

# 紫外線による分析前処理の基礎検討と 溶存態リン化学種のスペシエーションへの応用

横井 邦彦\*

## 1. 電気化学測定の前処理としての紫外線利用

電気化学的微量分析法であるストリッピングボルタンメトリーは吸着濃縮法を併用することで検出・定量できる金属イオンが拡大したが<sup>1)</sup>、試料である海水や河川水に含まれる特定の金属イオンの総濃度を求めるには、検出感度を低下させる界面活性剤や錯形成可能な有機物を分解する必要がある。酸や酸化剤による分解では試料の汚染が懸念されたため、筆者が在籍（1989～1991）したリバプール大学の Oceanography Laboratory では高圧水銀ランプで試料を 2～4 時間光照射することで共存有機物を分解していたが<sup>2)</sup>、光照射直後の試料温度が高く電気化学測定が速やかに行えないなど、若干の改善点があると感じていた。

低圧水銀ランプは室温付近での光が強く、高圧ランプからは放出されない 185 nm の光も利用できることを知り、電気化学測定の前処理法としての基礎検討を進める中で、高出力（400W）の低圧ランプ（合成石英製）を自作のランプボックスに設置して試料に光照射することで、水溶液中の界面活性剤や錯形成剤として汎用されていた化合物、アミノ酸、糖類、腐植物質などを室温下で良好に分解できることが分かった<sup>3-5)</sup>。また、光分解のメカニズムとして、従来溶存酸素からオゾンを経て生成するヒドロキシルラジカルが有機物分解に有効であると考えられていたが、185 nm の光により水から生成するヒドロキシルラジカルが分解反応において主たる役割を担っていることも示すことができた。その一方で塩化物イオン等 185 nm 付近に大きな吸収を持つ共存物質はヒドロキ

シルラジカルの生成を阻害することも明らかになった。

低圧水銀ランプによる光照射により電気化学測定の前処理が改善された後でも、この手法の新たな展開として、溶存態リン化学種のスペシエーションを進めることとなった。

## 2. リン化学種のスペシエーションの背景

リンは植物プランクトンの生育に必要な不可欠であり、食物連鎖の出発点である一次生産量を左右する重要な因子である。また、高濃度で存在すると海水や河川水などの天然水が富栄養化するなど、生命活動に大きな影響を与える元素である。そのため、水質を把握する上での一般的な項目として、その濃度測定は定常的に行われてきている。環境試料水中のリン化学種には様々な分類がなされているが<sup>6,7)</sup>、概ね粒子態と溶存態に分けられ、その各々が無機態と有機態に大別されている。最も一般的なリンの定量法は比色法に代表される無機態（オルトリン、以下 [P]）に応答する方法であり、有機態リン（以下 [OP]）は各種の分解法により無機態へと変換された後定量されていた。[P]の検出法に応答しない化学種として縮合リン酸イオン（ポリリン、以下 [PP]）があるが、有機態を分解する際に同時に分解されているため、[PP]や有機分子と結合した [PP]（ATP、ADP など）の濃度は有機態として数値化されていた。[PP]は水処理やバイオレメディエーションの工程で重要な要素であり、また、数十種類の食品などにおいて必要成分として添加使用されているなど、多

\*大阪教育大学名誉教授

様に用いられているため環境中に多量に放出されていると思われるが、特に注目されることはなく [PP] を測定する試みはほとんど報告されていない。近年、Martin と Van Mooy<sup>8)</sup> は抽出法と蛍光検出法を用いて北大西洋海域の生態系に存在する [PP] を定量し、リン欠乏を示す貧栄養海域では、微生物体内に貯蔵された [PP] の分解よりも [PP] の貯蔵を促進する経路があることを見出した。これは従来考えられていた様な [PP] が単なるリン緩衝剤とは基本的に異なる役割を果たしていることを強く示唆している。また、Diaz等<sup>9)</sup> は、植物プランクトンの持つ酵素により [PP] が [OP] よりも速やかに分解されることを示した。これは貧栄養水域では従来 [OP] が優先的に利用されると推察されていたことを覆し、一次生産量が [PP] により左右されている可能性を示唆したことになる。これらの研究が注目されることとなり、Li等<sup>10)</sup> により環境中での [PP] が持つ役割が新たに重要視されるべきとの認識が示されている。しかしその一方で、Martin と Van Mooy の採用した [PP] 定量法は、リンの重合度が低いと応答せず、二リン酸あるいは三リン酸、ATP や ADP については議論できない状況であった。すなわち、低い重合度の [PP] も含めた定量法を開発し、天然水中のリンのスペシエーションを進めることは、人間の活動の影響が大きい河川域の水質を深く理解することだけでなく、海洋のリン循環において新規な概念の構築につながる可能性が生じてきた。

