持つペルオキシナイトライトに変換できることを見出した。ペルオキシナイトライトはルミノールと強い発光反応を起こすことが知られている。よって、これらの反応を利用し、両イオンをイオンクロマトグラフィーで分離した後、オンラインで紫外線を照射して光化学反応(PR)を行い、そしてルミノール溶液との混合により化学発光(CL)を起こさせる検出法(以下、PR-CL法)で、海水中の硝酸イオン、亜硝酸イオンを測定可能とした。しかし、この確立した測定法は、既存のイオンクロマトグラフィー分離に新たな検出法(PR-CL法)を組み合わせただけのものであり、PR-CL法のパフォーマンスを活かしていない状況であった。

そこで本研究では、少量試料しか注入できないことがデメリットである内径の小さなカラム(セミマイクロカラム)を分離カラムに採用し、セミマイクロカラムのメリットである検出感度の向上、溶離液流量の低下(長時間運転, 低ランニングコスト)を活かし、さらに低流量となったことで、PRやCLの反応効率の向上などを達成できると考え、PR-CL法による硝酸イオン・亜硝酸イオンの簡易で高速な測定法の確立を進めた。PR-CL法が塩基性水溶液条件下でのみ利用できるという制限から、化学的・物理的に安定であるグラファイトカーボンを固定相として持つセミマイクロカラム(内径 2 mm, 外径 30 mm)を採用した。このカラムにセチルトリメチルアンモニウムをコーティングすることで陰イオン交換カラムとして硝酸イオン、亜硝酸イオンの分離を検討した。

結果として、溶離液の流量 0.4 mL/min で 3 分以内に亜硝酸イオンと硝酸イオンを分離できた。またセミマイクロカラムの利用のため、内径の細い流路を使う必要があり、光化学反応器について最適化を進めた。加えてイオンクロマトグラフィーを利用した方法で、鹿児島湾奥の海底熱水噴気孔の活動と、硝酸イオン、亜硝酸イオンの濃度変動の関係についてデータを得つつ、開発中の測定法を評価するための試料およびデータとして利用した。

1. 研究目的

海水中の硝酸イオンおよび亜硝酸イオン濃度は、海洋環境を把握するために重要な測定項目である。一般的に硝酸イオン・亜硝酸イオンの同時測定法として、イオンクロマトグラフ(IC)ー電導度検出または UV 検出法が採用されている。しかし、海水などの高濃度塩類を含む試料では、高濃度イオンが濃縮や IC 分離を妨害するため、希釈して測定するなどの対応が求められ、結果、nM レベルの

測定は困難となる。そこで、海水測定には、オートアナライザー法(グリス反応を利用した誘導体化 UV 検出法をフローインジェクションにより自動化したもの)が海水における測定法として採用されている^[1]。しかし、Cu-Cd カラムを用いた硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元に伴う有害廃液の発生、硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの合計濃度を測定し、別途測定した亜硝酸イオン濃度を差し引くことで硝酸イオン濃度を算出する手法であるため、Cu-Cd カラム

の還元効率の変動が硝酸イオンの定量値に大きく影響を与えるなどの問題が知られている。

報告者らは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の検出法として、オンライン紫外線照射 (PR) ルミノール化学発光検出 (CL) 法 (以下、PR-CL 法) による含窒素化合物の測定法を開発してきた。測定原理としては、塩基性条件下で含窒素化合物に紫外線を照射すると、強い酸化力を持つペルオキシナイトライト (ONOO) が生成する。このペルオキシナイトライトをルミノールの化学発光検出で測定するものである。N-ニトロソアミン類などは、254 nm の低圧水銀灯による紫外線照射で効率よくペルオキシナイトライトに変換されることを確認し、高速液体クロマトグラフィー分離と組み合わせることで、ng/L レベルの測定が可能であることを報告してきた^[2, 3]。簡易かつ ng/L レベルの N-ニトロソアミン類を水試料から直接検出できる測定法であるため、下水や飲料水の処理過程、またこれら水処理に使われる逆浸透膜や消毒剤における N-ニトロソアミン類の除去や生成評価に利用してきた。一方、硝酸イオンや亜硝酸イオンも N-ニトロソアミン類と同様に紫外線照射によりペルオキシナイトライトを生成するため、同装置で測定可能であったが、N-ニトロソアミン類と比べ 2 ケタほど低感度であった^[4, 5]。しかし最近、紫外線光源として低圧水銀灯の代りに 222 nm のエキシマーランプを使用したところ、硝酸イオン・亜硝酸イオンが高効率でペルオキシナイトライトに変換されることを確認した。そこで陰イオンクロマトグラフィー (IC) 分離と組み合わせた IC-PR-CL 装置で、僅か 1 mL の試料注入量で nM レベルの定量が可能で、海水試料でも測定可能な硝酸イオン・亜硝酸イオンの測定法を確立した^[6]。しかし確立した方法は、既存の IC 装置に PR-CL 法を組み合わせただけであり、少量の試料注入量で高感度検出を達成できる PR-CL 法のパフォーマンスを活かせていない状況であった。

