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, Shinzaize-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、パーソナの主なエネルギー源として利用され、あるいは有害金属や有機化合物などと鉱体をつくり毒性を変化させる働きをするなど、天然水の特質に大きな影響を与れている。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。

琵琶湖水平水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。これらには湖内での生物活動による生産被となったタンパク質・炭水化物やそれらの生分解生成物などの自生有機物、河川水から流入する土壌起源腐植質か人工有機化合物などの外来性有機物があるが、これらの有機質すべてを個別に分離・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。たとえ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、タンパク質様ピークをもつ有機物は140 m以下の表層に多く、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が明らかにされ、また琵琶湖における研究では、0.1μm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、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などが明らかにされている。しかし、日本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・腐植物質などの蛍光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. サンプリング

2005年4月28日に琵琶湖北湖NB17地点（北緯35°東緯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。採取した試水は、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1 M HCl・1 M HNO3混酸で洗浄を行なった孔径0.2 μmのスクリューフィルターでろ過し、ろ過ごした試水をポリカプラーント製容器に入れ、測定または処理を行なうまで4 ℃以下で保存した。Fig.1にサンプリング地点を示す。

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。

C18固定相抽出法による蛍光性溶存有機物の濃縮

ろ過試水を500 mlとし、濃塩酸を添加してpH2.2に調整し、C18固定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

未濃縮試水と濃縮試水の三次元励起蛍光スペクトル

Fig.2はC18固定相抽出法による濃縮を行う前の、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。未濃縮の試水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、濃縮後の試水では、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、テロシン様ピークと呼ばれている。

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。検量線作成用の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試水の測定は、ろ過ご試水を20 mlに2 N塩酸100 μlを加えた後、高圧力空気を十分通気して溶存有機酸を二酸化炭素として取り除いた後、680 ℃で燃焼させ、発生した二酸化炭素を計算から算出した。装置のプランク値はTOC-5000内蔵のプランクチェック機能により測定日ごとに測定した。

試水の測定は、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。

Fig.2 2005年8月彦根沿岸湖水 DOMの3DDEEMスペクトル

（濃塩酸添加により試水のpHを2.1に調整後）
溶媒液の組成の選択

500 mlのろ過湖水をCEC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を用いて溶媒を行い、蛍光性有機物を溶媒するのに最適な溶媒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湖水湖の水深2.5 mの湖水(DOC濃度1.38 mgC/L)を用いた。これら3種の溶媒液によって溶媒された試料の溶液とコレクターを測定し、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Figure 3 に示す。
50％の無蛍光メタノールによって溶媒化された場合は、腐植物質様ピークのみが明確に検出された。また、80％の無蛍光メタノールによって溶媒化された場合は、チロシン様ピーク2と腐植物質様ピーク1が検出される。このため、80％の無蛍光メタノールが最適な溶媒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媒
(単位: QSU)

<table>
<thead>
<tr>
<th>蛍光ピークの名称</th>
<th>50%</th>
<th>80%</th>
<th>100%</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>チロシン様ピーク1</td>
<td>260</td>
<td>270</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>(275nm/305nm)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>チロシン様ピーク2</td>
<td>250</td>
<td>210</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>(225nm/310nm)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>腐植物質様ピーク</td>
<td>100</td>
<td>110</td>
<td>100</td>
</tr>
<tr>
<td>(245nm/390nm)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

溶媒液量の検討

ろ過試料500 mlをCEC固相抽出カートリッジに担持させ、5 mlの無蛍光メタノールによって6回溶媒させ、溶媒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湖岸の表面層水(ポトル No.1) (DOC濃度3.38 mgC/L)を用いた。結果をFigure 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 回目の溶媒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。この結果より、チロシン様ピークと腐植物質様ピークをもつ溶媒操作に有効である。腐植物質様ピークは、10 mlの溶媒液によって、定量的に検出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の溶媒液では完全には回収できないと考えられる。

Figure 4 CEC固相抽出試料の蛍光ピーク強度の変化(80％メタノール溶媒により5 mlずつ計6回順次溶媒させた試料液が示した3種の蛍光ピーク強度変化)

CEC固相抽出法における回収率

2本の-facedアミノ酸にろ過した試料を500 mlずつ入れ、-80℃で凍結させた後、4℃で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湖岸の表面層水(ポトル No.2) (DOC濃度2.52 mgC/L)を用いた。結果をTable 2に示す。
凍結乾燥した試料を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CEC固相抽出法により濃縮した試料で得られた3種の蛍光ピーク強度に比較して、CEC固相抽出法における回収率を求めた。その結果、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>
<thead>
<tr>
<th>ピークの名称 （励起波長/蛍光波長）</th>
<th>回収率(%)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>チロシン様ピーク1 (280nm/310nm)</td>
<td>76.4</td>
</tr>
<tr>
<td>チロシン様ピーク2 (225nm/310nm)</td>
<td>72.6</td>
</tr>
<tr>
<td>腐植物質様ピーク1 (300mm/402nm)</td>
<td>92.2</td>
</tr>
<tr>
<td>腐植物質様ピーク2 (260nm/438nm)</td>
<td>89.6</td>
</tr>
<tr>
<td>腐植物質様ピーク3 (240nm/384nm)</td>
<td>105.2</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### CIs 固相抽出法の精度
2005年8月31日に採取した琵琶湖彫根沿岸の表層水(ボトルNo.1 DOC濃度3.38 mg/L)を用い、80%無蛍光メタノール10mlによる溶離を5回繰り返し、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CIs 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

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

### 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、CIs 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によら溶離させることで、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CIs 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、CIs 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
(2) Tranvik L.J., Hydrobiologia, 229, 107-114 (1992)
(4) Patterson H.H. et al., Humic and Fulvic Acid, American Chemical Society, Chapter18, 288-298 (1996)
(7) F.C. Wu et al., Biogeochem., 65, 245-257 (2003)
(8) K.M.G. Mostofa et al., Limnology, 6, 101-115 (2005)