

# 超高速スキャン蛍光分光光度計を用いた フミン質構成成分の新しい定性・定量法の開発 Fast-scanning spectrofluorimeter modified for quantification of identical humic fractions

18N3100035L 山元 雄太 (水代謝システム研究室)

Yuta YAMAMOTO/ Sustainable water metabolic system engineering Lab.

**Key Words :** fast scanning spectrofluorimeter, LC-EEM, PARAFAC, humic substances

## 1. はじめに

フミン質 (Humic substances; HS) は生物の死後、生体構成有機物が微生物的・化学的作用を受けて崩壊して生じた「化学構造が特定されない有機物」の総称で、溶存有機物 (Dissolved organic matter; DOM) の大部分を占める<sup>1)</sup>。HS は、水中において光減衰や物質輸送に関与することで、水域の生態系や水環境に重要な影響を及ぼすとされる<sup>2)</sup>。また、水処理過程においても凝集作用、消毒副生成物生成、膜目詰まり、微生物の成長、および微量汚染物質の挙動に HS の量および質が影響を与えることが明らかになっていることから、工学的にもそれらの監視・制御が重要となる<sup>3)</sup>。

三次元励起蛍光マトリクス (Excitation emission matrix; EEM) 分析法は、HS の励起-蛍光発光特性を利用してそれらを定性・定量する分析手法であり、特別な前処理を必要とせず、非破壊かつ高感度に HS 特性を明らかにすることができる。しかしながら、複数成分が試料中に含まれる際にスペクトルが重複して得られるため、得られたスペクトルを元に、各構成成分を定性・定量することが難しいという課題があった。近年、EEM と多変量解析の一種である Parallel factor analysis (PARAFAC) とを組み合わせることで、重なり合ったスペクトルを分離する手法が提案され、EEM スペクトルから構成成分を推定でき、スペクトルの定量的な解釈が可能になった。しかしながら、EEM-PARAFAC により試料中に含まれる成分を検出しようとする場合には、多様な検体を 100 以上準備する必要がある<sup>3)</sup>。水環境調査において 100 以上の多様な試料を確保することは容易ではないため、少ない試料でも PARAFAC によりスペクトルを正確な成分に分離できる手法が望まれている。

蛍光分光光度計は、1980 年代発売当初は測定に 1 時間以上かかっていたが、近年、波長走査速度や工学的な作動速度の上昇により、同測定を 1 分以内に終わらせるようになった。蛍光分光光度計の進化を鑑みて、我々は EEM の前段でサイズ排除クロマトグラフィー (Size exclusion chromatography; SEC) により試料を分子量に応じて分離することで、1 つの試料から複数のスペクトルを得られるものと考えた。LC-EEM は、マイクロプレートに分取した画分を対象として EEM 分析を行う Off-

line-EEM と、フローセルが装着された蛍光分光光度計を LC の検出器として接続する In-line-EEM に分類される。特に、In-line-EEM は、シーケンス測定が可能であるため、Off-line-EEM よりも再現性が高く、かつ多くのスペクトルが得られるものと期待する。しかしながら、測定される EEM スペクトルが、PARAFAC 分解可能な状態であることを示す Trilinearity を満たさないことが、In-line-EEM の課題とされる<sup>4)</sup>。Trilinear なスペクトルを測定するためには、EEM 測定中の濃度変化を抑制する必要がある。高速 EEM 測定により、濃度が変化しない間にスキャンできれば、Trilinear なスペクトルを測定可能と考える。

以上より本研究では、超高速スキャン蛍光分光光度計を LC の検出器とする In-line-EEM により、フミン質構成成分をより詳細かつ定量的に明らかにする手法を確立することを目的とする。具体的には、In-line-EEM の分析条件を検討した後に、河川流域 11 箇所から採水した試料に対して In-line-EEM を実施することで、開発した手法の自然水試料に対する有効性を検証する。

## 2. 実験方法

### (1) 河川水の採取

2019 年 4 月 13 および 14 日に、荒川流域 11 箇所から 150 mL を採水し、現地で 0.45  $\mu\text{m}$  の PTFE 製シリンジフィルターで懸濁質を除いたものを実験室に持ち帰った。