### 3. 紫外線照射による溶存態リン溶存種のスペシエーション

従来開発されてきたリンのスペシエーション法は、濾過、抽出、共沈、加熱分解、酸加水分解、酸化分解などを組合せて分離し、比色法、ICP-AES、ICP-MS、蛍光 X 線、NMR などにより検出・定量しているが、全ての方法で [PP] は [OP] と同時に無機態 [P] へと変換され、定量されている。加水分解法は [PP] を無機態へ変換でき

るが、[OP] の一部も加水分解されるため、[PP] との分離は不十分である。酵素を用いた加水分解法は C-O-P 結合に加えて P-O-P 結合も切断するが、C-P 結合は切断しにくいなど複雑な側面があり、[PP] と [OP] の区別には現実的には適用できない。他方、紫外線を用いた有機物の光分解は環境科学分野では様々に利用されてきた<sup>11)</sup>。高圧水銀ランプは高温で使用されるため試料も加熱され、[OP] の分解と同時に [PP] が一部加水分解されてしまう。一方、低圧水銀ランプは通常空冷下用いられる。筆者はリンのスペシエーションを念頭においた予備的検討として、[OP] と低分子量 [PP] である二リン酸と三リン酸の混合物に光照射したところ、[OP] のみが定量的に分解・無機態化され、二リン酸と三リン酸はほとんど分解されないことを確認した。また、ATP に光照射するとアデノシン部分のみが分解され、三リン酸が生成されることを見出した。この研究を進展させ、[PP] を [OP] と区別して定量できる方法の開発を目指した。

### 4. スペシエーションの方法

光照射時はランプボックス下部からスポットクーラーで冷気を導入してランプを冷却し、ランプボックス上部に取り付けたファンで排気することで試料温度は 43℃ 以下に設定した。検出感度の改善ならびに安定化のため、試料ならびに吸収セルを (25 ± 2) °C の温度とした。

リンのスペシエーションは 3 段階で実施した。第 1 番目の [P] については、河川水などの天然試料を孔径 1.2 μm、次いで 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過した後、汎用されているモリブデンブルー法（以下 MoBL 法）で定量した（検出限界 (3σ) : 0.8 ppb (P)）。第 2 番目に、一定時間光照射を行った後に MoBL 法を実施し、第 1 番目の結果を差し引きすることで [OP] の濃度を求めた。[OP] の光分解効率 は 2-アミノエチルホスホン酸あるいはフィチン酸を標準試料として見積もった。第 3 番目に、試料にペルオキシソニ

硫酸カリウムを加え、121℃で60分間加熱した後、MoBL法を実施し、全リン（以下 [TP]）濃度を求めると同時に、照射後の結果を差し引きすることで [PP] の濃度を求めた。なお、光触媒用酸化チタンの共存下硫酸酸性で照射すると疑似天然水としての市販のナチュラルミネラルウォーター中では [PP] も良好に分解されたため<sup>12)</sup>、当初第3番目の操作も光分解で実施することを検討したが、実試料としての河川水では光触媒の被毒のためかポリリンの分解効率が低下する場合があったので、第3番目の操作は従来の全リン測定を採用した。

