

C₁₈ 固相抽出を用いた陸水中蛍光物質の簡易モニタリング法の開発

杉山裕子、杉浦嘉一¹、和田千弦、熊谷哲
社会システム環境学大講座, ¹環境人間学研究所

Development of the monitoring method for dissolved organic matter in limnetic waters using C₁₈ solid phase extraction and 3D EEM spectrometry.

Yuko Sugiyama, Yoshikazu Sugiura, Chizuru Wada and Tetsu Kumagai

School of Human Science and Environment
University of Hyogo
1-1-12, Shinzaike-Honcho, Himeji, Hyogo 670-0092, Japan

Abstract

In the limnological environments, dissolved organic matter (DOM) consists of various organic molecules that come from allochthonous origin (e.g. riverine humic substances) and autochthonous origin (e.g. carbohydrates and proteins), and more than 90% of DOM has not been identified yet because most of organic molecules in DOM are intermediate compounds of biodegradation. Thus to develop a simple method to qualify the water in regards of dissolved organic matter is needed.

In this study, we developed the monitoring method for limnetic waters using C₁₈ solid phase extraction and 3D excitation-emission matrix (EEM) spectrometry. The eluent conditions for C₁₈ extraction were examined and the suitable ones were proposed. The coefficient of variation calculated by the fluorescent peak intensities were below 7%, and C₁₈ solid phase extraction was found to be a better way for the pre-treatment of EEM spectrometry.

1.はじめに

溶存有機物は、水圏に存在している炭素の主要な形態のひとつであり、炭素の水圏における循環に大きく関わっているが、それに加えて、太陽光の水中への入射量を減衰させることにより一次生産に影響を与え¹、バクテリアの主なエネルギー源として利用され²、あるいは有害金属や有機化合物などと錯体をつくり毒性を変化させる働きをするなど^{3,4}、天然水の特質に大きな影響を与えている。このため、溶存有機物の物理的・化学的・生物化学的特徴を明らかにすることは極めて重要である。

琵琶湖水中には溶存有機物として多種多様な有機化合物が含まれている。これらには湖内で生物活動により生産されたタンパク質・炭水化物やそれらの生分解生成物などの自生有機物、河川水から流入してくる土壌起源腐植物質や人工有機化合物などの外来性有機物があるが、これらの有機物質全てを個別に分離・定量することは不可能であり、湖内の有機物環境を示す新しいモニタリング手法の開発が求められている。

三次元蛍光分析は、三次元励起蛍光スペクトルに検出されるピーク位置の違いやスペクトル形状の違いを見分けることが可能であり、腐植物質をはじめとした天然有機物の特性を知ることができる方法として用いられてきた⁵⁻¹²。たとえば海洋における研究では、タンパク質

や腐植物質に由来する蛍光ピークが特徴的な波長域に現れることや⁵、タンパク質様ピークをもつ有機物は140 m以浅の表層に多く、腐植物質様ピークをもつ有機物は1000 m以下の深層に多いこと⁶などが明らかにされ、また琵琶湖における研究では、0.1 μ mとGF/Fの間の高分子量分画にタンパク質や腐植物質に起因する3種類の蛍光ピークが検出され⁷、フルボ酸様蛍光物質の蛍光強度が河川水ではDOC濃度と相関し、湖水では相関しないこと⁸などが明らかにされている。しかし、日本の河川や湖のような有機物濃度の低い水系では、蛍光ピークの強度が低く、ピーク位置もはっきりしないため、その蛍光スペクトルの違いにもとづく有機物環境の違いを論じることは容易ではない。我々は、琵琶湖水中溶存有機物のうち、タンパク質・腐植物質などの蛍光を有する有機物の特性を簡便に測定できる手法を開発することを目的として、C₁₈ 固相抽出法による化学分画と三次元励起蛍光測定を組み合わせることを試みた。この方法を琵琶湖水中溶存有機物のモニタリングに適用することを目的として、C₁₈ 固相抽出カートリッジによる抽出条件、および得られる三次元励起蛍光スペクトルの特徴について検討した。