そこで本研究では、少量試料しか注入できないことがデメリットである内径の小さなカラム (セミマイクロカラム) を分離カラムに採用し、セミマイクロカラムのメリットである検出感度の向上、溶離液流量の低下 (長時間運転, 低ランニングコスト), さらに低流量となったことで、光化学反応および化学発光反応の高効率化などを目指し、PR-CL 法による硝酸イオン・亜硝酸イオンの簡易で高速な測定法の確立を進めた。特に本研究では高速分離を達成するため、

分離条件を変化させやすいイオンペアクロマトグラフィー (IPC) による分離を検討した。また、開発法の評価のための海水試料として、報告者が定期的にサンプリングを行っている鹿児島湾の海水を用い、開発法の評価と同時に鹿児島湾奥の若尊カルデラにおける海底熱水噴気活動と硝酸イオン、亜硝酸イオンの存在濃度と季節変動についてもデータを得ることとした。

2. 研究方法

2.1 試薬

硝酸イオン、亜硝酸イオンの検量線溶液は 1000 mg/L 標準溶液 (富士フィルム和光純薬, 以下 Wako) を用いて 1 mM 混合溶液を調製し、これを Mill-Q 水で希釈することで調製した。溶離液は 1 M 水酸化ナトリウム溶液 (容量分析用, Wako) とメタノール (LC-MS, Wako) を利用して調製した。ルミノール溶液は、ルミノール (東京化成) と炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム (いずれも Wako, 特級) を用いて調製した。またイオンペア剤としてセチルトリメチルアンモニウム (CTAC⁺) ブロミド (東京化成) を利用した。また海水中の硝酸イオン・亜硝酸イオンの認証標準物質として KANSO CRM Lot CO, CR, CH, CP の 4 種類を利用した。

2.2 IC および IPC 装置構成

測定に利用した IC および IC-PR-CL 装置の概略図を Fig. 1 に示す。オートサンプラーから注入された試料は、溶離液により、プレフィルター、ガードカラム、分離カラムを移動し、各イオンに分離される。その後、光化学反応器内で紫外線を透過することで知られるテフロン (FEP) チューブ越しにオンラインで紫外線が照射される。紫外線照射により硝酸イオン、亜硝酸イオンから生成したペルオキシナイトライトが、ルミノール溶液と混合されることで生じた化学発光を検出器でとらえるシステムとなっている。

光化学反応器は、紫外線光源として 222 nm KrCl エキシマーランプ (セン・エンジニアリング株式会社) を用いた。この光源の照射面が 10 cm x 5 cm であったため、3D プリンターで FEP チューブ等を固定する台座を作成し、光化学反応器として利用した。

また溶離液調製の際、大気等から混入する硝酸イオン等を除去するため、調製した溶離液をポンプで送液し、電解再生陰イオン交換モジュール (AEM, 日理工業株式会社) を通して生成した後、PFA ボトルに溜めて、そこから再度、

溶離液として送液する方法を用いた。この時 PFA ボトル内の空気は、NaOH 水溶液で洗気したものが入るようにして汚染を防いだ。

また未ろ過の海水試料を直接注入することにしたため、0.1 mm の PEEK 製プレフィルター (直径 1 mm, GLsciences) を分析カラムの前に接続することで、分析カラムが詰まるトラブルを回避することとした。

2.3 IC 装置および IPC 装置の測定条件

溶離液には 30 mM 水酸化ナトリウム水溶液 (2%メタノールを含む) を利用した。またルミノール溶液は 0.5 M の炭酸緩衝液 (pH 10) で 0.05 mM ルミノールを調製して利用した。

