

親水性・分子量により分離されたフミン質成分の河川流下に伴う変化

Changes of humic substances separated based on hydrophilicity and molecular weight on Tama River basin

22N3100041K 中野 晴喜 (水代謝システム研究室)
Haruki NAKANO / Sustainable Water metabolic system engineering Lab.

Key Words : Water quality, Fluorescent organic matter, HILIC, SEC, PARAFAC

1. 背景

河川にはさまざまな有機物流入源が存在する。代表的な有機物流入源として、下水処理水や農地を経由した排水などが挙げられる。フミン質 (Humic substances; HS) は、これらの排水に含まれる有機物の重要な構成要素である。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¹⁾。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²⁾。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²⁾。

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。EEM分析では、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することが可能になった。しかしながら、HSは多様な有機化合物の混合物であるため、EEMスペクトルだけにに基づき、HS構成成分を詳細に分離することは困難とされる。そのため、HS構成成分をより詳細に明らかにできる手法をHSの監視・制御に適用することが望まれている。

高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC) や高速サイズ排除クロマトグラフィー (High performance size exclusion chromatography; HPSEC) はHS構成成分を分離し、その親疎水性や分子量を推定するために用いられている。EEM測定の前段でHPLC、

HPSECにより、試料を親疎水性や分子量に応じて、分離することで、詳細なHS構成成分が得られるとされる。

以上の背景を鑑みて、本研究では、下水由来HSの監視・制御手法として、LC-EEM分析の適用可能性を検討することを目的とする。具体的には、河川流域10ヶ所から採水し、濃縮したHSサンプルに対し、EEM-PARAFAC分析、LC-EEM分析を実施することでその適用可能性を検証する。LC-EEM分析では、親疎水性に基づく分離を行うためHILIC (Hydrophilic interaction chromatography) を用い、分子量に基づく分離を行うためHPSECを用いて分析を実施する。

2. 実験方法

(1) 河川水の採取

2023年9月13および14日に多摩川流域10ヶ所から表流水1Lを採水した (上流から順にサンプル1~10とする)。サンプルは、実験室に持ち帰った後、直ちに0.5 μmのPTFE製メンブレンフィルターを用いて懸濁質を取り除いた。

(2) フミン質の濃縮

濾過した河川水サンプルは0.1 M HClによってpH2に酸性化した。DAX-8 (XAD-8) 樹脂を7g、固相抽出カートリッジ (エンプティリザーバー 6mL、ジーエルサイエンス株式会社) に充填し、河川水中のHSを濃縮した³⁾。

(3) 分析機器

EEMスペクトル測定は、蛍光分光光度計 (F-7100、日立ハイテクサイエンス製) を用いて測定した。

(4) EEM測定

EEM測定においては、励起波長範囲:250~400 nm、蛍光波長範囲:380~500 nm、およびスキャンスピード60000 nm/min、励起波長間隔:5 nm、蛍光波長間隔:2 nmとした。

(5) HILIC-EEM分析

HILIC-EEM分析においては、HILICからの溶出液をフラクションコレクターに分取した画分を対象とし、標準の石英セルを用いてEEM測定を行った。HILIC分析では、HPLC (Agilent 1260 InfinityLC、アジレントテクノロジー製) にアミド基結合型カラム (InertSustain Amide、10 mm × 150 mm、ジーエルサイエンス製) を装着した⁴⁾。移動相として、10 mMギ酸アンモニウムとアセトニトリルの

混合液を用い、ポンプ流量を2.5 mL/minとした⁴⁾。注入試料はアセトニトリル比率を85%となるように作成し、試料注入量を2.5 mLとした⁴⁾。

(6) SEC-EEM分析

SEC-EEM分析においては、照射容量180 μ Lのフローセルを装着した蛍光分光光度計をSEC分析の検出器として接続した。SEC分析では、HPLC（高速液体クロマトグラフ Chromaster 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⁵⁾。移動相には、リン緩衝液と硫酸ナトリウム（イオン強度 0.1M）の混合液を用い、ポンプ流量を0.1 mL/minとした。

(7) PARAFAC解析

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、CORCONDIA分析を用いてPARAFAC成分数を決定した⁶⁾。

3. 実験結果・考察

(1) EEM-PARAFAC分析

地点1~10のHS試料を用いてEEMスペクトル測定を行った。PARAFAC解析に供した。CORCONDIA解析の結果、PARAFAC成分数は3となり（表-1）、図-1に示すスペクトルが得られた。既往研究⁷⁾より成分1~3はフミン酸と推定された。

