

全自動型全窒素重窒素同時測定装置によるダイズ作物体中のN,15N分析

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan |
| ISSN | 00290610 |
| 著者 | 山県, 真人 金森, 哲夫 |
| 巻/号 | 59巻3号 |
| 掲載ページ | p. 308-311 |
| 発行年月 | 1988年6月 |

ノ ー ト

全自動型全窒素重窒素同時測定装置による
ダイズ作物体中の N, ^{15}N 分析

山県真人*・金森哲夫**

キーワード 全窒素, 重窒素, ^{15}N , 全自動測定,
発光分光分析法

1. 緒言

従来, 作物体中の ^{15}N 分析は, 試料ごとに作製した放電管を発光分光法^{1,2)} で測定する方法が広く用いられてきた(以下, 封入法とよぶ). この場合, ノイズの少ない放電管を作ることが重要であり, ささまざまな方法¹⁻⁵⁾ が開発されているが, いずれも多くは操作と熟練を要する. また, N 濃度の測定をこれとは別に行う必要がある.

近年, ^{15}N 分析における N_2 ガス化過程を自動化し, N 濃度と ^{15}N 濃度の連続測定が可能な全自動型全窒素重窒素同時測定装置 (AN-150 型, 日本分光(株)) が開発された⁶⁻⁸⁾ (以下, 燃焼法とよぶ).

この装置によりダイズ(アキシロメ)作物体の N, ^{15}N 分析を行い, 燃焼方法に改良すべき点, また根や茎など N 濃度の低い試料について ^{15}N 濃度測定の際の補正方法および $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ 波長バンド内にみられる未知ピークについて検討したので報告する.

2. 方法

1) 装置

標準的なプロセスを第 1 図に示した. 燃焼管内に落下した試料はヘリウムキャリア (100 ml/min) 中で無酸素条件下で熱分解, 気化され, その下部に充填された酸化剤により酸化され, 各吸収管により精製された N_2 がガスクロマトグラフにより定量され, その一部が 10 mmHg 程度の減圧下でフロー放電管に導かれて ^{15}N 濃度の測定が行われる. 試料燃焼後にキャリアはバイパスヘリウム

経路に切り替えられ, 酸化銅が酸素により再生される.

2) 全窒素の測定

予備実験の結果から, ガンニング変法による N 濃度測定値 6.08% の子実 13 mg (乾物重, 以下同じ) では $6.08 \pm 0.19\%$, 33 mg では $5.51 \pm 0.28\%$, N 濃度 3.64% の葉身 24 mg では $3.31 \pm 0.07\%$, 34 mg では $3.12 \pm 0.07\%$ (いずれも繰り返し 5 回) と測定され, また石英カップ中の炭化した残渣をガンニング変法により分析したところ, 窒素が残留していたことから試料の熱分解物を酸化剤で酸化する方法では試料量が多くなるほど燃焼が完全に行われないことがわかった. そこで, 試料落下と同時にヘリウムキャリア中に酸素を供給することにより酸素存在下で試料そのものを燃焼させる方法を検討した.

試料量と酸素の流量および供給時間による N 濃度測定値への影響を把握するため, $\text{L}_{27}(3^{13})$ 配置試験⁹⁾ を行った. 各要因とも 3 水準で酸素流量 0, 50, 100 ml/min, 試料量 20, 30, 40 mg, 酸素供給時間 10, 20, 30 s とした. 次に, 酸素流量と供給時間を変えて測定を行い完全燃焼のための条件をしばらくこんだ. 試料は子実肥大後期の葉身で, ガンニング変法による N 濃度は, 繰り返し数 $n=5$, 平均 $\bar{x}=3.64\%$, $\sigma_{n-1}=0.05\%$, $\text{CV}=1.4\%$ であった. これを N で 1000~2000 μg 程度供試した. N 標準試料は CN コーダー用馬尿酸 (N 7.82%) 粉末を用いた. また, 葉身以外のダイズ各器官についても検討した.