### (2) 分析機器

高性能液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC, 日立ハイテクサイエンス製) に水系ゲルろ過カラム (TSKgel G4000PW, 7.5mm $\times$ 30 cm, 東ソ製) を装着した。移動相には、リン緩衝液 (pH 6.8) と硫酸ナトリウム (イオン強度 0.1M) の混合液を用いた。照射容量 180  $\mu\text{L}$  のフローセルを蛍光分光光度計 (F-7100, 日立ハイテクサイエンス製) に接続し、測定を行った。

### (3) PARAFAC 解析

カットフィルター (波長 295 nm) を用いて 2 次レイリー光を除去し、測定した EEM スペクトルから溶離液の EEM スペクトル (ブランクスペクトル) を差し引いたものを PARAFAC 解析に供した。PARAFAC 解析は、Matlab (2019a) (MathWorks) のツールボックス progMEEF (ver. 1.4) を用いて実行した。初期推定値はランダムに決定し、

最適化過程で非ネガティブ制約を適用した。成分数 1～6 の PARAFAC モデルを生成し、Core consistency analysis (CORCONDIA) 分析を用いて成分数を決定した<sup>9)</sup>。

#### (4) In-line-EEM

EEM 測定時間 (60 秒) よりも、HS のフローセル内滞留時間 (108 秒) が長くなるように、SEC 流量を 0.1 mL/min に設定し、試料注入量は 100  $\mu$ L に設定した。波長走査速度を最速の 60000 nm/min、スリット幅、ホトマル電圧をそれぞれ 10 nm、400 V に設定した。荒川中流から採取された河川水試料を用いて、スペクトルが複数の HS 成分に分離される励起・蛍光波長範囲と励起波長測定間隔を探索した。

ランク分析により、In-line-EEM により測定された 3 次元配列の Trilinearity を検証した。3 次元配列を行、列、および奥行き方向に展開した 3 行列の Pseudo ランクが一致すれば Trilinear、一致しなければ Non-trilinear となる。Pseudo ランクを求める行列と、その行列の複素共役転置の行列積の固有値を算出し、累積寄与率が 70%を超える成分数を Pseudo ランクと定義した。Trilinearity が確認された試料の 3 次元配列のみを連結して拡張 3 次元配列を生成し、生成した拡張 3 次元配列を PARAFAC 解析に供した。

### 3. 実験結果・考察

#### (1) In-line-EEM分析条件の検討

荒川中流から採取された河川水試料を、励起・蛍光波長範囲: 220-550 nm、励起波長測定間隔: 10 nm に設定した In-line-EEM に供した結果、CORCONDIA 分析により (表-1) PARAFAC 成分数は 3 となり、図-1 に示すスペクトルが分離された (測定①)。既往研究<sup>9)</sup>で報告された結果を参照して、成分 1 は HA と推定された。成分 2、3 には励起波長 250 nm 以下の範囲に散乱光由来の迷光が確認された。迷光の検出を避けるために、励起波長範囲を 250-400 nm、蛍光波長範囲を 380-500 nm に設定し、同試料を In-line-EEM に供した結果、CORCONDIA 分析により PARAFAC 成分数は 1 となり (表-2)、図-2 に示すスペクトルが分離された (測定②)。既往研究<sup>9)</sup>から、成分 1 は HA と同定された。迷光の影響は防げたが、重なり合ったスペクトルを分離することが出来なかった。この原因として、励起波長測定間隔が 10 nm と大きく、スペクトルの解像度が小さかったためと考える。

高分解能のスペクトルを得るために、励起波長測定間隔を 10 nm から 5 nm に変更し、その他は測定②と同条件で In-line-EEM に供した結果、CORCONDIA 分析により PARAFAC 成分数は 3 となり (表-3)、図-3 に示すスペクトルに分離された (測定③)。既往研究<sup>9)</sup>から、成分 1～3 は HA と推定された。HS は主に 3 種類の成分で構成されることが Ishii (2012) らの研究で明らかになっていることから、測定③により 3 種類の HA 成分のスペクト

ルが分離出来たものとする。本研究では、測定③の条件を以後適用し、In-line-EEM の自然水に対する有効性を検証した。

#### (2) In-line-EEM有効性の検証

##### a) Trilinearityの確認

同一流域の 11ヶ所から採水した河川水試料を In-line-EEM 分析に供し、保持時間 98～122 分の間に測定された 25 の EEM スペクトルを用いて、保持時間、励起波長、および蛍光波長から成る 3 次元配列 (25×31×61) を生成した。生成された 3 次元配列の Trilinearity をランク分析で確認した結果、表-4 に示すように、行方向 (励起波長、31×1525)、列方向 (蛍光波長、61×775)、および奥行き方向 (保持時間、25×1891) に展開した 3 行列の Pseudo ランクを得た。