IC 装置では、分離カラムに Dionex Ion Pac AS19 (内径 4 mm, 長さ 250 mm, Thermo Fisher Scientific) とガードカラムとして Dionex Ion Pac AG19 (内径 4 mm, 長さ 50 mm) を組み合わせたものを採用した。分離条件として、溶離液の流量は 1.0 mL/min, ルミノール溶液の流量 0.5 mL/min を採用し、試料注入量は 1 μ L, 紫外線照射時間は約 2 秒 (内径 0.5 mm, 外径 1/16 inch FEP チューブ 20 cm) とした過去の報告条件を用いた^[6]。この条件での IC 装置と比較し、IPC 装置の条件を決定した。

最終的に本報告では、IPC 装置の条件は、溶離液流量 0.4 mL/min, ルミノール溶液流量 0.2 mL/min, 試料注入量は 0.1~1 μ L, 紫外線照射時間は約 1 秒 (内径 0.15 mm, 外径 1/32 inch FEP チューブ 40 cm) とした。

2.4 IPC カラムの準備

IPC カラムは Nagashima らの手法^[7]を基におこなった。多孔質グラファイトカーボンカラム (Hypercarb, 内径 2.1 mm, 長さ 30 mm, 粒子径 3 μ m, およびガードカラム 10 mm) を Mill-Q 水, 100%アセトニトリル, Mill-Q 水で順次 0.4 mL/min で 2 時間以上送液し、カラムを洗浄した後、0.5 mM または 5 mM の CTAC⁺を含む 25%アセトニトリル水溶液を送液し、カラムを CTAC⁺でコーティングした。その後、Mill-Q 水を 0.4 mL/min で 2 時間以上送液し、硝酸イオン, 亜硝酸イオンの分離カラムとして用いた。

調整したカラムの評価 (分離条件の検討) は、220 nm に吸収波長をセットした HPLC-UV 検出装置 (島津製作所) を利用して実施した。

2.5 鹿児島湾での試料採取と処理

鹿児島湾での海水試料採取は、鹿児島大学水産学部実習船南星丸により 2 ヶ月毎に実施した。海底熱水噴気孔がある湾奥 (若尊カルデラ) を St. 2 とし、天降川の河川水が流れ込む地点を St. 9N, St. 2 と同程度の深度 (200 m) を有する湾中央部を St. 12 とした (Fig. 2)。表層はバケツ, 50, 100, 150, 180, 200 m の各深度は CTD 採水器により採取した。採取された海水試料は 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に採取し、直ちに船内の冷凍庫で冷凍して保存した。測定前日に冷蔵庫で解凍し、ろ過等を行わず、そのまま 1.5 mL のオートサンプラーバイアルに入れ測定に用いた。(本報告では 2022 年に採取した試料についてのみ報告する。2023 年度試料は採取し、冷凍保存済み)