完全燃焼したかどうかは試料分析後の次の燃焼サイクルで試料なしに酸素を流したときの N_2 残存ピークの存否で判断した. 過剰の酸素は還元管に吸収させ, 飽和に達した還元管は手で水を流し込んで還元を行った. 試料燃焼中に酸素を供給しているため燃焼後の酸化剤の再生は行わなかった.

3) 重窒素濃度の測定

^{15}N 標準試料として 0.363, 0.996, 2.06, 3.01, 4.05, 5.09 atom% の ^{15}N 標識硫酸アンモニウムを N として 200~3000 μg 供試して窒素量と ^{15}N 測定値の関係をしらべ, これにより ^{15}N 硫酸アンモニウムを施用した子実肥大期のダイズ葉身の ^{15}N 濃度を測定した. 燃焼はいずれも酸素流量 25 ml/min, 供給時間 90 s の条件で行った.

未知ピークの特性を検討するため, 試料窒素量に対する分光スペクトルの推移をとり, さらに内径 2 mm のバイレックス管に N_2 , ヘリウム混合気体 (N₂ 濃度 5%) を 20 mmHg で封入した放電管を作製し, AN-150 および従来器 N-150 によるスペクトルをとった.

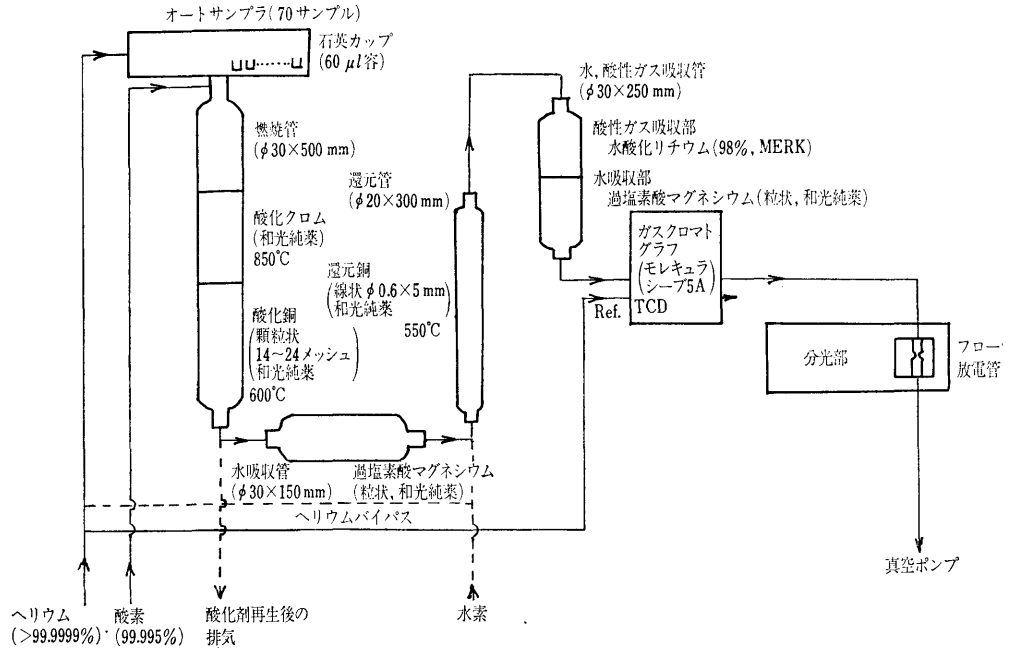
Makoto YAMAGATA and Tetsuo KANAMORI: Simultaneous Analysis of Total N Concentration and ^{15}N Abundance by Combination System of Gaschromatography and Emission Spectrometry

* 四国農業試験場 (現在, 農業研究センター 305 つくば市観音台 3-1-1)