2. サンプルング

2005年4月28日に、琵琶湖北湖 NB17 地点(北緯 35° 東経 136°)において、水深 2.5 m の湖水をニスキン採水器を用いて採取した。また、2005年8月31日に彦根沿岸において表層水を採取した。採取した試料は、ポリエチレン製採水瓶に保存し、氷冷下研究室に持ち帰った。研究室において、試料水は直ちに予め 1M HCl-1M HNO₃ 混酸で洗浄を行なった孔径 0.2 μm のヌクレポアフィルターでろ過した。ろ過試料はポリカーボネート製容器に入れ、測定または処理を行なうまで 4 °C 以下の冷暗所で保存した。Fig.1 にサンプリング地点を示す。

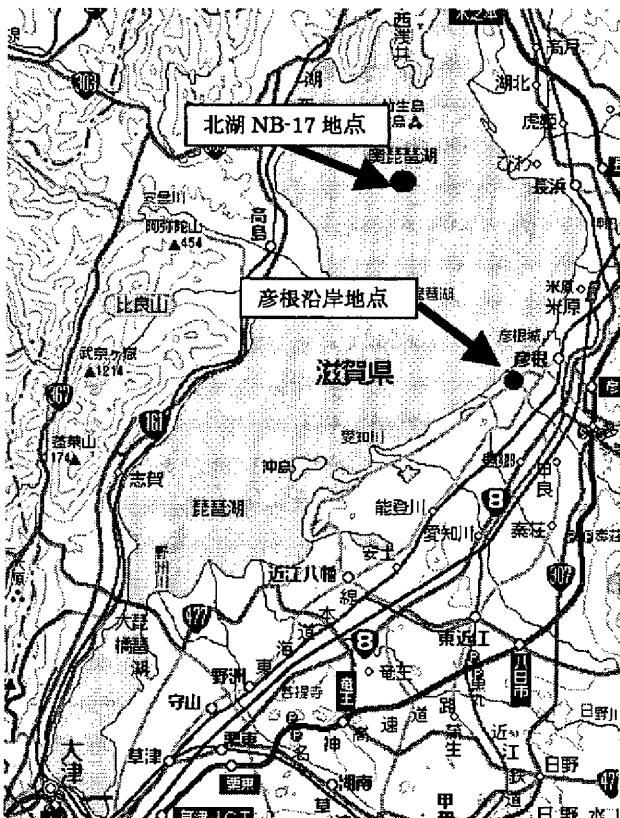


Fig.1 琵琶湖のサンプリング地点

3. 実験

溶存有機炭素(DOC)濃度の測定

DOC 濃度の測定には、SHIMADZU TOC-5000 を用いた。検量線作成用 DOC 標準溶液は、フタル酸水素カリウム溶液(0、1、2、3 mgC/l)を用いた。DOC 試料の測定は、ろ過試料 約 20 ml に 2N 塩酸 100 μl を加えた後、高純度空気を 10 分間通気して溶存炭酸塩を二酸化炭素として取り除いた後、680°C で燃焼させ、発生した二酸化炭素量から算出した。装置のブランク値は TOC-5000 内蔵のブランクチェック機能により測定日ごとに測定した。

試料の測定は、バイアル1本当たり 3 回行い(変動係数が 2% 以内に収まらない場合は、最大 5 回まで測定)、その平均値(4 回以上測定した場合は変動係数が最小になる 3 回の測定の平均値)を用いた。

三次元励起蛍光スペクトルの測定

三次元励起蛍光測定は HITACHI F-2500 を用い、励起波長(EX)220~450 nm、蛍光波長(EM)220~500 nm で蛍光強度を測定した。サンプルの蛍光強度は 10 μg/l 硫酸キニーネ溶液(EX/EM 345/450 nm、0.1 M 硫酸溶液) を 10 QSU として規格化した¹²。

