

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05553

研究課題名(和文)水圏環境認識を深化させる溶存態リン化学種のスペシエーション法の高機能化と応用

研究課題名(英文) Advancement and application of the method for speciation of dissolved phosphate for deep investigation of aquatic environment

研究代表者

横井 邦彦 (Yokoi, Kunihiko)

大阪教育大学・教育学部・名誉教授

研究者番号：30144554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然水中の溶存態リン化学種には無機態のオルトリンに加えて有機態リンとポリリンがあるが、従来のリンの定量法ではオルトリンの定量の後、ポリリンと有機態リンを合わせて定量していた。本研究では高出力の低圧水銀ランプから照射される185 nmの光を効率よく利用することで、ppb(P)レベルの有機態リンをオルトリンへ分解した後定量する方法を開発し、河川水中などのポリリンを有機態リンと区別して定量することに成功した。併せて、室温で保存していた試料中のポリリンと有機態リンの濃度変化も追跡することができた。今後の環境中のリンの循環を研究する上で新たな指標を提供することが可能であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンは生物にとっての必須元素であり核酸、細胞膜や骨などの主要成分である。河川域や海洋のリンの循環は自然界の生命の営みを理解する上で極めて重要であり、近年無機態が重合したポリリンの役割が注目されているが、従来の定量法ではポリリンと有機態リンの濃度を合わせて定量していたため、ポリリン自体の役割を明確に把握することができていなかった。本研究ではポリリンを有機態リンと区別して定量する方法を開発し、河川水などの天然試料へ応用することに成功した。今後のリンの循環を研究する上で新たな展開に向けて貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Although polyphosphates, in addition to orthophosphates and organophosphates, present in natural waters, conventional methods have determined only the concentrations of orthophosphates and total amount of organophosphates and polyphosphates. In this research photolytic decomposition method of organophosphates to orthophosphates with irradiation of 185 nm ultra-violet light from low-pressure mercury lamp has been developed and were successfully used to determine the concentrations of organophosphates and polyphosphates separately. Further, the concentration changes of these group of species over days in the sample solution have also been observed. This method could offer the new aspects in the research for environmental phosphorous circulation.

研究分野：分析化学

キーワード：リン 光分解 低圧水銀ランプ ポリリン スペシエーション

1. 研究開始当初の背景

リンは植物プランクトンの生育に必要不可欠であり、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は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（以下ポリリン，[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、技術的な理由で [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、多様に用いられているため環境中に広く存在しているが、現行のリン定量法では定量できていない。環境関連分野においては、Martin と Van Mooy¹⁾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²⁾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³⁾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、本研究では、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重要な課題であると認識した。

2. 研究の目的

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。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な利用されてきた⁴⁾。光分解の特徴は、前処理操作中の汚染が少ないことである。光源としては高圧水銀ランプ（以下 H-Hg）が多く使用され、H-Hg から放射される主たる輝線（254 nm と 365 nm）は高温になるほど輝度が上がり、有機物の分解効率が上がる。一方、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。すなわち、H-Hg を用いた場合でも、[PP]と[OP]を区別して定量することはできない。一方、低圧水銀ランプ（以下 L-Hg）から放射される輝線は 185 nm と 254 nm であり、ランプ温度が低いほど 185 nm の放射強度が大きくなる。すなわち、通常 L-Hg は冷却下用いられる。また、185 nm の光が水溶液に照射されると水が分解してヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）が生成され、 $\cdot\text{OH}$ の強い酸化作用により溶存有機物が分解される。本研究代表者はこれらの L-Hg の特徴に注目し、空冷下で 400 W の L-Hg を用いて、ランプ周囲に石英製の試料容器を配置し、光照射したところ、天然水中に存在するほとんどの有機化合物が短時間で分解できることを見出した^{5)~7)}。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⁸⁾。この研究を発展させ、[PP]を[OP]と区別して定量できる方法の完成に至らせ、実試料への応用にまで繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬並びに装置

試薬は市販品をそのまま用いた。光照射には 400W 低圧水銀ランプ（FUV 400US-1, 発光長 500mm, セン特殊光源）を、ランプボックスは研究代表者が設計したアルミニウム製を用いた。試料は石英製試験管（内径 20 mm, 長さ 100 mm）に入れ、ランプに近接するように周囲に吊り下げた。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した。[P]はモリブデン青（アスコルビン酸