塩化物イオンや炭酸イオンなどの200 nm付近よりも短波長側の光を吸収する物質が共存すると、 $\cdot\text{OH}$  の生成が抑制されるために光分解効率が低下することが知られていたため、河川水試料で90%以上の光分解効率を得るために2時間以上の照射が必要な場合があった。また、河川水試料で炭酸イオンを多量に含む場合過塩素酸で試料をpH 2にすることで炭酸イオンの構造変化に伴い吸光度を低減させ、0.08%程度の過酸化水素を添加することで $\cdot\text{OH}$  の生成を増大させた。これらのような条件のもとで1時間の照射を行うことでほとんどの試料につき94%以上の光分解効率を得ることができた。

予備的な検討の中でC-O-P結合やC-P結合

をもつ各種の有機態リン化合物は定量的に光分解されることが見いだされていたが、天然に存在するであろうリン酸ジエステル結合をもつ [OP] や高分子量 [PP] の光分解に関する情報は皆無であった。市販のラムダDNAを500倍希釈した水溶液では、未処理の場合ほとんど [P] が検出されず、照射するとリン酸ジエステル結合の95%以上が分解された。Bis (4-methylumbelliferyl) phosphateでも同様な結果が得られた。また、EXポリリン酸<sup>®</sup>ナトリウム（重合度14及び130）の10万倍希釈水溶液でも未処理の場合ほとんど [P] が検出されず、加熱分解時に放出された [P] に対して照射後は3%程度しか [P] が増加なかった。これらの結果は、低分子量の化合物と同様の光応答が高分子量の [OP] や [PP] についても見られたことを示している（表1）。

## 5. スペシエーションの結果

2017~2018年に大阪府及び奈良県下の17地点で採水した河川水について、全リン濃度に対する割合で有機態リンが0~63%、ポリリン態が0%~48%と見出された。このとき全リン濃度は0.018~0.469 ppm (P) で分布した。また大阪府南部春木川上流・中流・下流の3地点を定点として半年間測定したところ、時期や時間帯により各リン化学種の存在量も変化することも見出された。

表1. 高分子ポリリン酸とリン酸ジエステルのスペシエーション

	オルトリン	誤差	60分間 光分解後	誤差	全リン	誤差
EX ポリリン酸 <sup>®</sup> ナトリウム（リンとして0.5 M 溶液を10万倍希釈→155 ppb (P)）						
N = 14	4.3	0.1	8.4	0.4	169.0	2.3
割合 (%)	2.5		5.0		100.0	
N = 130	1.0	1.1	5.2	0.0	171.0	0.3
割合 (%)	0.6		3.0		100.0	
ラムダDNA（ニッポンジーン）(48502 bp, 0.57 μg / μL, 500倍希釈→109 ppb (P)）						
	1.4	0.1	115.2	0.6	119.9	1.6
割合 (%)	1.2		96.1		100.0	
Bis (4-methylumbelliferyl) phosphate (93.2 ppb (P) 溶液を調製)						
	2.8	1.3	88.8	0.0		
割合 (%)	3.0		95.3			

濃度の単位は単位は ppb (P)

2021～2023年の結果を以下に紹介する。図1に大和川水系国豊橋での採水試料の結果を示した。[P]、[OP]、[PP]の存在比率が分かりやすいように左には同じスケールで、右には[OP]と[PP]の濃度を拡大している。「211027」は採水日が2021年10月27日であり、「大阪91」は大阪府が作成している「公共用水域及び地下水の水質測定計画」に記載の水質測定地点図中の番号である。溶存態リンのほとんどが[P]であるが[OP]が20 ppb (P)を超える程度、[PP]も数ppb (P)ではあるが存在していることが分かる。同じ大和川水系の落堀川でも高濃度の[P]に加えて少量の[OP]と[PP]が検出されるとの類似の結果が得られたが(図2)、時期が異なると(図3)[OP]よりも[PP]の方が多量に検出される場合があった。一方同じ大和川水系で若干上流域の千早川(図4)では各種溶存態濃度が激減し、特に[OP]は検出されなかった。これらの河川では農業をはじめとする人的活動の影響が大きく表れていると考えるが、[OP]や[PP]について単に人工的