図-2は、成分1~3の採水地点1からの流下距離に対するスコア値を示している。成分1~3は全て類似した挙動を示した。採水地点3から6間、および採水地点8から9間にかけて成分1から3の濃度は上昇した。これは地点3と6間、および、地点8と9間に下水処理場が位置していることに起因すると推定する。

表-1 CORCONDIA 分析結果

Number of components	1	2	3	4	5	6
Core consistency (%)	100	77.32	31.8	-0.48	7.52	4.69

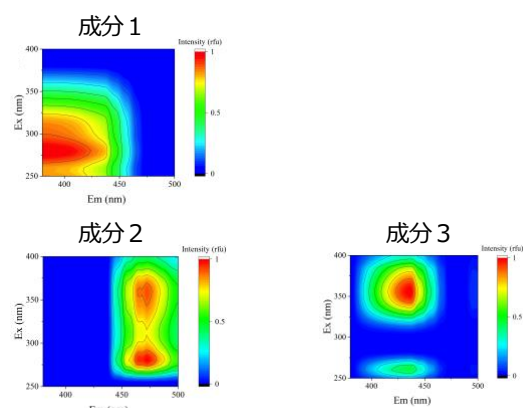


図-1 分離スペクトル

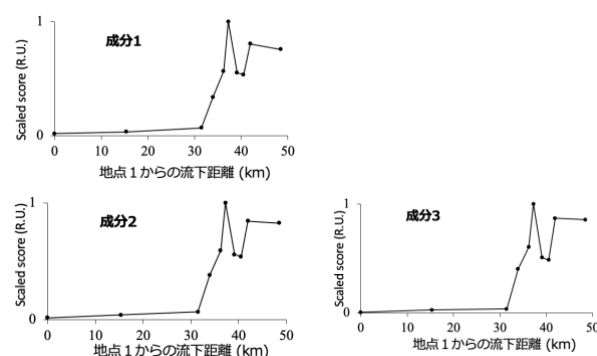


図-2 各PARAFAC成分の河川流下に伴う濃度変化

(2) HILIC-EEM-PARAFAC分析

地点1~10のHS試料をHILIC分析に供し、保持時間2~30分間に測定された28のEEMスペクトルを用いて、合計280のEEMデータセットを構築した。その後、構築したEEMデータセットをPARAFAC解析に供した。CORCONDIA解析の結果、PARAFAC成分数は3となり（表-2）、図-3に示すスペクトルが得られた。既往研究⁷⁾より成分1はフルボ酸、成分2,3はフミン酸と推定された。

HILIC-EEM-PARAFAC分析は、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、親疎水性分布を把握することができる。図-4に、HS試料をHILIC-EEM-PARAFAC分析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。全ての成分は保持時間2~9分、11~17分、27~28分にピークが確認された。保持時間2~9分のピークを疎水性画分、保持時間11~17分のピークを中程度親水性画分、保持時間27~28分のピークを親水性画分と定義し、それぞれのピークの面積値を算出した。図-5は、成分1~3の採水地点1からの流下距離に対するスコア値を示している。採水地点3から4間、および採水地点5から6間にかけて成分1から3の全ての画分の濃度は上昇した。これは地点3と4間、および、地点

5と6間に下水処理場が位置していることに起因すると推定する。また成分1に着目すると、採水地点4から5間にかけて、疎水性成分の濃度は上昇した。これは地点4と5間に、位置している市街地や住宅街からの生活排水に由来すると推定する。成分2に着目すると、採水地点9から10にかけて、疎水性成分の濃度が上昇した。これは、地点9と10間に下水処理場が位置しており、成分2の疎水性成分が特に多く含まれていると推定する。成分3に着目すると、採水地点9から10にかけて、中程度親水性画分の濃度が上昇した。これは、EEM-PARAFAC解析では捉えられなかった変化である。以上の結果より、EEM-PARAFAC分析では監視することのできなかったフミン物質成分が、HILIC-EEM-PARAFAC分析では監視できる可能性があることが本研究により示された。

表-2 CORCONDIA 分析結果

Number of components	1	2	3	4	5	6
Core consistency (%)	100	98.54	42.97	1.22	3.78	0.27