** 同上 (765 善通寺市仙遊町 1-3-1)

昭和 62 年 11 月 16 日受理

日本土壌肥科学雑誌 第 59 巻 第 3 号 p. 308~311 (1988)



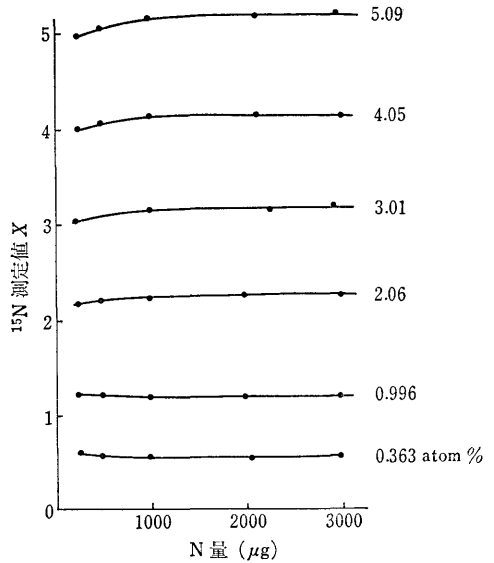
第1図 全自動型全窒素重窒素同時測定装置 (AN-150 型, 日本分光㈱) の主要構造およびガス流路の主要部分

3. 結果および考察

1) 全窒素の測定

分散分析の結果, N濃度測定値に影響のある要因は酸素流量 (1% 有意) と試料量 (5% 有意) であった。酸素流量, 供給時間のいろいろな組合せで実験を行った結果, 完全燃焼には, 酸素流量よりもまず酸素を 90 秒間供給する必要がある, 供給時間を短くすると流量を上げても完全燃焼しなかった。ダイズ葉身粉末 (30 mg) の場合, 酸素流量 25 ml/min, 供給時間 90 s の条件での測定値は, 繰り返し数 $n=5$, 平均 $x=3.59\%$, $\sigma_{n-1}=0.04$, $CV=1.1\%$ となり, ガンニング変法による値と一致した。酸素供給のタイミングは試料の落下直後でよく, 早くても燃焼程度は変わらず, おそいとガスクロの N_2 ピークが 2 本に割れた。その他の各器官の完全燃焼のための酸素流量は, 酸素供給時間を 90 s としたとき, 根粒 (30 mg), 根 (40 mg), 茎 (50 mg), 葉柄 (40 mg), 莢殻 (30 mg), 子実 (20 mg) の場合, それぞれ 25, 60, 70, 40, 30, 25 ml/min であった。

ダイズ試料の場合, 完全燃焼のための必要酸素流量の大小は燃焼そのものの難易よりも試料量の多寡によるところが大きいと思われる。すなわち, N濃度の低い茎や根は, N濃度の高い葉身や子実に比べ多量の試料を供試するので, 多量の酸素供給が必要となる。ただし, 供給した酸素がすべて燃焼に消費されるわけではなく, かな

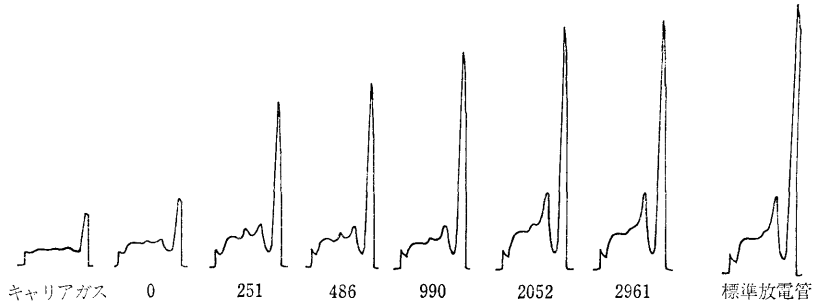


第2図 各種 ¹⁵N 濃度の標識硫酸アンモニウムの N量と ¹⁵N 測定値との関係

りの量の酸素が還元管に流れるので還元銅の再生頻度は多くなる。酸素流量 25 ml/min, 供給時間 90 s の条件ではほぼ 20 試料ごとに再生が必要であった。

