溶存有機物の細分画による特性把握と

有機汚濁指標との関係

大阪市立環境科学研究所 浅川 大地

1. はじめに

近年の河川や湖沼水質の改善にともない、有機汚濁指標として用いられてきた化学的酸素要求量(COD)や生物的酸素要求量(BOD)といった従前の指標だけでは、生物の生息環境や水化学処理において問題になる水質を判断することが困難になってきた[1]。それは、水質管理の課題がより高度化したことに加え、CODやBODが有機物のどのような特性を表しているのかが曖昧であることに起因する。特にCODは、過マンガン酸カリウムに酸化されうる有機物量を酸素消費量として間接的に示しているに過ぎず、有機汚濁指標としての意義は不明瞭である。そのために、CODを全有機態炭素(TOC)に変更すべきだという議論が数十年続いているが、結論は出ていない。CODの有機汚濁指標としての見直しや再評価を行うためには、水環境中の有機物の詳細な特性とCODとの関係を明らかにする必要がある。

複雑で連続的な混合物である環境水中の有機物の特性を調べるためには、有機物を何ら かの方法で分離分画してグループ分けし、その特性を分析することが効果的である。例え ば、難分解性有機物である腐植(フミン)物質は、疎水性樹脂とイオン交換樹脂を用いた 吸着クロマトグラフィーによって得られる一つの画分である。この疎水性樹脂による分画 法は、水環境や土壌中の有機物を「親水性一疎水性」や「酸性-塩基性」によって分画す る方法として一般的に使用されている。この方法によって有機物を分画し、フミン物質(疎 水性酸性)画分のみでなく親水性酸性画分も難分解性を示すこと[2,3]が明らかになってい る。一方、有機化合物の物理的大きさも化合物の動態や反応性に関与するため、「分子サイ ズ」による分画法も水環境や土壌中の有機物の構造特性や機能性を詳しく調べるために使 用されている[4,5]。分解性に関しては、高分子サイズの溶存有機物画分の方が生分解され やすいこと[6]が報告されている。このように、「親水性一疎水性」と「酸性一塩基性」、「分 子サイズ」は有機混合物を物理化学的特性に従って分画するのに有用である。

そこで本研究では、これらの物理化学的特性に基づいた分画法を組み合わせて溶存有機物(DOM)を細分画し、各画分の構造特性解析や COD 測定によって、溶存有機物の構造 特性と COD 値との関連性を探求することを目的とする。

2. 試料と方法

2.1 水試料の採取

水試料の採取容器にはポリエチレン製のキュービテナーを使用した。容器は使用前 に希塩酸と蒸留水で洗浄した。滋賀県琵琶湖環境科学研究センター所有の実験調査船 にて、琵琶湖北湖の定期調査測定点(緯度;35.3821、経度;136.0983)の表層水を採 取した。採水は2013年12月19日午前中に実施し、多項目水質プロファイラー(F-probe) で測定した採取時の水温は12.3℃、電気伝導度は124.5 µS/cm、溶存酸素濃度は9.3 mg0/L、濁度は2.7 FTUであった。

2.2 溶存有機物の樹脂分画

試料水(約100L)を研究室に持ち帰り、孔径 3 μ m(Advantec、TCP-3-S1FE)と0.45 μ mのカートリッジフィルター(Advantec、TCR-045-S1FE)にて逐次ろ過した。ろ過し た試料水の一部はそのまま冷暗所(5℃)で保存し、残りの試料水には塩酸を加えて酸 性化(pH 2以下)してから冷暗所にて保存した。

ろ液中の溶存有機物 (DOM) を樹脂吸着ク ロマトグラフィーによって分画した。本研究 では、Leenheer[7]と Aiken[8]の方法を参考 にした (図1)。樹脂には Supelite DAX-8 (Supelco)、Amberlite XAD-4 (Sigma-Aldrich),陽イオン交換樹脂 (AG