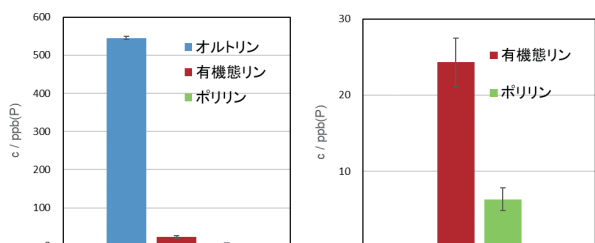


図1. 211027 国豊橋左岸 (大阪 91)

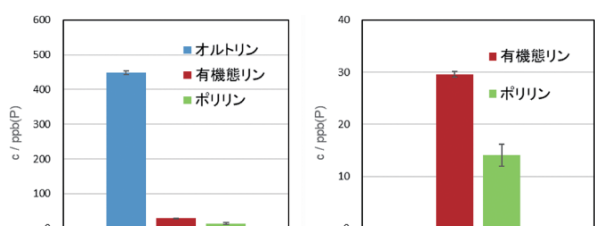


図2. 220525 落堀川 (東除川合流直前, 大阪 96)



図3. 221214 落堀川 (東除川合流直前, 大阪 96)

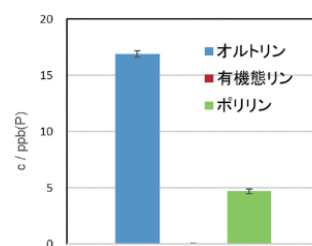


図4. 220727 千早川 (石川合流直前, 大阪 85)

な投入によるものか環境中の生命活動の関わりがあるのか不明である。また、琵琶湖へ流入する十禅寺川と葉山川では、周辺のリンの使用が厳しく制限されていることもあってか全ての形態のリンが低濃度であり、[PP]もほとんど検出されなかった(図5)。さらには、大阪府営公園内の池水では溶存態リンの濃度が低い中で[P]及び[PP]に比して[OP]の比率が大きいことが見いだされた(図6)。加えて、大阪南港魚釣園の海水からは溶存態の濃度が極めて低く[PP]は検出されなかった(図7)。これらの測定結果は採水場所周辺の土壌、植生、降下物、採水前の天候などに加えて様々な人的影響が総合的に影響を与えていると考えるが、詳細については本研究の範囲を上回るものである。少なくとも従来の[P]と[OP] + [PP]の測定からは予測することが困難であり新たな指標となる可能性も期待される。

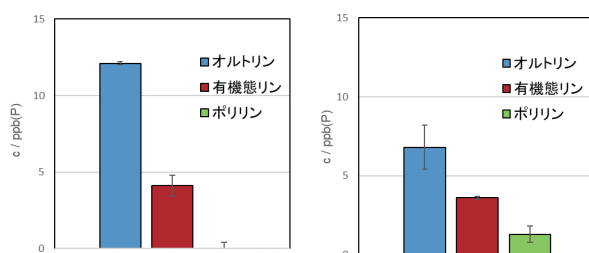


図5. 221109 十禅寺川 (滋賀県 7-1) (左) と葉山川 (滋賀県 8-1) (右)

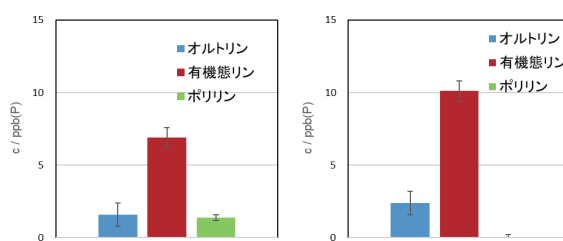


図6. 220310 (左) 及び 220616 (右) 山ヶ池 (服部緑地)

