

SOP 6b

指示薬 *m*-クレゾールパープルによる 海水の pH 測定

1. 範囲と適用分野

分光光度法による海水の pH 測定について述べる。pH のスケールは、total hydrogen ion concentration scale (総水素イオン濃度 pH スケール) である。総水素イオン濃度 $[H^+]$ は、海水 1 kg 中のモル数で表す。

2. 定義

海水中の総水素イオン濃度は、硫酸水素イオンの寄与を含み、式(1)で定義される。

$$\begin{aligned} [H^+] &= [H^+]_F(1 + S_T / K_S) \\ &\approx [H^+]_F + [HSO_4^-] \end{aligned} \quad (1)$$

$[H^+]_F$ は海水中の遊離水素イオンの濃度、 S_T は硫酸イオンの総濃度 ($[HSO_4^-] + [SO_4^{2-}]$)、 K_S は HSO_4^- の酸解離定数である。pH は、式(2)に示すように 10 を底とする水素イオン濃度の対数の負の値と定義される。

$$pH = -\log_{10} \left(\frac{[H^+]}{\text{mol kg}^{-1} \text{ soln}^{-1}} \right). \quad (2)$$

3. 原理

海水に指示薬を加えて pH を測定する。*m*-クレゾールパープルのようなスルホンフタレイン指示薬では、海水の pH 領域における反応は、第二解離反応である。



I は指示薬を表す。指示薬の海水サンプル中の濃度は低い。サンプル中の総水素イオン濃度は、式(4)により定量できる:

$$\text{pH} = \text{p}K(\text{HI}^-) + \log_{10} \frac{[\text{I}^{2-}]}{[\text{HI}^-]} \quad (4)$$

この方法は、酸解離によって指示薬の吸収スペクトルが大きく変化する現象を利用して、 I^{2-} のスペクトルと HI^- のスペクトルの合成スペクトルが含む情報を、 $[\text{I}^{2-}]/[\text{HI}^-]$ の計算に使うのである。

光路長 l の光学セル中のサンプルの、波長 λ における吸光度は、ランベルト・ベールの法則により、式(5)で表すことができる。

$$\frac{A_\lambda}{l} = \varepsilon_\lambda(\text{HI}^-)[\text{HI}^-] + \varepsilon_\lambda(\text{I}^{2-})[\text{I}^{2-}] + B_\lambda + e \quad (5)$$

B_λ はサンプルのバックグラウンド吸光度である。 e は計器ノイズによる誤差項である。モル吸光係数 $\varepsilon_\lambda(\text{HI}^-)$ と $\varepsilon_\lambda(\text{I}^{2-})$ が波長の関数で測定されていれば、2 つまたはそれ以上の波長で測定した吸光度を、 $[\text{I}^{2-}]/[\text{HI}^-]$ 比の計算に使うことができる。

2 つの波長だけで測定を行い、バックグラウンドを引き算で効果的に取り除くことができた場合、(5)は(6)に置き換えることができる。

$$\frac{[\text{I}^{2-}]}{[\text{HI}^-]} = \frac{A_1/A_2 - \varepsilon_1(\text{HI}^-)/\varepsilon_2(\text{HI}^-)}{\varepsilon_1(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-) - (A_1/A_2)\varepsilon_2(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-)} \quad (6)$$

数字 1 と 2 は選択した波長を表す。測定を最も感度よく行うため、塩基型(I^{2-})と酸型(HI^-)それぞれの最大吸収波長で測定する。さまざまな ε 項は、波長 1 と 2 におけるそれぞれの化学種のモル吸光係数である。

4. 装置

4.1 フレキシブル採水チューブ

長さが約 40cm で、セルのポートにフィットするサイズのもの。シリコンラバーのチューブが適している。

4.2 分光光度セル

分光光度セルは、光路長が 10cm で、テフロン®栓のついた 2 ポートの光学ガラス製セルがよい。ある採水キャストですべての採水器から採水して測定するために、十分な数のセルを準備しておく必要がある。

