

ノ ー ト

イオンクロマトグラフィーを利用した
植物体内に含まれる $^{15}\text{NO}_3^-$ の
 ^{15}N 濃度の測定

大 山 卓 爾*

キーワード 硝酸, 植物, イオンクロマトグラ
フィー, ^{15}N , 発光分光法

これまで ^{15}N を用いたトレーサー実験において, 植物体内に含まれる硝酸態窒素の ^{15}N 濃度の測定はマイクロ通気蒸留法¹⁾ により行われている. この方法は, アンモニア, アミド, 亜硝酸および硝酸態窒素を条件を変えて分別蒸留することにより, それぞれの形態の ^{15}N 測定が可能である. 硝酸画分の蒸留には, 試料内のアンモニア, アミドおよび亜硝酸態窒素を留去した後に, 強アルカリ, 100°C の条件下で試料に硫酸第一鉄と硫酸銀を添加することにより, 硝酸をアンモニアに還元して通気蒸留により吸収剤に捕捉する. 本法は硝酸の ^{15}N 濃度の測定に有力な方法であるが, 分別蒸留法の持つ欠点として, 試料内に強アルカリ条件下で徐々にアンモニアを放出する成分や還元物質を含む場合に, アミド, 亜硝酸, 硝酸の分別が不完全となり, クロスコンタミネーションを起こす可能性が示唆されている²⁾.

ところで, 近年イオンクロマトグラフィー (IC) 分析法の発達により, これまで比較的解析の困難であった希薄溶液中の硝酸等のアニオンの分析が容易に行えるようになり, 土壤溶液²⁾ や植物の篩管液³⁾ の分析に適用されている. 筆者は, 植物体中の硝酸を IC で単離し, NO_3^- ピーク溶出部を分取してコンウェイユニットを用いて還元蒸留する方法により, 試料中の硝酸の ^{15}N 濃度をより正確に測定することが可能であろうと考え分析法の検討を行った.

1. 実験方法

1) IC 分析装置および分析条件

カラム, WESCAN アニオンカラム; 検出器, WESCAN 電導率検出器 213A 型; ポンプおよびインジェクター, 日本分光 BIP-1 型.

溶離液, 4mM フタル酸; 2 ml/分 (溶離液作製用の水は, ヤマトオートスチル All Glass Model WR-32 を

用いて調製し, 試薬は特級を使用した.)

2) 分析方法

植物試料 (乾物重 0.2~1g 程度) を約 50 ml の 80% エタノールで抽出した後, ロータリーエバポレーターで減圧乾固し, 数 ml の水に溶解する. イオン交換樹脂 Dowex-50 (H⁺型) カラムに注入後水洗し, カラム非吸着画分を 10 ml に定容する. その一部 (10~100 μl) を IC で分析し, 試料中の硝酸濃度を測定する. 試料中に硝酸が比較的少量に含まれている場合には, 残りの試料を 1 ml 程度に濃縮して, 窒素として 50 μg 程度の硝酸を含む容量を取り IC に注入する. 溶出した NO_3^- のピーク画分約 2~4 ml を分取し, コンウェイユニットの外室に入れ, 内室には 0.05 N 塩酸 0.5 ml を入れる. 外室にデバルタ合金約 50 mg と酸化マグネシウム約 100 mg を加えて, 密閉した後よく混合し, 30°C の恒温器内に二, 三日静置して硝酸の還元と蒸留を行う. 生成したアンモニアを含む内室中の塩酸吸収剤約 50 μl を一方を封じた外径 4 mm, 長さ 15cm のパイレックスガラス管内に注入し, 減圧乾燥後常法に従い ^{15}N 分析用放電管を作製して発光分光法により ^{15}N 濃度を測定する⁴⁾.

試料中の硝酸含有量が少なく, 分取に際し硝酸ピークの検出が塩素ピークに妨害される場合には, 硝酸のピークを確認しながら分取することが困難となるため, 以下のように試料中の塩素を除去してから硝酸の分取を行うと良い. カチオンを除去した試料に 10mM 硫酸銀溶液 2~5 ml を添加し, 生じた塩化銀の沈澱をろ別する. ろ液に 10mM 水酸化バリウム溶液を硫酸銀溶液と等容添加し, 生じた硫酸バリウムを沈澱ろ過する. 全量を約 5 ml に減圧濃縮後, 再度 Dowex-50 カラムに掛け, 非吸着画分を濃縮して IC で硝酸の分取を行う.