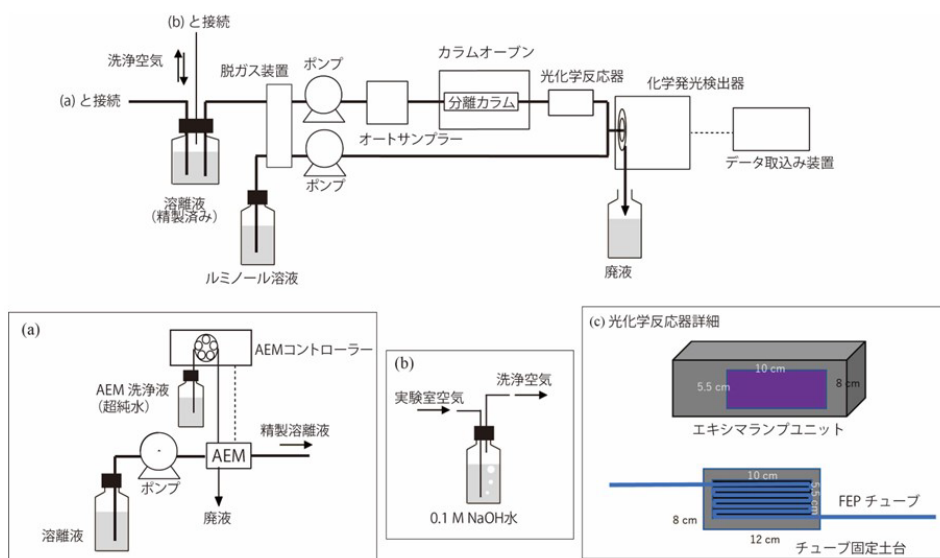


Fig. 1 IC および IPC-PR-CL 装置の概略図

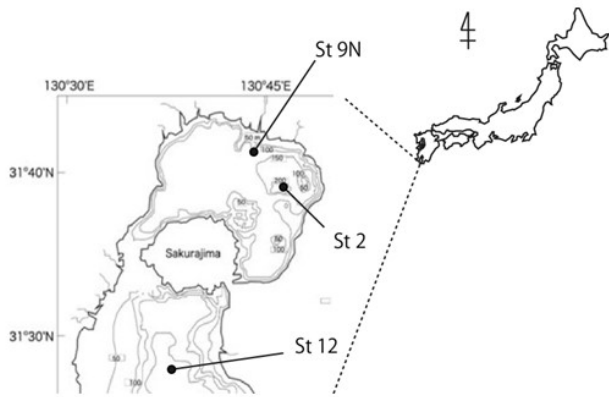


Fig. 2 鹿児島湾試料採取地点
 St. 2: 若尊カルデラ熱水噴気孔直上
 St. 9N: 天降川河口
 St. 12: 湾中央部 (St. 2 の対照地点)

3. 研究結果

3.1 IPC カラムの分離挙動

PR-CL 法の利用には、pH 10 以上の塩基性水溶液条件下での紫外線照射が必要となる。特に硝酸イオン・亜硝酸イオンの測定の際には、溶離液調製時に大気から混入した物質 (主に硝酸イオンと考えられる) により、バックグラウンドでの発光 (溶離液とルミノールによる発光、以下 BG) が生じ、検出感度を低減させることが明らかになっている。そこで溶離液に NaOH 水溶液を用い、AEM をオンラインで通過させることで溶離液を精製した後、送液するシステムを採用していた。しかし、これらの結果、分離条件と PR-CL 条件を NaOH の濃度のみでコントロールする必要が生じた。また、大部分の IC カラムは pH 12 までが利用範囲となっており、カラムの選択が大きく制限される状況であった。

以上のことから、本実験では化学的・物理的に安定なグラファイトカーボンを基材とする逆相カラムに、イオンペア剤として CTAC⁺を保持させたカラムにより、分離条件の検討を行った。このカラムの利用により、溶離液 pH 0~14 まで可、カラム温度 100°C 以上も可、イオンペア剤種・濃度、添加する有機溶媒種・濃度で分離を調整することができる。

Fig. 3(a)に 0.5 mM の CTAC⁺をコーティングした際の分離挙動を示す。NaOH の濃度が高くなると、亜硝酸イオンと硝酸イオンの保持時間は短くなった。またカラム温度は高くなるほど、流量は早くなるほど保持時間は短くなった (**Fig. 3(c)**)。また特に流量は 1.2 mL/min とした際、測定時間は 1 分以内となり、非常に迅速な分離が達成できた (**Fig. 3(b)**)。しかし、カラムにかかる圧力は 34.5 MPa となり、高压対応の装置でなければ利用できない条件であった。また 0.5 mM の CTAC⁺のコーティングに比べ 5 mM をコーティングした際は、保持時間は長くなり、50 mM NaOH 条件において、亜硝酸イオンは 0.8 min から 2 min、硝酸イオンは 2 min から 6 min となった (**Fig. 3(d)**)。以上の実験結果から、分離条件は 0.5 mM CTAC⁺、カラム温度 40°C、流量 0.4 ml/min として、海水試料測定に利用可能か検討を進めた。