4.3 マイクロピペット

指示薬をセルに添加するためにマイクロピペットを使用する。ピペットの容量は 0.1 cm³ ほどで、先端に細いテフロンチューブをノズルとしてつけておく。

4.4 高品質の分光光度計

最高の感度と精度を得るため、ダブルビームの分光光度計を使うことが望ましい。しかし、高品質のシングルビームの装置でも良い結果を得ることができる。

4.5 分光光度計セルの温度制御システム

光路長 10 cm のセルを装填できる恒温分光光度室は市販されていないので、特注で製作しなければならないだろう。

4.6 測定温度にサンプルを温めるシステム

海水サンプルを入れた分光光度セルを Ziploc[®] バッグに入れ、これを恒温槽に浸して温めてもよいが、これは不便である。およそ 12 本のセルを同時に濡らすことなく保持できる恒温室を、特注で製作した方がはるかに良い。

4.7 恒温槽 ($\pm 0.05^{\circ}\text{C}$)

恒温槽は、セル室の温度と 4.6 に述べたシステムの温度を制御するために使用する。

5. 試薬類

5.1 *m*-クレゾールパープル溶液

指示薬の濃厚溶液 (少なくとも 2 mmol dm⁻³ の濃度) を調製し、その pH を、海洋の pH の鉛直分布の範囲と同等の 7.9 \pm 0.1 の範囲の値に調整する必要がある。このとき、*m*-クレゾールパープルでは A₁/A₂ 比がおおよそ 1.6 となる。

6. サンプリング

採水チューブを使って、海水サンプルをニスキン採水器やほかの採水器から光学セルに直接分取する。海水を数 100 cm³ (15 - 20 秒間) 流した後、セルにテフロン[®] キャップをして、ヘッドスペースができていないことを確かめる。pH のサンプルは採水後すぐに測定しなければならないので、長期間の保管や保存に関する手順書はない。分析を待つ間、サンプルは室温で暗所に保管する。

¹ 濃厚指示薬溶液の吸光度比は、短い光路長(0.5 mm)のセルを使って測定できる。

7. 手順

7.1 サンプルセルを 25°C に温める

多くのセルを恒温室(4.6 参照)に数時間置き、サンプルセルを 25°C に温める。

7.2 セル+海水の吸光度を測定する

セルの外側をきれいに拭いて乾燥させ、セルを分光光度計の恒温サンプル室にセットする。光吸収がない波長(*m*-クレゾールパープルでは 730 nm)と、指示薬の塩基型(I^2)と酸型(HI)それぞれの最大吸収波長(578 nm と 434 nm)の計 3 波長で吸光度を測定し、記録する。

7.3 セルに指示薬を注入する

セルのテフロンキャップを片方取り外し、サンプルに濃厚指示薬溶液(~2 mmol dm⁻³)を 0.05-0.1 cm³ ほど添加する。テフロンキャップを元に戻し、セルをよく振って海水と指示薬をよく混ぜる。添加する指示薬の量は、2つの吸収ピークそれぞれの吸光度が 0.4 から 1.0 の範囲に入る量である。

7.4 セル+海水+指示薬の吸光度を測定する

セルを分光光度計に戻し、7.2 で測定した 3 つの波長で、もう一度吸光度を測定する。ベースラインの測定と指示薬吸収の測定の間、セルの位置がずれないようにセルを配置する。

8. 計算と結果の表現

8.1 測定した吸光度の補正

3 つの測定波長それぞれで、指示薬を含まないバックグラウンド測定の吸光度を、対応する指示薬を含むサンプル測定の吸光度から差し引く。

これに加えて、セルの置き直しや装置のシフトなど²によって引き起こされるベースラインのシフトを検知し補正するために、光吸収がない波長における吸光度のデータを使用する。ここでは、ベースラインのシフトが、可視光領域全体にわたって同じ大きさであると仮定している。ベースラインのシフトを補正して最終的な補正吸光度を求めるには、測定したシフトを、バックグラウンドを補正した波長 1 と 2 の吸光度から差し引く。バックグラウンドの吸光度とベースラインのシフトを補正したこれら吸光度の最終値を、指示薬のプロトン付加の度合いを反映する吸光度比 A_1/A_2 の計算に使用する。