C₁₈ 固相抽出法による蛍光性溶存有機物の濃縮

ろ過試料を 500 ml 量りとり、濃塩酸を添加して pH 2.2 に調整し、C₁₈ 固相抽出カートリッジに担持させた。その後、無蛍光メタノール溶液を用いて溶離し、三次元励起蛍光スペクトルの分析を行った。

4. 結果と考察

未濃縮試料と濃縮試料の三次元励起蛍光スペクトル

Fig.2 は C₁₈ 固相抽出法による濃縮を行う前、Fig.3 は濃縮後の三次元励起蛍光スペクトルである。Fig.2、Fig.3 ともに 2005年8月31日に採取した琵琶湖彦根沿岸の表層水(ボトル No.1) (DOC 濃度 3.38 mgC/l)を用いた。未濃縮の試料では溶存蛍光性有機物に由来する蛍光ピークは検出することができなかったが、濃縮後の試料では、明瞭な蛍光ピークが観測された。また、Fig.3 の励起波長/蛍光波長 280nm/310nm に現れている蛍光ピークは、チロシン様ピークと呼ばれている⁵。

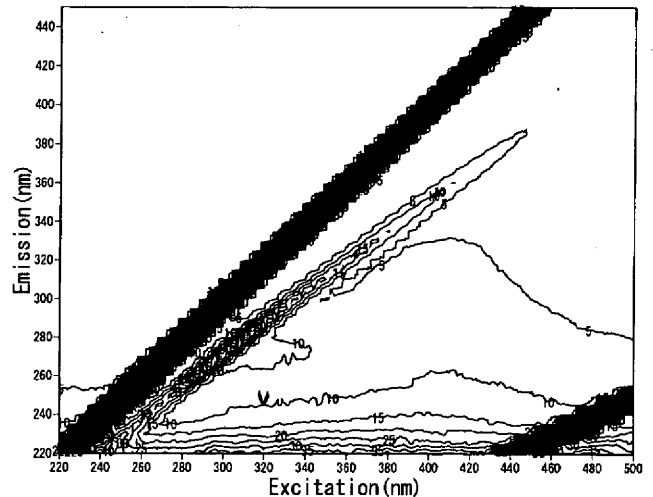


Fig.2 2005年8月彦根沿岸湖水 DOM の 3DEEM スペクトル1 (濃塩酸添加により試水の pH を 2.1 に調整後)

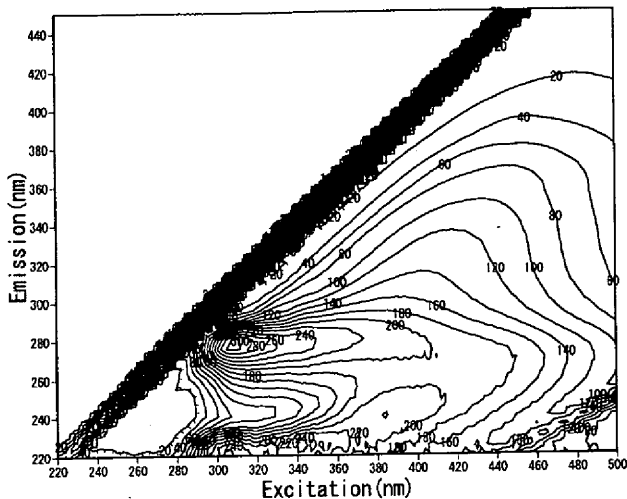


Fig.3 2005年8月彦根沿岸湖水 DOMの3DEEM スペクトル2
(C₁₈ 固相抽出カートリッジに担持し、80%無蛍光メタノールで溶離したもの)