MP-50, Bio-rad)、陰イオン交換樹脂 (AG MP-1, Bio-rad)を用いた。DAX-8 樹脂と XAD-4 樹脂 は使用前にジメチルエーテルとアセトン、ア セトニトリル、メタノールを用いて各 24 時 間以上ソックスレー抽出器で洗浄し、さらに 0.1M NaOH 溶液と 0.1M HC1 溶液で繰り返し浸 漬洗浄を行った。AG MP-50 樹脂と AG MP-1 樹脂は使用前に 1M NaOH と 1M HC1 で繰り返 し浸漬洗浄を行い、AG MP-50 樹脂は H⁺型に AG MP-1 樹脂は OH⁻型にして使用した。

DAX-8、XAD-4、AG MP-50、AG MP-1の各樹 脂を脱気処理してから、それぞれ 90 mL、85 mL、 45 mL、45 mL をガラス製カラムに湿式充てん した。これらのカラムを直列に接続し、酸性 化した DOM 溶液を送液ポンプ(Masterflex, model 7016-20)を使用して 20 mL/min の流 速で通過させた。約 10 L の DOM 溶液を通過 させる毎に各カラムの溶出液中の TOC 濃度を 測定した。DAX-8 樹脂への吸着炭素濃度が初 期値の 1/2 になるまで試料水を通過させた

(90 L) [7]。



図 1 樹脂吸着クロマトグラフィー による DOM の分画

試料水通過後、DAX-8 樹脂を試料水の通過方向とは逆方向から 0.1M NaOH で溶出して 疎水性酸性画分(Hydrophobic Acids; HoA)を得た。HoA 画分は新たな AG MP-50 樹脂 カラム(H⁺型)に通過させて Na⁺を除去した。さらに、DAX-8 樹脂から 75%アセトニト リルで有機物を溶出して疎水性中性画分(Hydrophobic Neutrals; HoN)を得た。TrA 画分は減圧濃縮によってアセトニトリルを留去した。XAD-4 樹脂も同様に有機物を溶出 し、Transphilic 酸性画分(Transphilic Acis; TrA)と Transphilic 中性画分 (Transphilic Neutrals; TrN)を得た。

AG MP-50 樹脂と AG MP-1 樹脂は、それぞれ 1M NH₄(OH)と 3M NH₄(OH)で溶出し、親水 性/疎水性塩基性画分(Hydrophobic/Hydrophilic Bases; Hi/HoB)と親水性酸性画分 (Hydrophilic Acids; HiA)を得た。Hi/HoB 画分とHiA 画分は、減圧濃縮によってア ンモニアを留去した。

2.3 溶存有機物の分子サイズ分画

2.2 で得られた各画分をさらに高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)によっ て 3 画分に分けた。HPSEC カラムには、Asahipak GS-220 HQ (Shodex、7.5 mmI.D. x 300 mm、排除限界分子量; PEG 換算 3,000)にガードカラム(Asahipak GS-2G 7B、 Shodex、 7.5 mmI.D. x 50 mm)を接続して使用した。移動相には 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) とアセトニトリルを 4:1 で混合した溶液を使用した。液体クロマトグラフは Agilent 製 HP1100 を使用し、紫外可視吸光光度検出器 (Agilent、G1314A) で 260nm の吸光度を検出した。なお、カラムや分離条件は DOM の低分子領域の分画を目的とし て検討し、低分子領域の溶出時間を引き延ばすように設定した。この条件は分子サイ ズ測定を目的としたものではないため、検量線作成と分子サイズの計算は行わなかっ た。

2.2 で得られた各画分の一部を減圧濃縮して孔径 0.45µm のシリンジフィルターで ろ過し、20~50µLを注入した。各画分は 20~50回程度繰り返し注入した。検出器か らの溶出液をフラクションコレクター(Advantec、SF-2100)によって分画した。各画 分はクロマトグラムのピーク形状を参考に、大(Large;L)、中(Middle;M)、小サイ ズ画分(Smal1;S)に細分画した。各画分は、減圧濃縮によってアセトニトリルを留 去し、蒸留水で一定容量にフィルアップして、炭素濃度測定や COD 測定に供した。