還元) 吸光度法 (以下 MoBL 法) により定量した。この時検出感度の改善ならびに安定化のため、吸光度データのアナログ出力をアンプで増大させると共に、試料ならびに吸収セルを (25 ± 2) °C の温度とした。検出限界 (3 σ) は 0.8 ppb(P) であった。

(2) 手順

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]の定量については、市販試薬から調製した試料はそのままの状態、河川水などの天然試料については孔径 1.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した後、さらに孔径 0.22 μm のフィルターでろ過したろ液について MoBL 法を実施した。第2番目の[OP]の定量については、一定時間 L·Hg で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番目の[PP]の定量については、第2番目のろ過操作により得られたろ液にペルオキシニ硫酸カリウムを加え、121°C で 60 分間加熱した後に MoBL 法を実施し、全リン (以下[TP]) 濃度を求めると同時に、第2番目の結果を差し引きすることで[PP]の濃度を求めた。なお、河川水などの天然試料はプラスチック容器で採取し、0.1 M の硝酸を数日間満たした後に超純水で洗浄した高密度ポリプロピレン容器に保存し、特に記さない限り採水後すみやかにろ過した後定量操作を実施するまで冷蔵した。

4. 研究成果

(1) 光分解効率改善の試み

予備的な検討の中で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、・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 時間以上の光照射が必要な場合があった。185 nm 光は水溶液中で 10 mm 程度進む間にほとんどが減衰するため⁹⁾、溶液全体を効率よく照射するために試料溶液を窒素ガスや酸素ガスあるいは物理的な攪拌などで補おうとしたが、分解効率が上昇した一方で、攪拌を伴う光照射準備などが分析操作を非効率なものとした。照射光を増強するためにランプボックス内に反射板を設置することで分解効率が上昇したが、反面ランプの温度が 60°C を超えることもあり[PP]が熱分解する懸念があった。ランプボックス上下に設置してあったファンを能力の高いものに交換しても効果的ではなかった。ランプ横に湿らせたガーゼを設置し気化熱による冷却を試みたところ試料温度が低下し光分解効率が上昇したが、こちらも分析操作全体では非効率であった。そこで、下部のファンに変えてスポットクーラーを設置すると試料溶液内の温度を高くとも 43°C 以下に抑えることができた。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・OH の生成を増大させた。これらのような条件のもとで 1 時間の光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。

(2) リン酸ジエステル結合をもつ[OP]と高分子量[PP]のスペシエーション

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 (図 1) 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、光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[®]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]に対して光照射後は 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

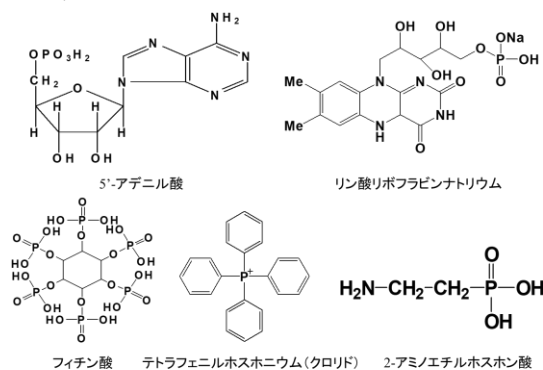


図1 光分解の基礎検討に用いた有機態リン化合物

	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 [®] 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)						

(3) 河川水試料などのスペシエーション

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3), 時期が異なると(図4) [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5)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6)。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を見いだされた(図7)。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。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環境評価の指標となる可能性も期待される。

(4) 未ろ過で保存中の溶存種濃度の変化

河川水試料を採水直後に孔径 0.22 μm のフィルターでろ過後に冷蔵した場合、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9)。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10)。これら河川の上流域の千早川(図11)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12)。さらには

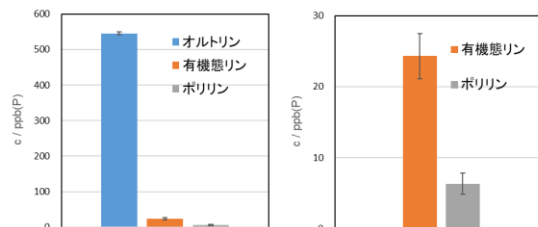


図2 211027国豊橋左岸(大阪91)