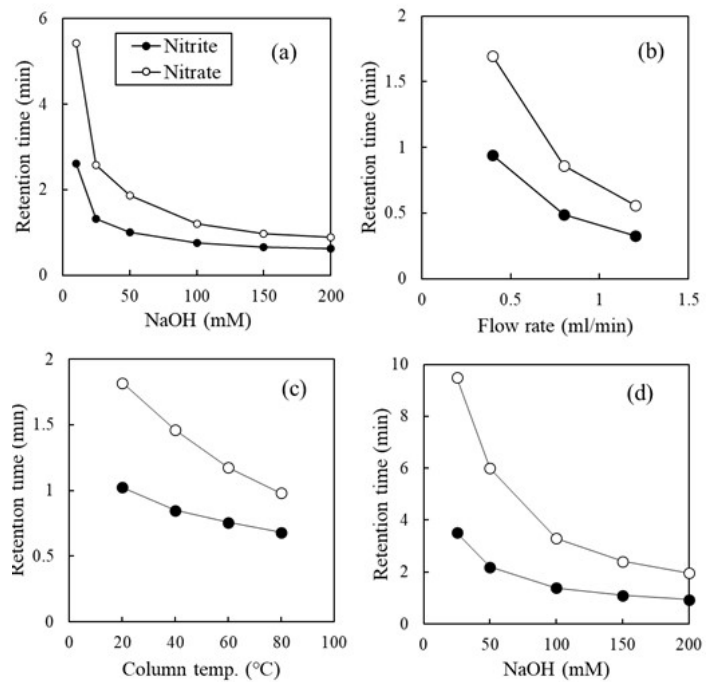


Fig. 3 IPC カラムによる分離挙動

- (a) NaOH 濃度と保持時間 (0.5 mM CATC, 40°C, 0.4 ml/min)
- (b) 溶離液流量と保持時間 (0.5 mM CATC, 40°C, 50 mM NaOH)
- (c) カラムオープン温度と保持時間 (0.5 mM CATC, 50 mM NaOH, 0.4 ml/min)
- (d) 5 mM CATC 時の保持挙動 (条件は(a)と同じ)

3. 2 光化学反応器の検討

IC-PR-CL 装置では、1 mL/min の流量で約 2.4 秒の紫外線照射を行うため、20 cm の長さの FEP チューブ (内径 0.5 mm x 外径 1/16 inch) を利用していた⁶⁾。しかし、セミマイクロ化された IPC-PR-CL 装置では、流路の内径を出来るだけ細くする必要がある。そこで、まず内径 0.15 mm 外径 1/32 inch の FEP チューブを利用し、紫外線照射時間を検討した。

結果を Fig. 4 に示す。流量 0.4 mL/min では内径 0.15 mm のチューブ 10 cm あたり約 0.26 秒の紫外線照射時間となる。80 cm のチューブで約 2.1 秒となり、IC-PR-CL とほぼ同条件になるが、40 cm のチューブ長 (約 1.1 秒照射) で最大のピーク高さが得られた。両チューブの厚みは殆ど同じ約 0.3 mm であることから、内径の細いチューブを用いたことにより反応効率が向上したものと考えられる。今後、IC 装置において内径 0.5 mm から 0.15 mm のチューブに変更することで、最適照射時間が短縮された理由について確認を進める。

また 0.1 mm の FEP フィルムの 222 nm 透過率が 40% であったことから、FEP チューブに比べ紫外線透過効率の良い石英キャピラリー (内径 0.1 mm, 外径 0.325 mm, 長さ 10 cm) を用いることで、より短い照射時間で効率よい光化学反応が起こることを期待したが、本実験では効果は確認できなかった。以上のことから本研究では、内径 0.15 mm の FEP チューブ 40 cm を利用した。

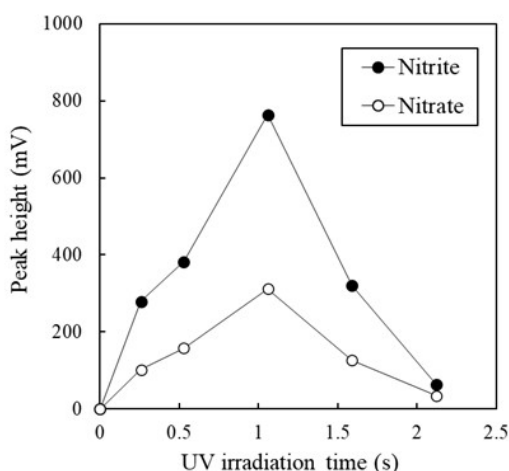


Fig. 4 紫外線照射時間と発光強度の関係
内径 0.01 mm FEP チューブ (80 cm),
溶離液流速 0.4 mL/min,
試料 1 μ M 硝酸・亜硝酸イオン (5 μ L 注入)

3. 3 IPC 装置の評価

IC および IPC-PR-CL 装置によるクロマトグラムを Fig. 5 に示す。双方のピーク高さは同じであり、感度面では現時点では IPC による高感度化は達成できなかった。しかし、分析時間は 1/2 に、試薬消費量は 2/5 となり、より迅速で、低コスト条件になったとは言える。一方、BG の値が IC では約 20 mV に比べ IPC では約 80 mV と 4 倍高い結果となった。原因は確認できていないが、メタノールを含む溶離液により、イオンペア剤である CTAC⁺ が溶出し、光化学反応を受けて BG 値を上昇させている可能性がある。高い BG 値はノイズを大きくし、測定感度を下げることにつながるため、今後、高い BG の発生原因を特定し、除去する必要がある。