溶離液の組成の選択

500 ml のろ過湖水を C₁₈ 固相抽出カートリッジに担持させ、50%、80%、100%の無蛍光メタノール 20 ml を用いて溶離を行い、蛍光性有機物を溶離するのに最適な溶離液の組成を検討した。試料には、2005年4月28日に採取した琵琶湖北湖の水深2.5mの湖水(DOC濃度 1.38 mgC/l)を用いた。これら3種の溶離液によって溶離された試料の三次元励起蛍光スペクトルを測定し、得られた3つの蛍光ピーク(チロシン様ピーク2種と腐植物質様ピーク1種)の蛍光ピーク強度を Table 1 に示す。

50%の無蛍光メタノールによって溶離した場合は、腐植物質様ピークのみが明瞭に検出された。また80%の無蛍光メタノールによって溶離した場合は、チロシン様ピーク2種と腐植物質様ピークにおける蛍光ピーク強度が最も高い値となった。このため、80%の無蛍光メタノールが最適な溶離液であると考えられた。

Table 1 3種の組成の無蛍光メタノールによる溶離結果 (単位: QSU)

蛍光ピークの名称 (励起波長/蛍光波長)	50%	80%	100%
チロシン様ピーク1 (275nm/305nm)	-	260	270
チロシン様ピーク2 (225nm/310nm)	-	250	210
腐植物質様ピーク (245nm/390nm)	100	110	100

溶離液量の検討

ろ過試料500 mlをC₁₈固相抽出カートリッジに担持させた後、5 mlの無蛍光メタノールによって6回溶離させ、溶離液を個別に回収して三次元蛍光測定

を行った。試料は、2005年8月31日に採取した琵琶湖彦根沿岸の表層水(ボトルNo.1)(DOC濃度 3.38 mgC/l)を用いた。結果を Fig.4 に示す。

チロシン様ピークと腐植物質様ピークは、1回目と2回目の溶離液においてそれぞれ416、207QSUの高い蛍光ピーク強度が検出され、3回目以降はほとんど検出されなかった。このことより、チロシン様ピークと腐植物質様ピークをもつ溶存蛍光性有機物は、10 mlの溶離液によって、定量的に回収されることが示唆された。

一方、トリプトファン様ピークは1回目に225QSUの高い蛍光ピーク強度が検出され、2回目以降も徐々に減少しながらも32~76QSUの蛍光ピーク強度が検出された。原因は明らかではないが、トリプトファン様ピークを示す有機物は10 mlの溶離液では完全には回収できないと考えられる。

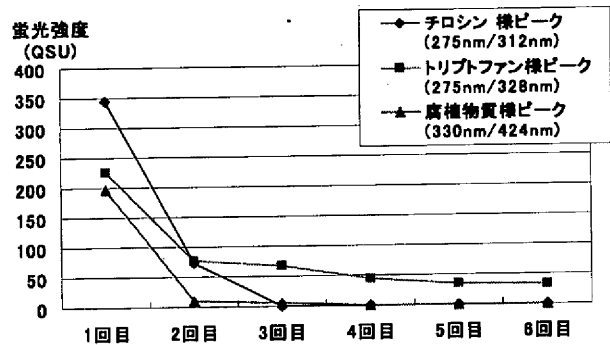


Fig.4 C₁₈ 固相抽出試料の蛍光ピーク強度の変化 (80%メタノール溶液により5 mlずつ計6回順次溶離させた試料液が示した3種の蛍光ピーク強度変化)

C₁₈ 固相抽出法における回収率

2本のナスフラスコにろ過試料を500 mlずつ入れ、-80℃で凍結させた後、EYELA FD-5N凍結乾燥機を用いて、減圧下で乾燥させた。その後、17.2 mlの80%無蛍光メタノールに再溶解させ、三次元励起蛍光測定を行った。試料は2005年8月31日に採取した琵琶湖彦根沿岸の表層水(ボトルNo.2)(DOC濃度 2.52 mgC/l)を用いた。結果を Table 2 に示す。