² ベースライン吸光度 (海水のみ) を測定した時とサンプル+指示薬を測定した時の 730nm における吸光度の差は、 ± 0.001 以下でなければならない。 ± 0.001 を超えたら、吸光度の測定をやり直す前に、セルを取り外して光学窓をきれいに拭く。

8.2 海水+指示薬の pH の計算

指示薬を添加した海水サンプルの pH は、式(7)で計算する。

$$\text{pH} = \text{p}K_2 + \log_{10} \left(\frac{A_1/A_2 - \varepsilon_1(\text{HI}^-)/\varepsilon_2(\text{HI}^-)}{\varepsilon_1(\text{I}^{2-})/\varepsilon_1(\text{HI}^-) - (A_1/A_2)\varepsilon_2(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-)} \right) \quad (7)$$

$\text{p}K_2$ は化学種 HI^- の酸解離定数（単位は mol kg-soln^{-1} で、総水素イオン濃度スケールで表現されている）で、 A_1 と A_2 は塩基型と酸型それぞれの最大吸収波長における補正済み吸光度である。さまざまなモル吸光係数項 ε は、波長 1 と 2 でそれぞれ測定された特定の化学種のモル吸光係数である（表 1）。

表 1 m -クレゾールパープルのモル吸光係数

$\varepsilon_1(\text{HI}^-)/\varepsilon_2(\text{HI}^-)$	0.00691
$\varepsilon_1(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-)$	2.2220
$\varepsilon_2(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-)$	0.1331

$\lambda_1 = 578\text{nm}$; $\lambda_2 = 434\text{nm}$.

平衡定数 K_2 は塩分と水温の関数として経験的に表すことができ、実験室での注意深い測定によって決定されている³。 m -クレゾールパープルの $\text{p}K_2$ ($= 10^{-K_2}$) は、式(8)で表すことができる。

$$\text{p}K_2 = \frac{1245.69}{(T/K)} + 3.8275 + 0.00211(35 - S) \quad (8)$$

この式は、 $293 \leq T/K \leq 303$, $30 \leq S \leq 37$ の温度と塩分の範囲に適用できる。

8.3 指示薬の添加によって生じる pH 変化の補正

指示薬を海水サンプルに添加すると pH が変化する（別の酸塩基系が加わるためである）。指示薬溶液の pH を調整しておくことで、その変化を最小限に抑えるよう注意が払われているが、最良の pH 測定値を得るためには、指示薬添加による pH 変化を補正することが望ましい。

原理的には、pH の変化はサンプルと指示薬の化学平衡の知見を使って計算することができる。しかし、補正值を経験的に評価できれば、より簡単に補正することができる。pH が異なる一連の海水サンプルのそれぞれに、指示薬を 2 回添加する。そして、2 回目の指示薬添加で生じる吸光度比 A_1/A_2 の変化を、最小二乗法を使って、1 回目の指示薬添加で測定した A_1/A_2 の関数で表す。

$$\frac{\Delta(A_1/A_2)}{V} = a + b(A_1/A_2) \quad (9)$$

³ DelValls and Dickson(1998)は、TRIS 緩衝液の標定誤差のために、この $\text{p}K_2$ にも誤差があることを示唆した。しかし、提案された補正を大きく軽減して補償する誤差があるようである。ここに示した $\text{p}K_2$ は Clayton and Byrne (1993) による。

V は 1 回毎に添加した指示薬溶液の体積である。最終的な補正後の吸光度比は式(10)で表される。

$$(A_1 / A_2)_{\text{corr}} = (A_1 / A_2) - V[a + b(A_1 / A_2)] \quad (10)$$

8.4 計算例

$$\begin{aligned} t &= 25^\circ\text{C}, \\ S &= 35, \\ \text{p}K_2 &= 8.0056, \end{aligned}$$