2. 結果および考察

1) 溶離条件の検討

試料中硝酸の溶離条件は, 他のイオンピークとの分離が良いこと, 亜硝酸との干渉がないことを指標に検討を加えた. 本装置では, 一般的なアニオンの分析には 4 mM フタル酸カリ (pH 4.5) が適しているが, この溶離液では硝酸と亜硝酸のピークが隣接しているため (第 1 表), 両者を含む試料ではクロスコンタミネーションを生ずる恐れがあり, 分取もしにくい. そこで溶離液の pH を変えて硝酸, 亜硝酸ピークの保持時間を測定したところ, pH が下がると両ピーク位置が離れ, 第 1 図に示すように 4 mM フタル酸を溶離液として用いると両者のピークの分離は最良であった. 同時にこの条件は, 他のアニオンピークとの分離も良く, 硝酸ピークの分取をしやすい. また硝酸のピーク面積と IC への注入量と

* 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2 の町 8050)

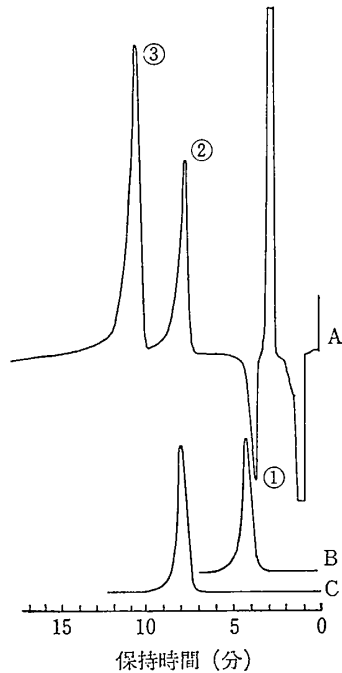
昭和 61 年 2 月 17 日受理

日本土壤肥科学雑誌 第 57 巻 第 5 号 p. 503~505 (1986)

第1表 IC による硝酸ピークの溶離条件の検討

溶離液	(pH)	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
フタル酸カリ	4.5	2.0	3.6	4.0
フタル酸カリ	4.0	3.9	4.4	5.1
フタル酸	2.65	7.8	3.8	10.3

数値は各イオンの保持時間(分)を表す。



第1図 4mM フタル酸溶離液を用いたイオンクロマトグラム

Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻ 各 1000 ppm を含む標準試料 10 μ l を注入した。チャート A は電気伝導度を表し, ①, ②, ③ はそれぞれ, 亜硝酸, 塩素, 硝酸のピークを示す。溶離液を 10 秒毎に分取し, 亜硝酸は, スルファニル酸と 1-ナフチルアミンを用いたジアゾカップリング法で(B), 塩素は塩化銀の濁度を測定して(C), ピークの確認を行った。電気伝導度のピークと溶出ピークとは約 40 秒のずれがあるため, 硝酸の分取はピーク検出 40 秒後に開始することとした。

は直線関係があり, フタル酸溶離液を用いて硝酸の定量も可能である。

2) 窒素の汚染に関する検討

発光分光法による ¹⁵N 濃度の測定では, 窒素の汚染の影響が大きいと正確な値が得られない。そこで, 本法分析操作中の窒素の汚染について調べた。

はじめに, IC 分取時の汚染の検討を行った。第2表(1)に示すようにコンウェイユニットの外室に, 水, 調製直後の 4mM フタル酸溶離液, IC から採取した溶離液各 3 ml を入れ, ¹⁵N 標識硝酸ナトリウム (1000 ppm-N)

第2表 分析操作中の汚染の検討

(1) IC による硝酸の分取時の汚染の有無

	水	調製直後のフタル酸溶離液	IC から溶出したフタル酸溶離液
¹⁵ N 濃度	27.95 \pm 0.25	28.09 \pm 0.13	27.83 \pm 0.27

(2) 還元蒸留試薬からの汚染の有無

	MgO 20mg デバルタ合金 50mg	20mg 200mg	60mg 50mg
¹⁵ N 濃度	28.60 \pm 0.37	28.46 \pm 0.67	28.75 \pm 0.40

(3) 分析試料量の影響

試料の量	50	20	10 μ g-N
¹⁵ N 濃度	28.60 \pm 0.37	27.19 \pm 0.96	26.95 \pm 0.44

標準 ¹⁵N 標識硝酸は ¹⁵N 濃度 29.4 atom% のものを用いた。(1), (2) は 50 μ g-N ¹⁵NO₃⁻ をコンウェイユニットの外室に添加した。数値は atom% を示す。

50 μ l (50 μ g-N) を添加し, 還元蒸留後 ¹⁵N 濃度を測定した。三者の ¹⁵N 濃度に差がないことから, IC による硝酸の分取に際しては汚染の影響はないと考えられる。