2) 燃焼法による重窒素濃度測定値の補正方法

標準 ¹⁵N 標識硫酸アンモニウムの量を変えた実験で



第 3 図 燃焼法による各種の量の硫酸アンモニウム (0.363 atom%) と標準放電管 (0.363 atom%) の ¹⁵N スペクトル

スペクトルの下の数字は硫酸アンモニウムの N 量 (μg), キャリアガスとあるのは試料および酸素がないスタンバイの状態でのスペクトルである。

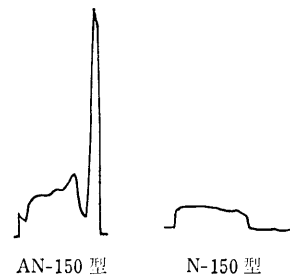
第 1 表 標準 ¹⁵N 標識硫酸アンモニウムの試料窒素量 N (μg) と ¹⁵N 測定値 X の近似式

| ¹⁵ N (atom%) | 近 似 式 | 定 数 | | | 残差平方和 |
|-------------------------|----------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | X ₁ | X ₂ | X ₃ | |
| 0.363 | $X = X_1 (1 + X_2 \exp(-X_3 N))$ | 0.5557 | 2.4539×10^{-1} | 3.3282×10^{-3} | 2.6146×10^{-4} |
| 0.996 | " | 1.1899 | 2.4523×10^{-2} | 1.5796×10^{-3} | 1.6837×10^{-4} |
| 2.06 | $X = X_1 (1 - X_2 \exp(-X_3 N))$ | 2.2607 | 4.9805×10^{-2} | 1.2727×10^{-3} | 2.6506×10^{-4} |
| 3.01 | " | 3.1810 | 6.5451×10^{-2} | 1.9736×10^{-3} | 9.0371×10^{-4} |
| 4.05 | " | 4.1595 | 6.8341×10^{-2} | 2.9076×10^{-3} | 2.8056×10^{-5} |
| 5.09 | " | 5.2200 | 7.1999×10^{-2} | 2.1086×10^{-3} | 6.1940×10^{-4} |

定数は非線型最小二乗法 (マルカール法¹⁰⁾) により求めた。

は、第 2 図に示したように、試料中の N 量が少ないと測定値 X ($X = 100 / (2I_{28} / I_{29} + 1)$, I_{28} , I_{29} : ¹⁴N¹⁴N, ¹⁴N¹⁵N ピークの強度) は ¹⁵N 濃度が低いところでは高めに、高いところでは低めに測定された。この原因は酸素またはヘリウム中の微量窒素による影響^{6,7)} であると同時に後述する未知ピークによる影響の可能性も考えられる。すなわち、¹⁴N¹⁵N のベースはこのバンド内の最低点をとるよう設定されているため、¹⁵N 濃度が低い試料では N 量が少ないと第 3 図のように ¹⁴N¹⁵N バンドのベースが低くとられて ¹⁵N 濃度が高めに測定され、逆の場合は混入窒素による影響のほうが大きくなり低めに測定されたのではないかと思われる。

N 量が増すと測定値 X は一定値に近づき N 1000 μg 以上では値はほとんど変わらなかった。したがって、N 1000 μg 以下では補正する必要がある^{6,7)} が、ここでは以下のようにして、試料 N 量が 200~3000 μg の範囲内で適用可能なプログラムをつかって ¹⁵N 濃度を求めた。すなわち試料中の N 量 500 μg, ¹⁵N 測定値 X = 1.50 であったならば、第 1 表に示した、第 2 図の各曲線の指数関数近似式 $X = X_1 (1 \pm X_2 \exp(-X_3 N))$ に N = 500 を代入して N 量が 500 μg のときの各 ¹⁵N 標準試料の測定値 X を求める。 ¹⁵N 濃度 0.363, 0.996, 2.06, 3.01, 4.05,