現時点の分離検出条件で、海水の認証標準物質 4 種を測定したところ、IC-PR-CL 装置では認証値とほぼ一致した値が得られるのにもかかわらず、IPC-PR-CL 装置を利用すると認証値の 7 割ほどの測定値となった。IC カラムでは内径 4.6 mm に対し 1 μ L の注入量であるが、IPC では内径 2.1 mm で同じ 1 μ L 注入であるため、海水のように多量にイオンを含む試料では 1 μ L の注入量が多いと考え、注入量を 0.1~1 μ L の間で変化させて認証値が得られるか確認を進めた。しかしながら、オートサンプラーの最小注入量である 0.1 μ L で注入しても認証値を得ることが出来なかった。PR-CL 部分はチューブの内径以外は同じ条件であることから、分離に何らかの問題があり、認証値を得られないものと考えられた。

また現在、IC および IPC を問わず装置が非常に複雑な構成となっている (主に溶離液を調製する際に混入してしまう硝酸イオンを除くための装置)。しかし、これについては超純水製造装置と直結し KOH 溶離液を電解生成させる市販システムを導入すれば、非常に簡易なものとなることを記載しておく。

3. 4 鹿児島湾海水の硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度

IC-PR-CL 装置による鹿児島湾海水の測定を進めた。2022 年 2 月~2022 年 10 月の測定結果を Fig. 6 に示す (ただし、10 月は採取海水試料を 1 ヶ月ほど冷蔵保存していた取り扱いミスがあり、参考値とする)。亜硝酸イオンについては、St. 2 の 150 m 以深で濃度が上昇する傾向が確認された。一方、同程度の深度を有する St. 12 では確認されないことから、熱水噴気活動の影響と考えている。一方、硝酸イオンについては、4 月の St. 9N の表層で最も高い濃度

が観測されたが、4月や7月では表層ほど濃度が低い結果が得られた。表層での濃度低下は植物プランクトンによる消費などと考えられ、4月や10月に見られる表層の濃度上昇は、河川からの流入と考えられる。

報告者らが海水試料を定期的に採取している元々の目的は、鹿児島湾海底熱水噴気活動より放出される水銀の挙動について知見を得るためである^[8]。海水中の水銀は、海水中でメチル水銀などに変換され、食物連鎖を通じ、生

物濃縮されるものと考えられている。しかし、海水中のメチル水銀の生成には不明な点が多く、さらなる研究が必要となっている。近年、*Nitrospina* 類似細菌がメチル水銀化に関与しているとの報告もあり^[9]、硝酸イオンや亜硝酸イオンの存在濃度を測定しておく必要が生じた。よって、今後も継続的に測定を進めていく予定である。

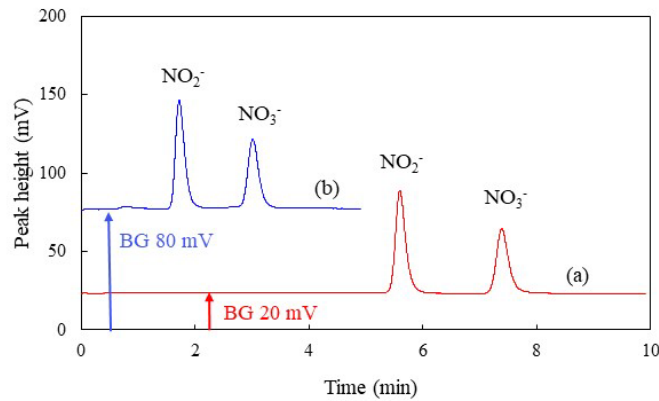


Fig. 5(a) IC および(b) IPC-PR-CL 装置によるクロマトグラム
試料 1 μM 硝酸・亜硝酸イオン (1 μL 注入)