表-1 CORCONDIA 分析結果 (測定①)

| 成分数                  | 1   | 2     | 3     | 4     | 5    | 6    |
|----------------------|-----|-------|-------|-------|------|------|
| Core consistency (%) | 100 | 99.97 | 84.38 | 20.58 | 7.91 | 3.27 |

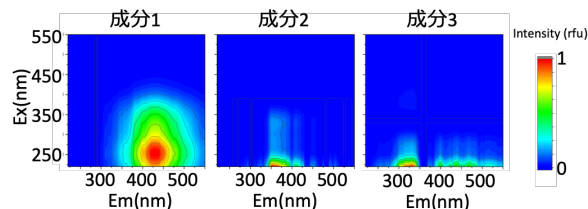


図-1 分離スペクトル (測定①)

表-2 CORCONDIA 分析結果 (測定②)

| 成分数                  | 1   | 2     | 3    | 4    | 5     | 6    |
|----------------------|-----|-------|------|------|-------|------|
| Core consistency (%) | 100 | -5.86 | -0.9 | -0.7 | -0.24 | 0.14 |

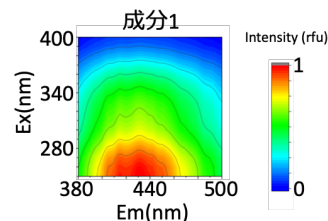


図-2 分離スペクトル (測定②)

表-3 CORCONDIA 分析結果 (測定③)

| 成分数                  | 1   | 2     | 3     | 4     | 5    | 6     |
|----------------------|-----|-------|-------|-------|------|-------|
| Core consistency (%) | 100 | 35.43 | 13.62 | -8.13 | 3.81 | -1.76 |

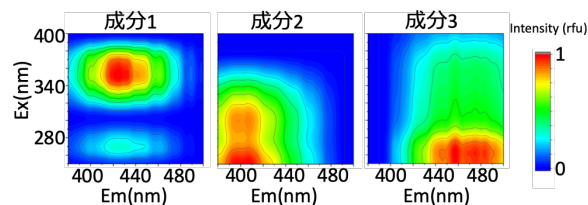


図-3 分離スペクトル (測定③)

表-4から、全試料で、展開した3行列のPseudoランクが一致した。これは、全試料において、生成された3次元配列がTrilinearであることを示している。

低ポンプ流量、および超高速スキャン蛍光分光光度計による高速EEM測定により、EEM測定中の画分の濃度変化が抑えられ、生成された3次元配列がTrilinearになったと考えられる。本研究で用いた同一流域の11ヶ所から採水した試料をIn-line-EEM測定した際に得られた3次元配列はTrilinearであることが判明したが、試料の種類によってはTrilinearが成立しないこともあり得る。In-line-EEM測定時には、毎度、得られた3次元配列のTrilinearityを確認する必要がある。

#### b) 河川水中に含まれるHS成分分析

同一流域の11ヶ所から採水した試料をIn-line-EEMに供して得た3次元配列を試料数×保持時間、励起波長、および蛍光波長から構成される拡張3次元配列((11×25)×31×61)に連結し、PARAFAC解析に供した。CORONDA分析の結果、PARAFAC成分数は4となり(表-5)、図-

表-4. 展開した3行列のPseudoランク

| 採水地点 | Pseudoランク |     |       |
|------|-----------|-----|-------|
|      | 行方向       | 列方向 | 奥行き方向 |
| 1    | 1         | 1   | 1     |
| 2    | 1         | 1   | 1     |
| 3    | 1         | 1   | 1     |
| 4    | 1         | 1   | 1     |
| 5    | 1         | 1   | 1     |
| 6    | 1         | 1   | 1     |
| 7    | 1         | 1   | 1     |
| 8    | 1         | 1   | 1     |
| 9    | 1         | 1   | 1     |
| 10   | 1         | 1   | 1     |
| 11   | 1         | 1   | 1     |

表-5 CORONDA 分析結果 (河川水)

| 成分数                  | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6    |
|----------------------|-----|-------|-------|-------|-------|------|
| Core consistency (%) | 100 | 99.89 | 40.01 | 23.22 | -0.03 | 0.38 |