2.4 全有機体炭素 (TOC)

全有機体炭素濃度は、島津製の TOC 計(TOC-L_{CPH})で測定した。試料溶液の 50 µ L を 不揮発性有機炭素(NPOC)測定法で分析した。

2.5 吸光度

試料溶液を 0.1 M NaOH でアルカリ性にして、紫外可視吸光光度計(島津、UV-1700) によって、波長 254 nm の吸光度を測定した。この吸光度と試料溶液の TOC 濃度から、 光路長 1 m、DOM の炭素濃度 1 mgC/L 当たりの 254 nm における吸光度(SUVA₂₅₄)を算 出した。

2.6 熱化学分解ガスクロマトグラフィー質量分析 (py-GC/MS)

樹脂分画した各画分の一部を凍結乾燥し、py-GC/MS 法によって構成成分組成の測定 を行った。測定条件は次の通り:ガスクロマトグラフ;Agilent 製 7890A、メチル化剤; 水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH)、内標準;ナノデカン酸、熱分解装置;キュ リーポイントパイロライザー (JHP-5、日本分析工業)、熱分解温度;445℃、スプリッ ト比;1:100、GC カラム;DB-5 MS (Agilent)、カラム初期温度;50℃、カラム最終温 度;310℃、昇温速度;6℃/min。質量分析計(Jeol、Jms-Q1000GC Mk II)では、電子 イオン化法でイオン化し、scan 分析を行った。脂肪酸メチルエステルはステアリン酸 (C18) メチルエステルの検量線をもとに定量した。バニリン類やシリンジル類、ケイ ヒ酸類等のフェノール化合物はそれぞれ検量線を作成して定量を行った。

2.7 COD 測定

COD の測定は JIS K0102 に従って行った。すなわち、硫酸酸性にした試料溶液に硝酸 銀水溶液と 0.005 M の過マンガン酸カリウム溶液を加え、100℃の沸騰水浴中で 30 分 間加熱した。加熱後、0.0125 M シュウ酸溶液を加え、0.005 M 過マンガン酸カリウム 溶液で滴定を行った。この際、試料溶液の TOC 濃度を事前に測定し、同程度の炭素量 (約0.2~0.3 mgC) になるように試料溶液の量を調整した。ただし、HiN と Hi/HoB 画 分の一部は試料溶液の TOC 濃度が低く、上記の炭素量を供試することができなかった。

3. 結果と考察

3.1 樹脂吸着クロマトグラフィーによる分画

琵琶湖表層水約 90 L (1.1 mgC/L) を樹脂に通過させた際の DAX-8 樹脂と XAD-4 樹脂 に吸着した炭素濃度を図 2 に示した。DAX-8 樹脂への吸着炭素濃度は、最初の 10 L 通 過後は 0.38 mgC/L だったが、徐々に減少し 90 L 通過後には 0.19 mgC/L になった。一 方、XAD-4 樹脂への吸着炭素濃度は 20~50 L 通過後に上昇したが、それ以降は漸減傾 向であった。

図3は、樹脂から溶出した各画分の炭素濃度を測定し、元の試料水中での濃度に換 算して各画分の炭素濃度組成を示したものである。DOM 中の有機体炭素濃度の46%が HoA、HoN、TrA、TrN、Hi/HoB 画分として回収された。HiA 画分の炭素量は極めて低く かったため、以降の試験には用いなかった。これは、親水性の酸性化合物が TrA 画分 に含まれているためだと考えられた。また、HiN 画分が32.6%と最も存在割合が高い結 果になった。HiN 画分の炭素濃度は分画カラムの出口で測定しているため、樹脂由来の 炭素がわずかに溶出しており、HiN 画分濃度の過大評価につながったと考えられた。ま た、21.2%の炭素量が回収できなかったが、これは各画分の精製中における損失だと考 えられた。



