ナノモル栄養塩測定マニュアル

(Ver 1.0 武田研・江藤 2012/10/16)

(Ver 2.0 梅澤研2012/11/24)

必要な物品

デジタル時計（パソコンの時計と動機させる）、タイマー

ブランク海水の調整

N+Nフリー海水

1. 6～7L容量のボトル（1週間程度の航海の場合）を用意し、10%無リン洗剤に一日浸け、10回洗浄後、イオン交換水で4回洗浄。その後10%HClに1日浸けミリQで7回洗浄。
2. 亜熱帯海域の夏場表層水など、栄養塩の希薄な海水を入れて、暖かい日なたに放置して、植物プランクトンを増殖させる。
3. 植物プランクトンを沈降させて、上澄みだけ別容器に移す（もしくは、遠心分離や、濾過などに依っても良いが、コンタミを最小限にする）。

SRPフリー海水

1. 6～7L容量のボトル（1週間程度の航海の場合）を用意し、10%無リン洗剤に一日浸け、10回洗浄後、イオン交換水で4回洗浄。その後10%HClに1日浸けミリQで7回洗浄。
2. 500mlのNalgenボトル6本に、SRP濃度が100 M以下の亜熱帯海域の夏場表層水を400 mlほど入れる。
3. 1M NaOH水溶液を10ml（容量比40:1の割合）で加えて撹拌して10分後に（撹拌後、5分経ったら、再撹拌し5分間静置）、市川研の前の共同実験室にある遠心分離機（PA-8ローター）にて、1000 *g*にて1時間遠心分離を行う。（かかる重力は、ボトルの上部（Min）と下部（Max）で異なるので、中央部が1000*g*くらいになるように調整すると良い。）
4. 予め、450℃で6時間燃焼し、0.3M塩酸とミリQで洗浄したGF/Fフィルター（47mm）を用いて、1LのDuran瓶（酸処理済み）に濾過した後、NalgenのPCボトル（酸処理済み）に保存

シリカ フリー海水

6～7L

標準試薬の調整

1. 10 mMの標準液①を準備し、船には標準液②を持参。船で標準液③を作成して、②と③を船の冷蔵庫に保管し、④、⑤、⑥は用事調整する。
2. ①の標準液とミリQを用いて、500 Mの標準液②を作成する。（20倍希釈）

 （2.5 mlの標準液①を50mlのメスフラスコに入れて、ミリQでメスアップ）

1. ②の標準液とミリQを用いて、10 Mの標準液③を作成する。（50倍希釈）

 （1 mlの標準液②を50mlのメスフラスコに入れて、ミリQでメスアップ）

1. ③の標準液とブランク海水を用いて、1000 nMの標準液④を作成する(10倍希釈）。

　（10 mlの標準液③を100mlのメスフラスコに入れて、ブランク海水でメスアップ）

1. ③の 標準液とブランク海水を用いて、500 nMの標準液⑤を作成する。（20倍希釈）

　（5 mlの標準液③を100mlのメスフラスコに入れて、ブランク海水でメスアップ）

1. ③の 標準液とブランク海水を用いて、250 nMの標準液⑥を作成する。（40倍希釈）

　（2.5mlの標準液③を100mlのメスフラスコに入れて、ブランク海水でメスアップ）

1. ⑤の 標準液を用いて、50 nMの標準液⑤を作成する。（10倍希釈）

（10 mlの標準液④を100mlのメスフラスコに入れて、ブランク海水でメスアップ）

1. ⑤の 標準液を用いて、10 nMの標準液⑥を作成する。（50倍希釈）

（ 2 mlの標準液④を100mlのメスフラスコに入れて、ブランク海水でメスアップ）

＊現場の海水中栄養塩濃度に合わせて、Blank海水に加えて、3段階程度の標準海水を用意する。

＜システムのセットアップ＞

・Fiber Opitc A ⇒　光源

・Fiber Opitc B ⇒　USB

・光ファイバーは、触られないようにする（安全テープを張る）。

＜測定前の確認＞

・乗船中は、航走の4時間～3時間前に準備を始め、30分前に研究用海水をONにする。

・カドミカラムが閉まっているか確認し、プラテンをセットする。鉄粉のフタを外す。

・ミリQを新しいものに交換する。

・ランプにディフューザーが入っているか確認し、電源ONにし、時間を記録する。

　　(安定するまで時間がかかるので、0-100合わせまでに15分待機)