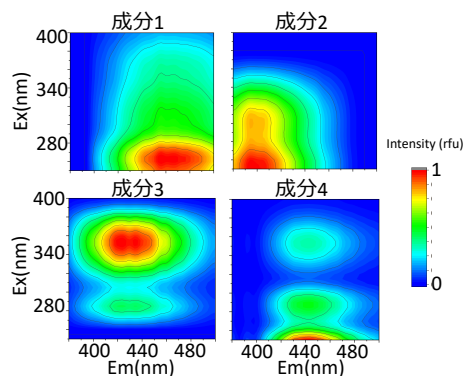


図-4 分離スペクトル (河川水)

4に示すスペクトルが得られた。既往研究<sup>5)</sup>より、成分1～3はHA、成分4はFAと推定された。

図-5に、荒川中流から採取された河川水をIn-line-UV分析に供した際に得たUVクロマトグラムを示す。UVクロマトグラムは、UV吸収特性を示す有機物の分子量分布を明らかにできる一方で、各分子量画分を構成する成分についての情報は限られる。対して、In-line-EEMは、保持時間に対して測定したEEMスペクトルをPARAFAC解析に供して得られるスコア値をみることで、HS成分の保持時間に対する濃度変化、すなわち、分子量分布を把握することができる。図-6に、荒川中流から採取された河川水をIn-line-EEMに供して得られた成分の、保持時間に対するスコア値を示す。成分の相対濃度を把握するため、スコア値をその最大値で除した値を縦軸に用いた。成分1, 2, 3は保持時間103分付近に顕著なピークが確認された一方で、成分4は116分付近に顕著なピークが確認された。これは、成分4(FA)は成分1～3(HA)と比較して、より低分子の有機物により構成されていることを示すものである。既往研究において、FAはHAよりも低分子の有機物により構成されている研究例が多く報告されていることを考慮すると、成分1, 2, 3はHA、

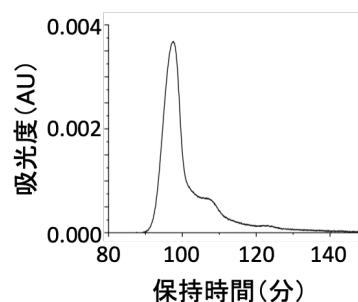


図-5 UV クロマトグラム (河川水 HS)

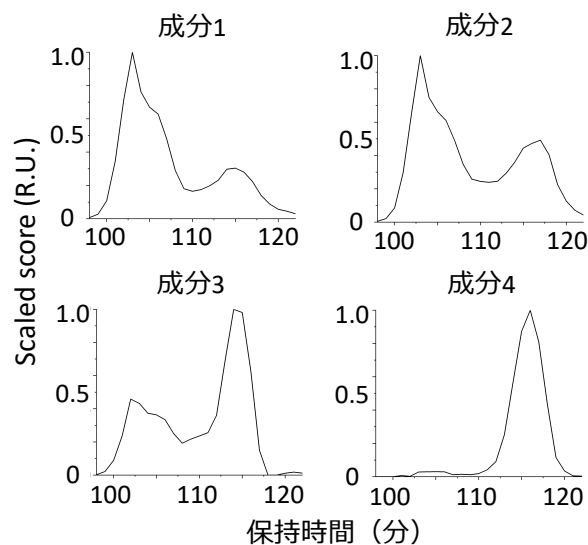


図-6 HS 成分の分子量分布 (河川水 HS)

成分 4 は FA であると推定される。この結果は、PARAFAC で分離された各スペクトルのピーク位置から推定された成分と一致するものである。FA は EEM スペクトルにおいて HA とピーク位置が近接しており、挙動を把握するのが極めて難しいとされる。In-line-EEM を用いることで、FA の増減を把握することが出来る可能性が本研究により示された。