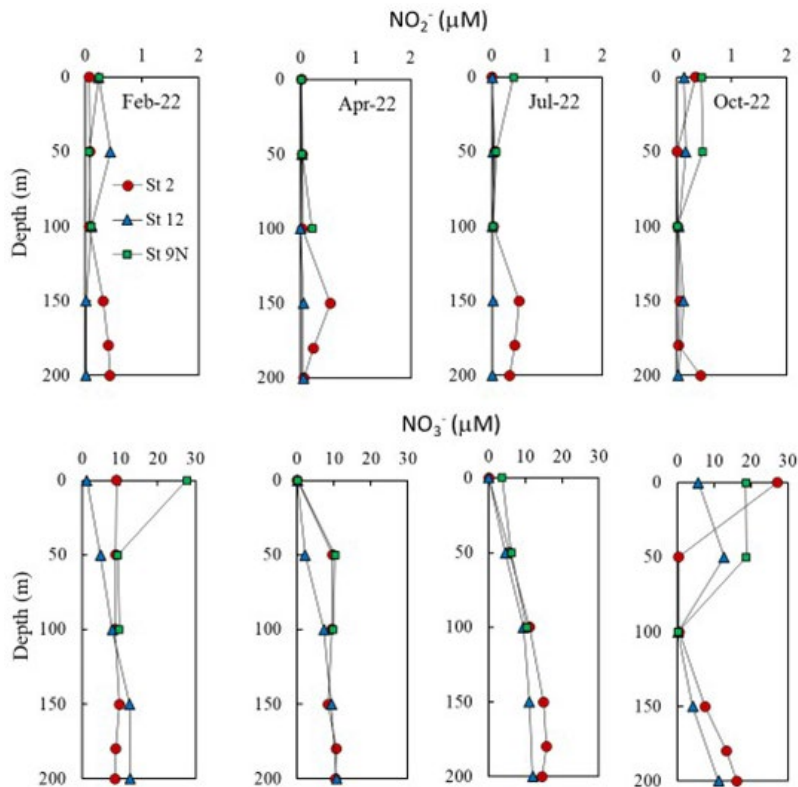


Fig. 6 鹿児島湾海水における亜硝酸・硝酸イオン濃度の鉛直分布の季節変動

4. 考察

IPC-PR-CL 装置によって、迅速に硝酸イオンと亜硝酸イオンを測定することが出来たが、海水試料においては何らかの妨害があり、正しい定量ができないことが明らかとなった。以前の研究報告において、塩化物イオンが光化学反応の際に共存していると、硝酸イオンや亜硝酸イオンからのペルオキシナイトライトの生成が抑制されることを確認している^[6]。よって本研究でも IPC 分離において、塩化物イオンとの分離が不完全で硝酸イオン、亜硝酸イオンの測定値が小さくなったものと考えられた。しかし、PR-CL 法では塩化物イオンを検出することが出来ないため、他の測定法でこれらイオンの分離を評価する必要がある。しかし、セミマイクロカラムに対応できる IC-電導度検出装置を有しておらず、本研究期間では塩化物イオンと亜硝酸イオン、硝酸イオンの分離を評価することが出来ず、定量値が低くなる原因の特定と、その問題解決には至らなかった。

5. 今後の課題

PR-CL 法が高感度で、大気中等にも存在する硝酸イオンを測定ターゲットとしているため、当初、超純水を試料としても出現するブランクピークの発生原因を特定するまでに非常に長時間を要した。一方、現在も数 nM のブランクピークが生じる状況であり、この原因特定が高感度化につながる。また海水の認証標準物質測定において、亜硝酸イオンおよび硝酸イオンとも認証値より低い値が出る状況となっている IC 分離の方では問題なく測定できるため、IPC 分離条件の再検討を今後行う必要がある。2024 年度にはセミマイクロ対応の IC-電導度検出装置を導入することが決定しているため、装置が稼働次第、塩化物イオン、亜硝酸イオン、硝酸イオンの分離を確認しつつ、カラムの分離能力を向上させるために分離条件の再検討を進めていく予定である。

また光化学反応器については、予備的な検討ではあるが石英キャピラリーによる光化学反応器の高効率化は達成できなかった。紫外線が透過するようにポリイミドの被膜をはがして利用する必要があるが、容易に折れてしまい取り扱いが難しい問題があり、UV 透過率は落ちるが、UV 透過被膜のついた石英キャピラリーを利用するなどして、石英キャピラリーでの光化学反応について実験を進める。また今回、化学発光検出セルの最適化は出来なかったが、2 重管構造の検出セル部を考案しており、その実装と評価を行っていく予定である。