指示薬の保存溶液が $A_1/A_2 = 1.6$ のとき、

$$\frac{\Delta(A_1 / A_2)}{V} = 0.125 - 0.147(A_1 / A_2).$$

吸光度の測定値：

$$\begin{array}{lll} \text{海水：} & A_{434} = 0.02433 & A_{578} = 0.01936 & A_{730} = 0.08365 \\ \text{指示薬+海水：} & A_{434} = 0.45123 & A_{578} = 0.84574 & A_{730} = 0.08298 \end{array}$$

指示薬添加後

$$A_1 / A_2 = \frac{0.84574 - 0.01936 - (0.08298 - 0.08365)}{0.45123 - 0.02433 - (0.08298 - 0.08365)} = 1.93430.$$

指示薬添加前への補正 ($V=0.08 \text{ cm}^3$),

$$\begin{aligned} (A_1 / A_2)_{\text{corr}} &= 1.93430 - 0.08[0.125 - 0.147(1.93430)] \\ &= 1.94705 \end{aligned} \quad (11)$$

したがって

$$\text{pH} = 8.0056 + \log_{10} \left(\frac{1.94705 - 0.00691}{2.2220 - 1.94705 \times 0.1331} \right) = 8.0005.$$

9. 品質保証

9.1 分析品質管理の一般的な原理については、3章を参照のこと。

9.2 分析品質管理の特定の応用

9.2.1 分光光度計の性能

使用する分光光度計の測定性能は、U.S. National Institute for Standard and Technology (NIST)から提供されている標準物質を使って確認することができる。SRM2034 は、密封されたキュベットに入った酸化ホロミウム溶液である。これを使って分光光度計の波長の精確さを決めることができる。SRM 930d は吸光度フィルターのセット

で、吸光度の測定の精確さを決めることができる。これらの測定の管理図を作成し、許容誤差の範囲から外れたら分光光度計を調整すべきである。(とはいえ、ここで詳述している手順は、分光光度計の性能のちょっとした変化に対しては、あまり敏感ではない)。

もっと重要なことは、分光光度計の安定性が高いことである。これは一定の吸光度を示す系に対して(例として SRM 930d や指示薬を含む恒温の緩衝液)、測定を繰り返し行い、対象波長における吸光度の標準偏差を計算することで、確かめることができる。

9.2.2 精度 (precision)

サンプルの取扱いに特に注意すれば、0.001 pH 単位 (1 SD) より高い精度で pH を測定することができる。重複分析(duplicate analyses)の結果を R 管理図にプロットするべきである。

9.2.3 偏り(bias)

分光光度計による pH 測定のバイアスは、さまざまモル吸光係数を決めたときの測定値の精確さや、 pK_2 の値を求めるときに使用したさまざまな値の精確さに依存している。分光光度測定の大きな利点は、これらのパラメーターについて、もっと正確な情報が後になって得られたら、pH の測定値を、精度を悪化させることなく調整できることである。あり得るバイアスは、今のところ 0.005pH 単位より小さいと推定されている。

10. 文献

- Byrne, R. H. and Breland, J.A. 1989. High precision multiwavelength pH determinations in seawater using cresol red. *Deep-Sea Res.* **36**: 803–810.
- Byrne, R.H., Robert-Baldo, G., Thompson, S.W. and Chen, C.T.A. 1988. Seawater pH measurements: an at-sea comparison of spectrophotometric and potentiometric methods. *Deep-Sea Res.* **35**: 1405–1410.
- Clayton, T.D. and Byrne, R.H. 1993. Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale calibration of m-cresol purple and at-sea results. *Deep-Sea Res.* **40**: 2115–2129.
- DelValls, T.A. and Dickson, A.G. 1998. The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ('tris') in synthetic sea water. *Deep-Sea Res.* **45**: 1541–1554.
- Dickson, A.G. 1993. The measurement of sea water pH. *Marine Chem.* **44**: 131–142.