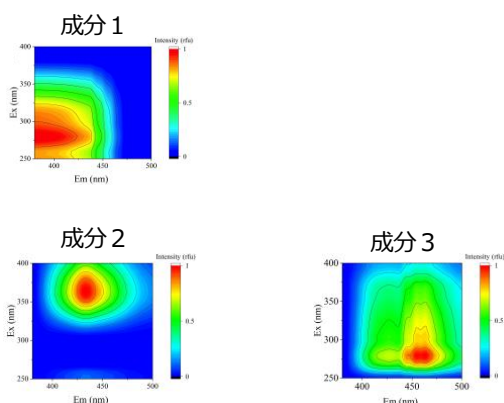


図-3 分離スペクトル

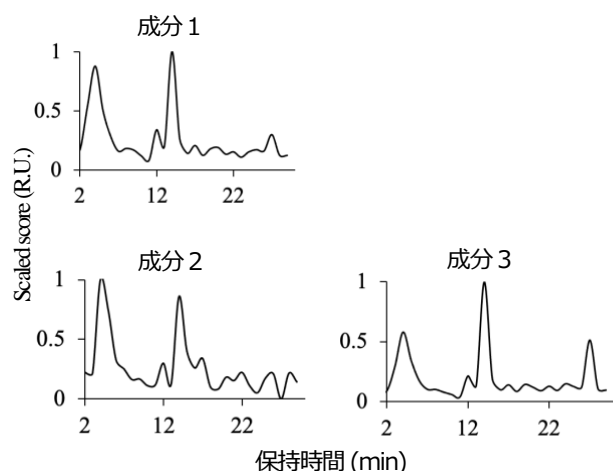


図-4 HS成分の親疎水性分布

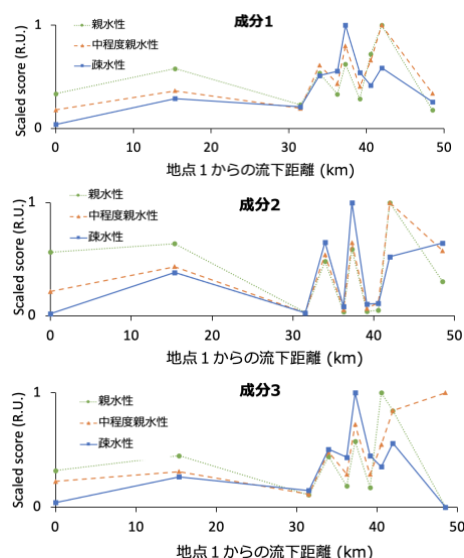


図-5 各PARAFAC成分の河川流下に伴う濃度変化

(3) SEC-EEMによるHS成分分析

地点1~10のHS試料をSEC分析に供し、保持時間91~130分の間に測定された39のEEMスペクトルを用いて、合計390のEEMデータセットを構築した。その後、構築したEEMデータセットをPARAFAC解析に供した。CORCONDIA解析の結果、PARAFAC成分数は5となり(表-3)、図-6に示すスペクトルが得られた。既往研究⁷⁾より、成分1,5はフルボ酸、成分2~4はフミン酸と推定される。図-7に、HS試料(サンプル8)をSEC-EEM-PARAFAC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。保持時間96~102分のピークを高分子画分、保持時間102~108分のピークを中程度高分子画分、保持時間108~114分のピークを低分子画分と定義し、それぞれのピークの面積値を算出した。保持時間2~9分のピークを疎水性画分、保持時間11~17分のピークを中程度親水性画分、保持時間27~28分のピークを親水性画分と定義し、それぞれのピークの面積値を算出した。図-8に、成分1~5の採水地点1からの流下距離に対するスコア値を示す。成分1~5の全ての画分の濃度は、採水地点3から4にかけて上昇した。これは、地点3と4間に下水処理場が位置していることに起因すると推定する。また成分1~5の高分子画分物質の濃度は、採水地点6から7および採水地点9から10にかけて上昇した。地点6から7にかけての高分子画分物質濃度の上昇は、下水処理場以外の土地から排出されたものと推定する。また地点9から10にかけての高分子画分物質濃度の上昇は、地点9と10の間に位置する下水処理場に高濃度の高分子画分物質が含まれていることに起因すると推定する。また、地点9から10にかけての濃度上昇はEEM-PARAFAC解析では捉えられなかった変化である。以上の結果より、EEM-PARAFAC分析では監視する

このできなかったフミン物質成分がSEC-EEM-PARAFAC分析では監視できる可能性があることが本研究により示された。

表-3 CORCONDIA分析結果

Number of components	1	2	3	4	5	6
Core consistency (%)	100	92.61	36.20	25.01	17.40	0.0022