第 4 図 N₂, ヘリウム混合気体 (N₂ 濃度 5%) の AN-150 型と N-150 型によるスペクトル

N-150 型の場合は標準放電管 (0.363 atom%) のスペクトルがちょうどよい大きさ (¹⁴N¹⁴N ピークが 110mm) となったときのゲインでスペクトルを描かせた。AN-150 型は自動ゲインである。

5.09 atom% の標準試料でそれぞれ測定値 X = 0.582, 1.203, 2.201, 3.103, 4.093, 5.089 が得られる。これらの ¹⁵N 濃度値と測定値 X とから直線近似式 $X = 0.243 + 0.951^{15}N$ を求め、これに X = 1.50 を代入すると試料の ¹⁵N 濃度が 1.32 atom% と算出される。このようにしてダイズ葉身の ¹⁵N 濃度を測定すると、繰り返し 5 回で 1.74 ± 0.02 atom% となり、封入法による値 1.66 ± 0.08

atom% と一致した。

3) $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ バンド内の未知ピークの検討

燃焼法による発光スペクトルを第3図に示した。供試 N 量が少ないと $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ 波長領域のほぼ中央に、封入法ではみられない未知ピークが認められる。このピークは N 量が増すと $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ピークの肩に吸収された。標準放電管 (0.363 atom%) および N_2 、ヘリウム混合気体放電管のスペクトルも同様な形状を示した (第3, 4図) ことから、この未知ピークは燃焼法に特異なものではないと考えられる。また、この混合気体の放電管を従来器の N-150 型を用い、標準放電管のスキンスペクトルがちょうどよい大きさ ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ピークが 110 mm) となるようにゲインを調整してスペクトルをとると第4図のように、AN-150 型ではスペクトルが描かれるのに対して、ピークはほとんど描かれなかった。このことから、 N_2 量が少ないときの未知ピークは、封入法では発光しないような微量の N_2 がヘリウムの励起補助作用¹⁾により発光させられたものの、 N_2 そのものによる発光は非常に弱いためゲインの自動調整が行われる AN-150 型では大きなゲインがかかり、通常量の N_2 の場合にはみられないピークが現われるものと考えられた。

文 献

- 1) 三井進午・中根良平・吉川春寿・熊沢喜久雄：重窒素利用研究法，p.17～63，学会出版センター，東京（1980）
- 2) 福徳康雄・吉田端樹・池田元輝・山田芳雄：発光分光分析法による ^{15}N の簡易精密測定法および ^{15}N 測定放電管製作用真空装置の試作，土肥誌，58，222～225(1987)
- 3) 熊沢喜久雄：発光分光分析法による重窒素の定量法，ふんせき，9，603～612（1975）
- 4) KUMAZAWA, K.: Analysis of Heavy Nitrogen. *JARQ*, 20, 92～99 (1986)
- 5) YAMAMURO, S.: The Accurate Determination of Nitrogen-15 with an Emission Spectrometer. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 27, 405～419 (1981)
- 6) 有馬泰紘：全自動全窒素分析機排出微量 N_2 ガスの発光分光法による ^{15}N 濃度分析，肥料科学，3，133～146（1980）
- 7) 熊沢喜久雄・有馬泰紘・国分信彦・栗原耕一・白戸雄次：全自動全窒素重窒素同時分析装置の試作，第21回理工学における同位元素研究発表会要旨集，p.70，日本アイソトープ協会（1984）
- 8) 山本洋司・熊沢喜久雄：全窒素重窒素自動分析計の試作について，土肥要旨集，33，90（1987）
- 9) 石川 馨・藤森利美・久米 均：化学者および化学技術者のための実験計画法（下），p. 347～363，東京化学同人，東京（1967）
- 10) 刀根 薫：プレイマイコンシリーズ① BASIC，p. 137～146，培風館，東京（1982）