次に, 還元蒸留試薬からの汚染を調べた。第2表(2)は, 水 1 ml に ¹⁵NO₃⁻ (50 μ g-N) を添加した試料におのおの酸化マグネシウム (MgO) とデバルタ合金の量を変えてコンウェイユニット内で還元蒸留を行い ¹⁵N 濃度を測定した結果である。MgO, デバルタ合金の量によらず ¹⁵N 濃度はほぼ一定であり, 両試薬からの汚染も無視しうる。なお, MgO は, CO₂ を追い出すため電気炉で 900 $^{\circ}$ C, 3 時間加熱後密栓保存して用いるが, この操作は窒素の汚染除去効果もあると思われる。

第2表(3)には, コンウェイユニット外室に水 1 ml と ¹⁵NO₃⁻ 溶液 50, 20, 10 μ l を添加した試料を入れ, 還元蒸留後 ¹⁵N 濃度を測定した結果を示す。ここで, 試料窒素量が減少するにつれて測定値は低下した。MgO, デバルタ試薬には汚染がなかったことから, ¹⁵N 濃度の低下は使用した水によるものと思われる。水の汚染は避けたいことが報告されている⁵⁾ が, ここでは水 1 ml あたり約 1 μ g-N の汚染があったと考えられる。試料硝酸含有量が, 50 μ g 程度以上あれば, 水からの汚染による ¹⁵N 濃度の低下はさほど深刻ではないが, 数 μ g-N の試料ではより高純度の水を使用するか, 標準 ¹⁵N 試薬を用いて補正する必要があるだろう。伊藤らは蒸留水中に 0.1 μ g-N/ml の窒素が含まれていたことを報告していることから, より高純度の水を用いて溶離液を作製すれば水由来の汚染の影響は改善できるとと思われる。

3) 植物試料中の硝酸の ¹⁵N 濃度の測定例

はじめに, 分取した硝酸ピークの純度を確認するため

第3表 IC法およびマイクロ通気蒸留法によるダイズ植物各器官中の硝酸の ^{15}N 濃度の測定値の比較

	根	葉	茎
IC法	23.5	11.81	14.01
マイクロ通気蒸留法	22.2	3.35	2.93

培地濃度 10 ppm-N の ^{15}N 標識硝酸 (30 atom%) を含む水耕液で 10 時間栽培した直後のダイズ各器官の硝酸の ^{15}N 濃度 (atom%) を示す。葉と茎は硝酸含有量が少ないため塩素イオンを除去して硝酸を分取した。

にダイズの根の抽出液中の硝酸を IC で分取し、その含有量を、IC法およびコンウェイ法で測定したところ、IC法では $17.9 \pm 0.4 \mu\text{g}$ 、コンウェイ法では $17.9 \pm 0.8 \mu\text{g}$ と両者は等しかった。この結果は、本法で測定した硝酸画分にはダイズ他成分からの汚染がないことを示している。

^{15}N 標識硝酸を吸収させたダイズの各器官の硝酸の ^{15}N 濃度を、本法とマイクロ通気蒸留法で測定した結果を第3表に示す。このとき、乾物 1g あたりの硝酸態窒素含有量は、それぞれ、根 462、葉 30、茎 $21 \mu\text{g}$ であった。硝酸含有量の多い根では両方法による ^{15}N 濃度の測定値はほぼ同じであったが、硝酸含有量の少ない葉と茎では大きな差が認められ、いずれも本法のほうが高い値を示した。マイクロ通気蒸留法では、強アルカリ、還元、

高温条件により硝酸以外の体内成分 (おそらくウレイド、ペプチド等) が一部分解を受けて ^{15}N 濃度の低いアンモニアを放出し、硝酸画分の ^{15}N 濃度を低下させたと思われる。硝酸以外の成分による汚染の影響は、硝酸含有量が少ない場合に著しく、硝酸含有量の高い根では測定値に重大な影響を及ぼさないですんだものと思われる。以上の結果から、植物体内の硝酸の ^{15}N 濃度を厳密に測定する必要がある場合や、微量にしか硝酸を含まない試料の場合には、本法は有効であると考えられる。

文 献

- 1) 有馬泰紘：マイクロ通気蒸留法によるアンモニア態、アミド態、亜硝酸態、硝酸態各窒素の分別定量と ^{15}N 濃度測定への利用、土肥誌, **49**, 304~308 (1978)
- 2) 波多野隆介・佐久間敏雄：イオンクロマトグラフィーの土壤溶液分析への適用、土肥誌, **54**, 161~163 (1983)
- 3) HAYASHI, H. and CHINO, M.: Nitrate and Other Anions in the Rice Phloem Sap, *Plant Cell Physiol.*, **26**, 325~330 (1985)
- 4) 大山卓爾：発光分光法による ^{15}N アミノ酸の分析, *Radioisotopes*, **31**, 212~221 (1982)
- 5) 伊藤 治, 米山忠克, 秋山陽子, 熊沢喜久雄：薄層クロマトグラフィーにより分離されたアミノ酸およびアミドの発光分光法による窒素濃度測定の後討, 同上, **25**, 448~453 (1976)