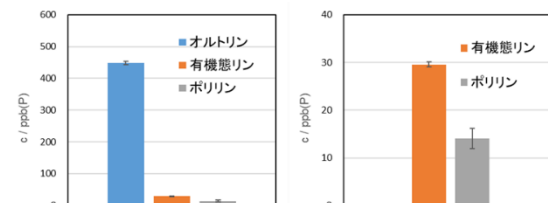


図3 220525落堀川(東除川合流直前、大阪96)



図4 221214落堀川(東除川合流直前、大阪96)

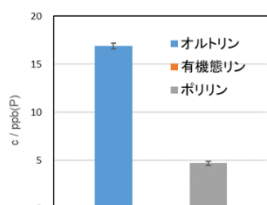


図5 220727千早川(石川合流直前、大阪85)

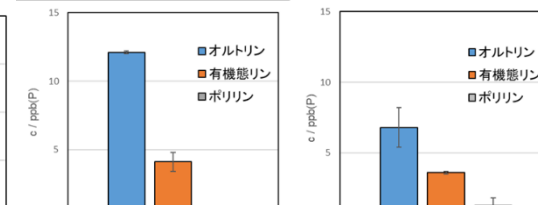


図6 221109十禅寺川(滋賀県7-1)(左)と葉山川(滋賀県8-1)(右)

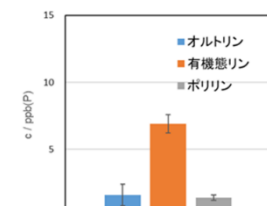


図7 220310(左)及び220616(右) 山ヶ池(服部緑地)

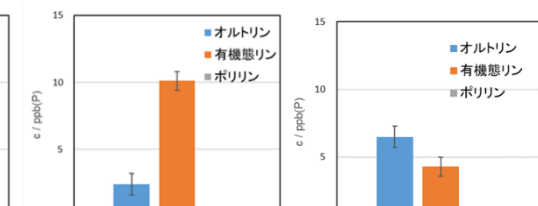


図8 230228大阪南港魚釣園

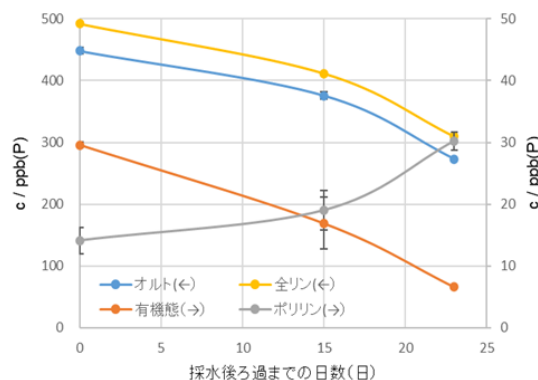


図9 220525落堀川(東除川合流直前、大阪96)

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13)。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のさら

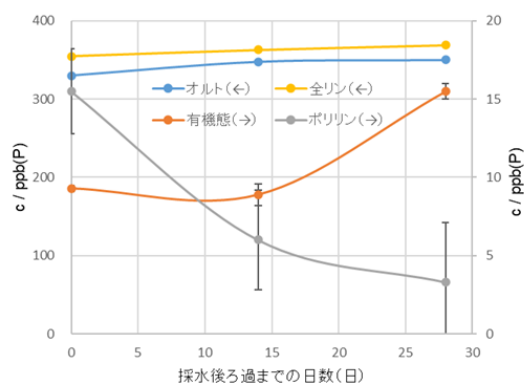


図10 230302東除川(落堀川合流直前)

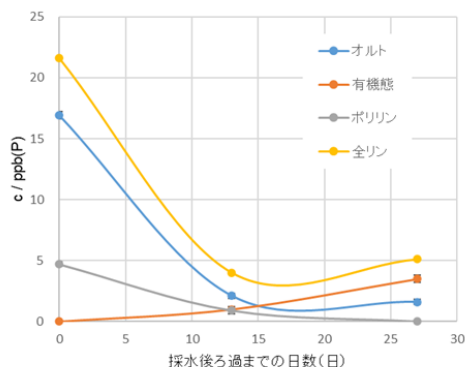


図11 220727千早川(石川合流直前、大阪85)