・前日にオートアナライザー洗浄していない場合、5ページの手順に従って、ライン洗浄と、LWCC洗浄を行う。（サンプル測定の場合）

・試薬、標準試料を作成するためのガラス器具等の準備はできているか確認する。

＜測定前の準備～測定＞

フィルターを外して、ポンプ始動（試薬ライン、サンプルライン共にミリＱ）

（時間記録（200～300時間で交換目安）。）

（空気を抜くため、約10～15分間）

（SRPのラインはコロイドが生じてフィルターが詰まるので、とりつけない）

※分析中も、デバブルの先に空気の泡が入ったら、臨機応変に取り外す。

↓

フィルターを付ける（**フィルター内部の空間にミリQを満たして、エアが入らないようにする**）

↓

PC上で、opwaveplus.exeを立ち上げる。

↓

パソコン0―100合わせ

※画面左のプロパティで、分光器が全て認識されていることを確認し、以下の作業を、全ての分光器に対して行う。分光器の切り替えは、左下のID番号で行う。分光器を認識しない場合は、再起動や、差し替えを試みる。6508がN+N、3049がSRP）

1) グラフのスペクトルピークが55000counts付近になるように、画面上の積分時間を調整する。

2) 平均回数を10に設定

3) EL Darkにチェック

4) ランプOFFにして10秒後に、ダーク保存（暗いランプマーク）を押して10秒待つ。その後、ランプONにして10秒後、レファレンス保存（明るいランプマーク）を押して10秒待つ。

↓

Aボタンを押して吸光度測定モードに切り替えて、ベースが0にあることを確認する。続いて、他の分光器についても、同様の設定を行う。

　※USB4000が熱を帯びてくると、吸光度表示も変化するため、再度、レファレンス保存を行って、ベースラインをゼロに合わせる。

↓

ソフトウェア画面左上の[MENU]を押し、連続計測（指定波長）を選択

1) enableと、計測モードの吸光度にチェックを入れる。

2) 保存周期10s、保存時間100h、保存回数は1、ウォームアップ 1s

　（自分が測定を止めたい時に止められないので、保存時間は、多めに測定時間（例：100 hour）を設定し、止めたい時に停止を押して止める方がオススメ）

3) 時刻記録方式は時刻、時刻フォーマットはミリ秒以外にチェックを入れる。

4) 各分光器の測定項目に応じて、それぞれの分光器シートのA～Eの波長シートに、測定項目に適した波長、色を指定する。（例：540の場合、一番近い539.942）



↓

保存ファイル名を、分光器シート毎に指定する（例20121118\_N+N）。

↓

全ての分光器について入力が終了後に、設定ボタンを押す。



↓

設定完了後、基本スペクトルの画面に戻り、停止アイコン－をクリックしてスペクトル測定を一時停止

↓

指定波長計測のアイコンをクリックすると計測開始（ウォームアップ画面が出ることを確認）

1) 時刻と緯度経度を記録

2) グラフィック＞指定波長連続測定＞縦軸表示範囲で、縦軸のプロパティ

　（吸光度は-0.1～+0.1程度を設定。標準試料分析開始後に、任意の値に再設定する）

3) グラフィック＞指定波長連続測定＞表示幅で、横軸のプロパティ

　　　（安定するまでは300s程度、安定して測定開始したら30000s程度）

↓

設定の小数点以下桁数を、6桁にチェックを入れる。

＜測定中＞

・サンプルラインにミリＱ、試薬ラインにミリＱを流して安定するまで待つ

(約1時間：⇒試薬の作成)

・サンプルラインにミリＱ、試薬ラインに各試薬を10分程流したら、廃液ボトルを重金属廃液用に変更し、カドミコイルを開ける（時計回りで開き、さらに時計回りに回し閉める）。

・5分程待って、塩化アンモニウム試薬ラインをコーティング液に変える(1分間)

※フィルターを外す

・1分間コーティング液を流し終わったら、塩化アンモニウム試薬に戻す

・コーティング液がラインから流れ出るまで待つ(約10-15分)

・フィルターをつないで、安定するまで待つ(約1時間：⇒標準試料の作成)

1) 各測定項目毎に標準液を濃度が低いほうから順番に流す(目安：1サンプル10-15分)