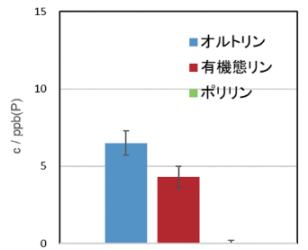


図7. 230228 大阪南港魚釣園

## 6. 未ろ過で保存中の溶存種濃度の変化

河川水試料を採水後にろ過後冷蔵した場合、ろ過直後と3週間経過後のスペシエーション結果には大差が見られなかった。すなわち、[P]、[OP]並びに[PP]はろ過・冷蔵により容器内壁へ吸着して除かれることや微生物活動による濃度の増減は顕著には起こらないと考えている。その一方で、採水後未ろ過のまま室温で放置した試料では、採水直後にろ過した場合と2週間程度経過後にろ過した場合で濃度に差が見られることに気づいた。そこで、採水後、未ろ過のまま室温下で数週間振とうした後に、ろ過、測定を試みたところ、各種溶存態に濃度変化が見られることがあった。採水後に密閉した状態で振とうしており、溶存酸素濃度や振とう中に受ける光量などの条件や、採水時期などは統一されていないもとの結果ではあるが、以下に記す。まず、大和川水系落堀川では[P]並びに[OP]の濃度が減少し、[PP]が増加した(図8)。一方、時期は異なるが落堀川と合流直前の東除川では、[P]はほとんど変化せずに[OP]が増加し[PP]が減少した(図9)。これら河川の上流域の千早川(図10)では、[P]並びに[PP]に減少傾向が見られ、[OP]が若干増加した。また、大阪府営公園内の池水では[P]の増加、[OP]の減少傾向が見られたものの[PP]にはほとんど変化がなかった(図11)。さらには大阪南港魚釣園の海水では[P]に増加傾向が見られたが、[OP]と[PP]ではほとんど変化がなかった(図12)。これらは系が閉じられた後での変化であり、系内の微生物などによる生命活動や懸濁態との間の吸脱着により溶存種濃度が変化したことと思われるが詳細については今後

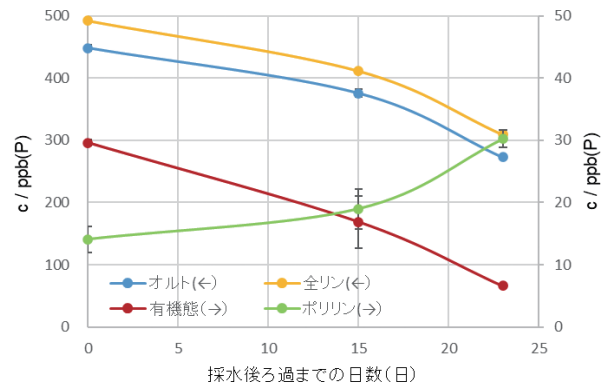


図8. 220525 落堀川(東除川合流直前)未ろ過, 室温保存(継続振とう)

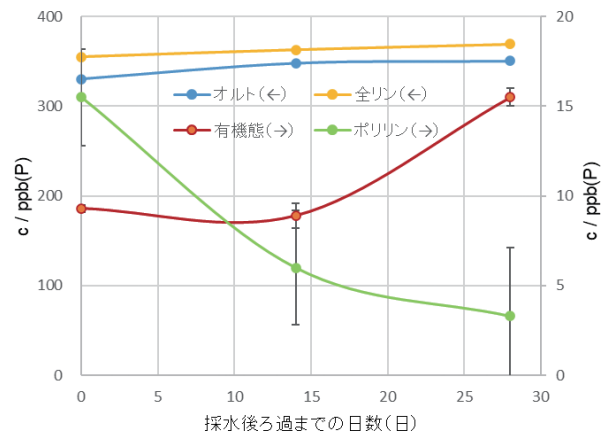


図9. 230302 東除川(落堀川合流直前)

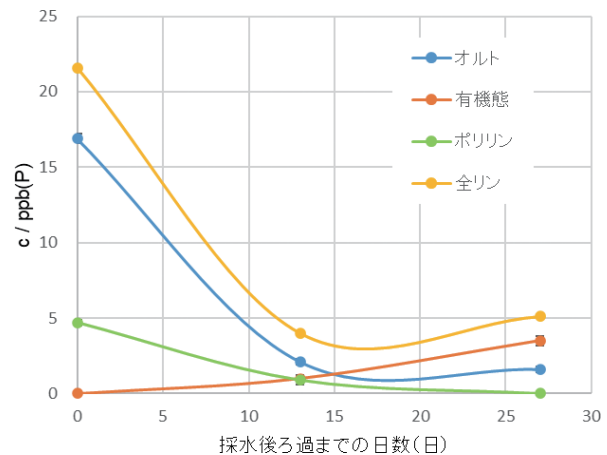


図10. 220727 千早川(石川合流直前), 未ろ過, 室温保存(継続振とう)