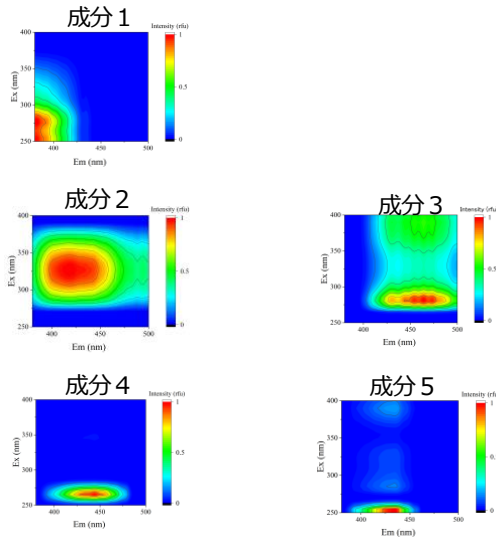


図-6 分離スペクトル

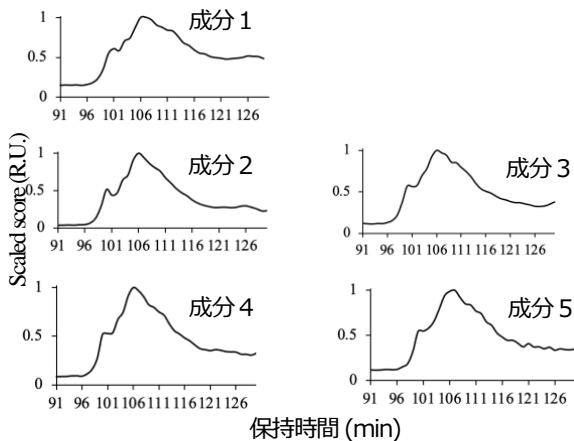


図-7 HS成分の分子量分布

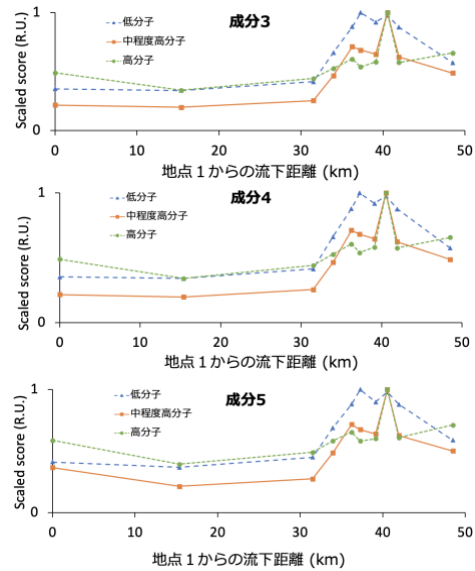
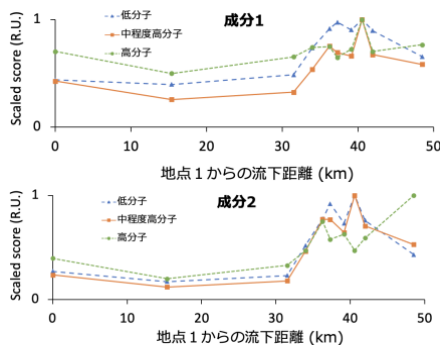


図-8 各PARAFAC成分の河川流下に伴う濃度変化

4 結論

本研究では、下水由来HSの監視・制御手法として、LC-EEM分析の適用可能性を検討した。10のHSサンプルをEEM-PARAFAC分析、HILIC-EEM-PARAFAC解析、SEC-EEM-PARAFAC解析に供した結果、スペクトルはEEM-PARAFAC分析およびHILIC-EEM-PARAFAC分析では3種類、SEC-EEM-PARAFAC分析では5種類に分離された。また河川流下に対する、分離された成分のスコア値を算出した結果、EEM-PARAFAC分析では捉えることができなかった下水由来HS構成成分を捉えることができた。以上より、HILICおよびSECを用いたLC-EEM分析を水質評価に適用することで、下水由来HS構成成分の監視・制御が可能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, 環境中の腐植物質—その特徴と研究法. 2008, 三共出版.
- 2) Ishii, S. K. L., Boyer, T. H., Behavior of Reoccurring PARAFAC Components in Fluorescent Dissolved Organic Matter in Natural and Engineered Systems: A Critical Review. Environ. Sci. Technol. 2012, 46, 2006–2017.
- 3) Rho, H., Chon, K., Park, J., Cho, J., Rapid and Effective Isolation of Dissolved Organic Matter Using Solid-Phase Extraction Cartridges Packed with Amberlite XAD 8/4 Resins. Water. 2019, 11, 67.
- 4) 青山正和. 腐植酸およびフルボ酸の蛍光成分. 日本腐植物質学会誌. 2022, 18, 3-14.
- 5) 山元雄太. 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. 中央大学大学院, 2020, 修士論文.
- 6) Bro, R., Kiers, H.A.L., A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. J. Chemometrics. 2003, 17: 274-286.
- 7) Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K., Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. Environ. Sci. Technol. 2003, 37, 5701-5710.