6. 文献

- [1] J.-Z. Zhang, P.B. Ortner, Charles J. Fischer, US EPA Method 353.4: Determination of Nitrate and Nitrite in Estuarine and Coastal Waters by Gas Segmented Continuous Flow Colorimetric Analysis, 1997.
- [2] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, A. Amponsaa-Karikari, N. Kishikawa, N. Kuroda, T. Tomiyasu, Y. Komatsu, Highly sensitive method for determination of N-nitrosamines using high-performance liquid chromatography with online UV irradiation and luminol chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.025>.
- [3] H. Kodamatani, S.L. Roback, M.H. Plumlee, K.P. Ishida, H. Masunaga, N. Maruyama, T. Fujioka, An inline ion-exchange system in a chemiluminescence-based analyzer for direct analysis of N-nitrosamines in treated wastewater, *J. Chromatogr. A.* 1553 (2018) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.030>.
- [4] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, Y. Komatsu, T. Tomiyasu, Rapid method for simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples using short-column ion-pair chromatographic separation, photochemical reaction, and chemiluminescence detection., *Anal. Sci.* 27 (2011) 187–92. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.187>.
- [5] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, T. Tomiyasu, Y. Komatsu, Selective determination method for measurement of nitrite and nitrate in water samples using high-performance liquid chromatography with post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.096>.
- [6] H. Kodamatani, S. Kubo, A. Takeuchi, R. Kanzaki, T. Tomiyasu, Sensitive Detection of Nitrite and Nitrate in Seawater by 222 nm UV-Irradiated Photochemical Conversion to Peroxynitrite and Ion Chromatography-Luminol Chemiluminescence System, *Environ. Sci. Technol.* (2023). <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00273>.
- [7] H. Nagashima, T. Okamoto, Determination of inorganic anions by ion chromatography using a graphitized carbon column dynamically coated with cetyltrimethylammonium ions, *J. Chromatogr. A.* 855 (1999) 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00654-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00654-8).
- [8] T. Tomiyasu, T. Minato, W.L.G. Ruiz, H. Kodamatani, Y. Kono, M. Hidaka, K. Oki, R. Kanzaki, Y. Taniguchi, A. Matsuyama, Influence of submarine fumaroles on the seasonal changes in mercury species in the waters of Kagoshima Bay, Japan, *Mar. Chem.* 177 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.10.009>.
- [9] Y. Tada, K. Marumoto, A. Takeuchi, Nitrospina-like Bacteria Are Dominant Potential Mercury Methylators in Both the Oyashio and Kuroshio Regions of the Western North Pacific, *Microbiol. Spectr.* 9 (2021). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00833-21>.

A Rapid and Sensitive Method for Nitrite and Nitrate Analysis in Seawater Using Ion-Pair Chromatography with On-Line Photochemical Reaction and Chemiluminescence Detection

Hitoshi Kodamatani, Takashi Tomiyasu

Kagoshima University

Summary

Rapid and Sensitive determination of nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) ions in seawater is essential to understand the nitrogen cycle and for environmental protection in the ocean. Recently, we reported a determination method that combines conventional ion-chromatographic (IC) separation of NO_2^- and NO_3^- , on-line photochemical conversion of these ions to peroxyxynitrite (ONOO^-) by irradiation with a 222-nm excimer lamp, and chemiluminescence from the reaction between luminol and ONOO^- . Furthermore, by using a sample volume as small as 1 μL , the method was applied to measure NO_2^- and NO_3^- concentrations at sub- μM level in seawater samples. However, the method only combines the existing IC separation with a new detection method and does not optimize the separation.

The objective of this study was to maximize the performance of the detection method for NO_2^- and NO_3^- using a separation method suitable for on-line photochemical conversion and chemiluminescence detection with luminol. The separation of NO_2^- and NO_3^- was achieved within 3 min using a graphitized carbon column (3 μm , 2.1 x 30 mm) coated with cetyltrimethylammonium ion. As a result, the analysis time was reduced to about 1/3 and the reagent consumption to 2/5 compared with the previous IC separation, although the measurement sensitivity remained the same. However, the new separation method could not apply to measurement of seawater samples. The reason for this is not yet clear, but we suspect it is due to incomplete separation from chloride ions. Therefore, NO_2^- and NO_3^- concentration-depth profiles of seawater samples collected in Kagoshima Bay this report were obtained by the IC separation method. In the future, we plan to achieve the measurement of seawater from Kagoshima Bay in the new rapid measurement method by improving the separation.