のさらなる検討が待たれる。

本研究での手法で[OP]と[PP]を区別して溶存態リンのスペシエーションを実施できることが示された。連続流れ分析法による高感度化や、懸濁態の量などとの関係が明らかになれば、水圏環境の認識の深化が期待できると考える。

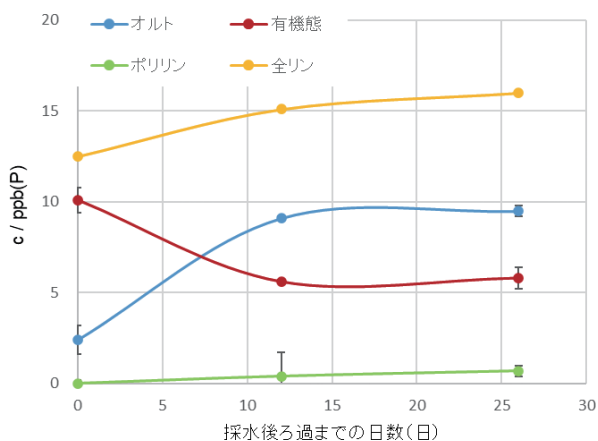


図 11. 220616 山ヶ池 (服部緑地)

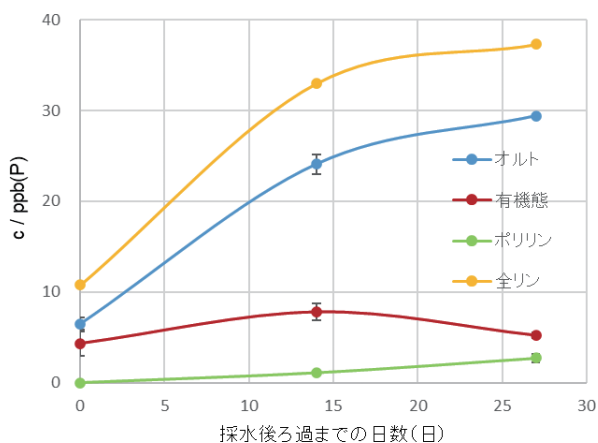


図 12. 230228 大阪南港魚釣園

## 7. 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 JP20K05553 (研究代表者：横井邦彦) を用い行われた。

## 8. 参考文献

- 1) C. M. G. van den Berg: *Anal. Chim. Acta*, **250**, 265 (1991).
- 2) C. M. G. van den Berg, M. Boussemart, K. Yokoi, T. Prartono, M. L. A. M. Campos: *Mar. Chem.*, **45**, 267 (1994).
- 3) K. Yokoi, M. Tomisaki, T. Koide and C. M. G. van den Berg: *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **352**, 547 (1995).
- 4) K. Yokoi M. Yakushiji, M. Hatanaka, K. Kubono and T. Koide: *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **365**, 364 (1999).
- 5) K. Yokoi, Y. Kuratani and K. Kubono: *Anal. Sci.*, **18**, 1155 (2002).
- 6) 「海と湖の化学」藤永太一郎 監修, 宗林由樹一色健司 編, p. 497, 京都大学学術出版会 (2005).
- 7) 杉山雅人, 望月陽人, *地球環境* **20**, 35 (2015).
- 8) P. Martin and B. A. S. van Mooy: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 273 (2013).
- 9) J. M. Diaz, A. Holland, J. G. Sanders, K. Bulski, D. Mollett, C.-W. Chou, D. Phillips, Y. Tang and S. Duhamel: *Front. Mar. Sci.*, **5**, 380 (2018).
- 10) J. Li, D. Plouchart, A. Zastepa and M. Dittrich: *Sci. Rep.* **9**, 19563 (2019).
- 11) J. Golimowski and K. Golimowska: *Anal. Chim. Acta*, **325**, 111 (1996).
- 12) 西 崇伺, 平康剛大, 久保塾公二, 横井邦彦: *BUNSEKI KAGAKU* **59**, 659 (2010).