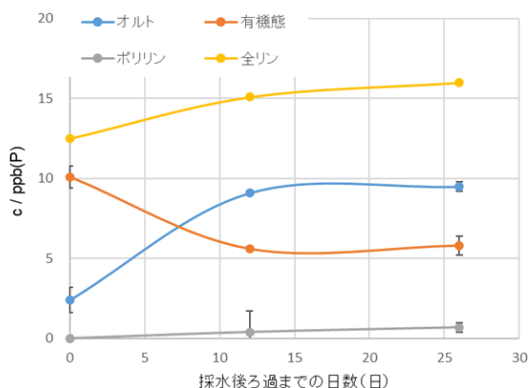


図12 220616山ヶ池(服部緑地)

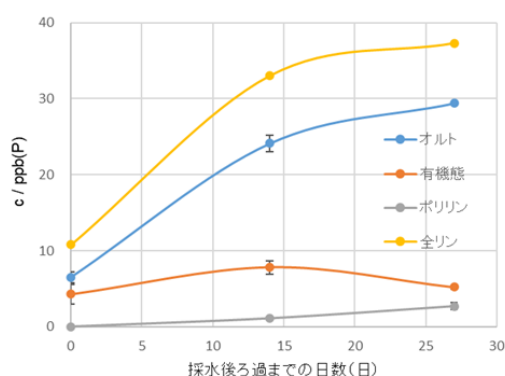


図13 230228大阪南港魚釣園

なる検討が

待たれる。ろ過の際には試料溶液を約 500 mL 使用したが、ろ紙上に残った懸濁物を乾燥し、卓上型の簡易蛍光 X 線分析装置でリンの $K\alpha$ 線強度を測定した結果を千早川について図 14 に示した。溶存態の濃度の減少に伴ってろ紙上にトラップされたリンの量が増加しているように見え、溶液中の[P]や[PP]が微生物の増殖に利用されているとの仮説も想起されるが、変化率などは合理的に説明されない。いずれにしても本研究での手法で[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

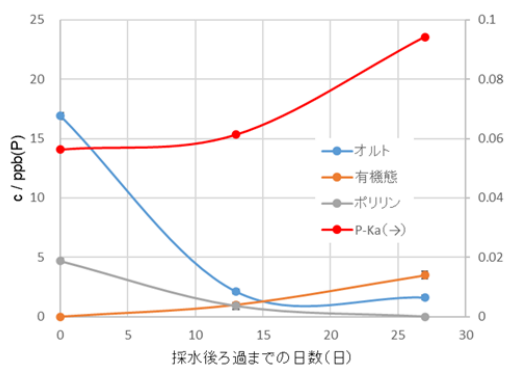


図14 220727千早川(石川合流直前、大阪85)

されたものの、結果の理解には至っていない。連続流れ分析法による高感度化や、一部示した懸濁態の量などとの関係も含めると、水圏環境の認識の深化が期待できると考える。

<引用文献>

- 1) P. Martin and B. A. S. van Mooy : *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 273 (2013).
- 2) J. M. Diaz et al. : *Front. Mar. Sci.*, **5**, 380 (2018).
- 3) J. Li et al. : *Sci. Rep.* **9**, 19563 (2019).
- 4) J. Golimowski and K. Golimowska : *Anal. Chim. Acta*, **325**, 111 (1996).
- 5) K. Yokoi et al. : *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **352**, 547 (1995).
- 6) K. Yokoi et al. : *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **365**, 364 (1999).
- 7) K. Yokoi et al. : *Anal. Sci.*, **18**, 1155 (2002).
- 8) 西 崇伺 等: *BUNSEKI KAGAKU* **59**, 659 (2010).
- 9) K. Zoschke, H. Börnick, E. Worch : *Water Res.* **52**, 131 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横井邦彦、山中雄介、永江あゆみ、久保埜公二
2. 発表標題 光分解を用いた溶存態リンのスペシエーションと分解効率に及ぼす過酸化水素の効果
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横井邦彦、久保埜公二
2. 発表標題 環境水中の溶存リン化学種のスペシエーション - 有機態リンとポリリン濃度の経時変化
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保埜 公二 (Kubono Koji) (00269531)	大阪教育大学・教育学部・教授 (14403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------