### (3) In-line-EEMを利用した環境モニタリングの展望

EEM-PARAFAC により得られる PARAFAC 成分スコア値は、水質項目や消毒副生成物生成能 (Disinfection by product-formation potential; DBPs-FP) の代替として使用されてきた。Yang (2015)らは、9 箇所の浄水場から採水した 91 の試料を対象として EEM-PARAFAC を実施し、PARAFAC 成分のスコア値とトリハロメタン生成能 (Trihalomethanes formation potential; THMs-FP) 間で相関分析を行った<sup>7)</sup>。EEM-PARAFAC の結果、スペクトルは 3 成分 (HA、FA、トリプトファン様物質) に分離され、全成分のスコア値と THMs-FP 間に強い相関関係がみられた ( $r = 0.798 \sim 0.950$ ,  $p < 0.001$ )。また、Heibati(2017)らは、87 の家庭から採水した水道水を対象として EEM-PARAFAC を実施し、PARAFAC 成分のスコア値と銅濃度間で相関分析を行った<sup>8)</sup>。EEM-PARAFAC の結果、スペクトルは 3 種類の HS 成分と、トリプトファン様物質に分離され、各 HS 成分のスコア値と銅濃度の間に負の相関が見られた ( $r = -0.78 \sim -0.77$ )。上述した研究では、PARAFAC 成分のスコア値により水質を明らかにできる可能性が示されたが、いずれの研究においても 90 ほどの試料を採水する過程で、多大な時間と労力がかかっていることに留意すべきである。本研究では、In-line-EEM を用いて、少量の試料から複数の HS 構成成分の挙動を明らかにする手法を開発した。この手法を水質評価に適用することで迅速かつ簡便な環境モニタリングが可能になる他、浄水処理過程において DBPs-FP を簡潔かつ高精度に予測できるようになると考える。今後の水環境および水処理分野への応用が期待される。

## 4. 結論

本研究では、超高速スキャン蛍光分光光度計を検出器とする In-line-EEM により、フミン質構成成分をより詳細かつ定量的に明らかにする手法を確立することを検討した。荒川中流から採取された河川水試料を用いて In-line-EEM 分析条件を検討した結果、励起波長範囲: 250~400 nm、蛍光波長範囲: 380~500 nm、および励起波長測定間隔: 5 nm に測定条件が最適化された。確立した In-line-EEM の自然水試料に対する有効性を検証するため、11 の河川水試料を In-line-EEM 分析に供し、各試料から得られた 3 次元配列の Trilinearity をランク分析で確認した結果、全試料において、生成された 3 次元配列が Trilinear であることが判明した。11 河川水試料から得られた 275 の EEM

スペクトルを PARAFAC 解析に供した結果、スペクトルは 4 種類の HS 成分に分離された。また、分離された成分のスコア値を算出することにより、挙動を把握することが困難とされる FA も含めた HS 成分の増減を把握することができた。以上より、本研究では、超高速スキャン蛍光分光光度計を用いた In-line-EEM により、HS 成分をより詳細かつ定量的に明らかにする手法を確立することができた。本研究で開発した手法を水質評価に適用することで、迅速かつ簡便な環境モニタリングが可能になる他、浄水処理過程において DBPs-FP を簡潔かつ高精度に予測できるようになると考えられる。

## 参考文献

- 1) 石渡良志, 米林甲陽, 宮島徹, 2011, 環境中の腐食物質 その特徴と研究法, 三共出版
- 2) Stephanie K. L. Ishii and Treavor H. Boyer, Behavior of Reoccurring PARAFAC Components in Fluorescent Dissolved Organic Matter in Natural and Engineered Systems: A Critical Review, Environ. Sci. Technol., 46, 2012
- 3) Kathleen R. Murphy et al, Chemometric Analysis of Organic Matter Fluorescence, 2014
- 4) Milagros Montemurro et al, Third order chromatographic-excitation-emission fluorescence data: Advances, challenges and prospects in analytical applications, Trends in Analytical Chemistry, 93, 119-133, 2017
- 5) Rasmus Bro and Henk A. L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, J. Chemometrics, 17, 274-286, 2003
- 6) Wen Chen et al, Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter, Environ. Sci. Technol., 37, 5701-5710, 2003
- 7) Liyang Yang, Daekyun Kim, Habibullah Uzun, Tanju Karanfil, Jin Hur, Assessing trihalomethanes (THMs) and N nitrosodimethylamine (NDMA) formation potentials in drinking water treatment plants using fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis, Chemosphere 121, 84-91, 2015
- 8) Masoumeh Heibati, Colin A. Stedmon, Karolina Stenroth, Sebastien Rauch, Jonas Toljander, Melle Sæve-Søderbergh, Kathleen R. Murphy, Water Research, 125, 1-10, 2017