　　※異なる標準試料の間には、ブランク海水を通す必要はない

　　※ミリQ, Blank, 10, 50, 100, 500, 1000 nMの順番

2) 別のパソコンを利用して検量線を書き、問題がなければサンプル測定に移る。

※実験室で、狭口のボトル海水を測定する場合は、分岐コネクタを用いてシングル吸引を行う。

1）ポンプを止める。

2)　分岐コネクタに入れ替え（N+Nの試料吸引部のフィルタは、試料吸引用として活かす）

3)　再度、ミリQを流す。

4)　Airが入ったら、フィルターを外す。

※研究船で研究用海水を用いるときは、そのまま分岐したままでの吸引を行う。

1）ポンプを止める。

2)　吸引フィルタを、研究用海水に浸す（バブルのコンタミが少なくなるように配置する）。

3)　ポンプを稼働する。

4)　Airが入ったら、フィルターを外す。

3) サンプルを測ったら、分岐モードに戻して、最初と同様に標準液を流す

4) 最後にミリＱを流し安定したら、停止アイコン－を押して、パソコンを停止し測定終了

測定中の注意事項

* 光ファイバーケーブルには触れないようにする(ガードテープを張る)。
* 試薬の混入口から、空気の泡が入ってこないことを確認する。
* 光源ランプは離して設置する（or ファンを回す）。
* 試薬を流す前と後のベースラインの吸光度は記録しておく。
* 濃い試料の後はミリQで洗浄する。

＜測定終了後＞

・パソコン停止

・ランプOFF（時間を記録する）

・サンプルライン-ミリＱ、試薬ライン-試薬が流れている状態が10分以上続いたところでカドミカラムを閉める（カドミカラムには絶対に塩化アンモニウム溶液が入っているように！）

＜ライン洗浄＞

※航海前は、サンプルラインも、無リンアルカリ洗剤、次亜塩素酸、希塩酸で洗浄する。

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-ミリQ（10分間）

　↓（分析前の洗いの場合、10分間だけでもフィルターをつけてLWCCに流すと良い）

* 1. フィルターを外す

　↓

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-1/10希釈無リン洗剤(10分間)

　↓ (リンのラインのみ20分間で、N+Nラインは10分間)

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-ミリQ (15分間)

　↓

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-1/10希釈次亜塩素酸(20分間))

　↓

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-ミリQ (30分間))

 ↓

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-1/10希釈塩酸(10分間)

 ↓

* 1. サンプルライン-ミリQ、試薬ライン-ミリQ (20分間)　⇒電源OFF、プラテン外す。

 ↓（分析前の洗いの場合、ここでフィルターを再装着する）

* 1. （翌日以降使用しない時は）サンプルライン-空気、試薬ライン-空気）

※括弧してある次亜塩素酸の過程はリン測定のみ

※リンのラインは2倍の時間洗う（次亜塩素酸の過程はすでに2倍にしてある）

※洗浄に使うフィルターは、NaOHはDISMIC（セルロースアセテートフィルター）、塩酸はAnatop25、アセトン、メタノール、ミリQは、Millex（PTFEメンブレンフィルター）を使用する。

＜LWCC(50cm)洗浄＞

※シリンジを用いて以下の順番に洗浄液を流す

※N+NサンプルラインのインラインフィルターであるAnatop25は取り外す。

ミリＱ(3ml)→2M水酸化ナトリウム(2ml)→ミリＱ(3ml)→メタノール(2ml)

→ミリＱ(3ml)→2M塩酸(2ml)→ミリＱ(3ml)→アセトン(2ml)→ミリＱ(5ml)

※ライン洗浄の過程（④と⑥）と同時進行でやっても可

※リンのLWCC(100cm)は2倍量流す

＜終了後、チェック項目＞

・試薬ボトルの試薬、元の場所に戻したか

・試薬ボトル、ミリＱで洗浄したか

・試薬冷蔵庫に戻したか

・プラテン外したか

・鉄粉のフタをとりつける。

・オートアナライザーの電源抜いたか

・廃液処理、片付け等

＜ブランク海水の精密測定＞

・3, 5, 10, 20 nMの標準試料をミリQを用いて作成する

・間にミリQを挟む

・標準試料を流して検量線を作成する。

・Blank海水を、安定するまで（30分くらい）流す。

・NED試薬を抜いた状態(ミリQに置き換える？)、安定するまで（30分くらい）流す。

・上記の２つのモードを3回ずつ程度繰り返して平均値を出す。