凍結乾燥試料を80%無蛍光メタノールに再溶解させた試料の三次元蛍光測定により得られた3種の蛍光ピーク強度をC₁₈固相抽出法により濃縮された試料で得られた3種の蛍光ピーク強度と比較して、C₁₈固相抽出法における回収率を求めた。その結果、タンパク(チロシン)様ピークについては73~76%、腐植物質様ピークについては90~92%と、良好な回収率が得られた。

Table 2 5種の蛍光ピークの回収率

ピークの名称 (励起波長/蛍光波長)	回収率(%)
チロシン様ピーク1 (280nm/310nm)	76.4
チロシン様ピーク2 (225nm/310nm)	72.6
腐植物質様ピーク1 (300nm/402nm)	92.2
腐植物質様ピーク2 (260nm/436nm)	89.6
腐植物質様ピーク3 (240nm/384nm)	105.2

C₁₈ 固相抽出法の精度

2005年8月31日に採取した琵琶湖彦根沿岸の表層水(ボトル No.1)(DOC濃度 3.38 mgC/l)を用い、80%無蛍光メタノール10mlによる溶離を5回繰り返す。その変動係数を求めた結果をTable 3に示す。3つの蛍光ピークの変動係数はそれぞれ7.0%以下であり、比較的高い精度でC₁₈固相抽出カートリッジからの溶離が可能であることが分かった。

Table 3 3種の蛍光ピーク強度の変動係数

蛍光ピークの名称 (励起波長/蛍光波長)	変動係数(%)
チロシン様ピーク (275nm/312nm)	±5.3
トリプトファン様ピーク (275nm/328nm)	±7.0
腐植物質様ピーク (250nm/400nm)	±3.8

5.まとめ

琵琶湖水中溶存有機物のうち蛍光を有する有機物の特性を簡便に測定できる手法の開発を目的とし、C₁₈固相抽出カートリッジによる化学濃縮の抽出条件と得られる三次元励起蛍光スペクトルの特徴について検討を行った。

その結果、500mlの琵琶湖水試料をカートリッジに担持させ、80%の無蛍光メタノール10mlによって溶離させることで、タンパク(チロシン)様ピークについては73~76%、腐植物質様ピークについては90~92%と、良好な回収率が得られ、定量的に回収されることが示唆された。

また、チロシン様ピーク、トリプトファン様ピーク、腐植物質様ピークの3つの蛍光ピークにおけるC₁₈固相抽出カートリッジからの溶離の変動係数は7.0%以下であり、比較的高い精度で溶離が可能であることが明らかとなった。

これらのことより、C₁₈固相抽出法が琵琶湖水中の溶存蛍光性有機物の濃縮を可能にし、三次元励起蛍光測定の前処理として非常に優れていることが明らかとなった。

6.参考文献

- (1) Arts M.T. et al., *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 292-299 (2000)
- (2) Tranvik L.J., *Hidrobiologia*, **229**, 107-114 (1992)
- (3) Boggs J.R. et al., *Rev.Macromol.Chem. Phys.*, **C25**, 626-650 (1985)
- (4) Patterson H.H. et al., *Humic and Fulvic Acid*, American Chemical Society, Chapter18, 288-298 (1996)
- (5) Coble P.G. *Mar. Chem.*, **51**, 325-346 (1996)
- (6) K. Mopper and C.A. Shultz, *Mar. Chem.*, **41**, 229-238 (1993)
- (7) F.C. Wu et al., *Biogeochem.*, **65**, 245-257 (2003)
- (8) K.M.G. Mostofa et al., *Limnology*, **6**, 101-115 (2005)
- (9) C.E.Del Castillo et al., *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 1425-1432 (2000)
- (10) J.J. Alberts and M. Takacs, *Org. Geochem.*, **35**, 1141-1149 (2004)
- (11) P.G. Coble et al., *Nature*, **348**, 432-435 (1990)
- (12) P.G.Coble et al., *Deep-Sea Research II*, **45**, 2195-2223 (1998)

(平成17年10月3日受付)