図 2 試料水量による DAX-8 と XAD-4 樹脂への吸着炭素濃度の変化





3.2 分子サイズによる分画

未分画の DOM 試料と各画分の HPSEC クロマトグラムを図4に示した。DOM のクロマト グラムに見られる 10 分付近と 11 分付近のピーク形状は HoA 画分のクロマトグラムと よく類似していた。TrA 画分のクロマトグラムも DOM や HoA 画分と比較的類似していた が、TrA 画分では HoA 画分よりも 11 分付近のピークが大きかった。

酸性画分のクロマトグラムが比較的類似していたのに対して、HoN と TrN の中性画分

のクロマトグラムの類似性は低かった。HoN 画分では HoA 画分と同様に、10 分と 11 分 付近のピークが主要なピークであったが、TrN 画分には 11 分付近のピークに加えてよ り分子サイズの小さい 13 分付近のピークが検出された。Hi/HoB 画分では、TrN 画分と 類似した溶出時間にピークが観察されたが、よりブロードであった。また、HiN 画分に は排除部(V₀) に大きなピークがみられ、タンパク質などのサイズの大きい中性化合物 が含まれていると推察された。

HPSEC 分取後に COD 分析に必要な量の有機物が得られると考えられた HoA、HoN、TrA、 TrN、Hi/HoB 画分について、分子サイズによる分画を行った。HPSEC 分取を行った際の クロマトグラムを図 5 に示す。各画分を減圧濃縮して高濃度の試料を HPSEC カラムに 注入したが、ピーク分離の劣化は見られなかった。各画分を図 5 のように L サイズ、M サイズ、S サイズの 3 画分に細分画した。各画分の炭素濃度測定から、元の試料水中の 濃度に換算した結果を図 6 に示した。



図 4 未分画の DOM と樹脂分画した 各画分の HPSEC クロマトグラム





図 5 HPSEC 分取時の各画分のクロマ トグラムとサイズ分画の位置

図 6 HPSEC 分取した各画分の炭素濃 度(試料水中の濃度に換算)

3.3 樹脂分画画分の特性

樹脂吸着クロマトグラフィーで分画した画分の化学構造特性を把握するために、吸 光度特性 (SUVA₂₅₄) と構成成分組成の分析を行った。各画分の SUVA₂₅₄ 値を表 1 に示す。 SUVA₂₅₄ は DOM 中の芳香族化合物やフミン物質の簡易的指標として利用されている。フ ミン物質に相当する HoA 画分の SUVA₂₅₄ 値が 2.47 L mgC⁻¹ m⁻¹ と最も高く、Hi/HoB 画分 が 1.04 L mgC⁻¹ m⁻¹ と最も低かった。

Fraction	SUVA ₂₅₄ (L mgC ⁻¹ m ⁻¹)					
DOM	1.71					
HoA	2.47					
HoN	1.58					
TrA	1.53					
TrN	1.23					
Hi/HoB	1.04					

表1 DOM および各画分の吸光度特性

次に、水酸化テトラメチルアンモニウム(TMAH)でメチル化する熱化学分解 GC/MS 法(py-GC/MS)で各画分の構成成分の定量を行った。図7に各画分のパイログラムを 示した。各画分には、フミン物質にも見られる脂肪酸メチルエステル類(m/z 74)や リグニンフェノール類のメチル化物(m/z 166)が検出された。ただし、それらの化合 物の収量は画分によって異なっていた。各画分の py-GC/MS 分析で得られたフェノール 性化合物と脂肪酸メチルエステル類の収量を表2に示した。HoA 画分は他の画分よりも フェノール性化合物のメチルエステル類を多く含み、C12-C18 の脂肪酸メチルエステル 類の収量は少なかった。一方、HoN 画分は C12-C18 の脂肪酸メチルエステル類の収量が 高く、植物プランクトン由来成分の影響を強く受けていることが示唆された。

リグニンフェノール類の収量比はフミン物質の起源推定に利用されている。表 3 に 示した各画分のフェノール類の収量比をみると、HoA 画分はシリンジル類/バニリン類 の比が他の画分よりも高く、比較的裸子植物の木質部の寄与が大きいと推察された。 また、バニリン/バニリン酸比は TrN や Hi/HoB 画分で高く、相対的に酸化が進行して いる可能性が示された。なお、Hi/HoB 画分には、塩基性化合物である 2,4,6-トリアミ ノ-1,3,5-トリアジンのヘキサメチル化物のピークが検出された。この化合物の収量は 定量していないが、ピーク強度から相当量含まれていると推定された。

Compounds	HoA	HoN	TrA	TrN	Hi/HoB
Vanillic compounds	783	124	330	319	310
Sillingic compounds	321	33.3	65.8	35.8	-
Cinamic compouds	119	15.2	25.9	27.9	-
C12-18 even FAME	994	24000	2850	5370	5240

75.5

784

3.37

136

4.54

299

7.41

593

34.4

626

C20-24 even FAME

C9-17 odd FAME

表2 DOM 画分のフェノール化合物と脂肪酸メチルエステル (FAME) 類の収量 (µa/a)



図7 DOM 画分の熱化学メチル化 GC/MS のトータルイオンクロマトグラム (TIC) とマ スクロマトグラム (m/z 74, 166)

Compounds	HoA	HoN	TrA	TrN	Hi/HoB
Sillingic/Vanillic	0.41	0.27	0.20	0.11	-
Cinamic/Vanillic	0.15	0.12	0.08	0.09	-
Vanilin/Vanillic acid	0.32	-	0.26	0.83	1.04
Sillingic/Sillingic acid	3.3	-	-	-	-

表3 DOM 画分のフェノール化合物の組成比

3.4 DOM および各画分の COD 特性

COD 分析は測定値のばらつきが大きいため、先ず琵琶湖の水試料(未分画の DOM、TOC 濃度 1.1 mgC/L)を繰り返し測定して、測定値のばらつきを評価した。10 回繰り返し 測定した結果、平均値は 1.71 mgO/L、標準偏差は 0.091 mgO/L、変動係数は 5.3%であ った。DOM 各画分の COD 測定回数は、試料量が限られていたため 1 回とした。

樹脂吸着クロマトグラフィーで分画した各画分の COD を測定し、有機体炭素 1mg 当たりの COD 値を算出して図 8 に示した。未分画の DOM は 1.28 mg0/mgC であり、HoA 画分と Hi/HoB 画分はそれぞれ 1.34 と 1.48 mg0/mgC と DOM よりもやや高かった。一方、HoN と TrA、TrN 画分は 1.1 mg0/mgC 程度であった。フミン物質とも呼ばれる HoA 画分は比較的難分解性を示すと考えられているため、炭素当たりの COD 値は他の画分よりも低いと予想していたが、本研究の結果では異なっていた。

また、芳香族構造の指標にもなっている SUVA₂₅₄(表 1)と炭素 1mg 当たりの COD 値 との間に相関性はなかった。表 1 に示したように、SUVA₂₅₄は HoA 画分で最も高く Hi/HoB 画分で最も低かった。しかし、炭素 1mg 当たりの COD 値は Hi/HoB 画分が最も高く次い で、HoA 画分が高かった。この結果は、SUVA₂₅₄は COD による DOM の分解程度の指標に はならないことを示唆している。Hi/HoB 画分で炭素 1mg 当たりの COD 値が高かったの は、py-GC/MS 分析で示されたようにアミド化合物を含んでいることが原因かもしれな い。窒素含有有機物を多く含めば、炭素当たりの有機物量が多くなり、COD 値も高くな る可能性が考えられた。

py-GC/MS によって測定された構成成分の収量と COD 値との関係は今回の 5 点のみの 試料からは不明であった。本分析法で定量された構成成分は各画分の数%であったため、 各画分全体の特性を示しているとは言えないことも一因である。¹H NMR 等で平均化学 構造特性を解析すれば、COD との関係性が見いだせる可能性がある。

次に、各画分を分子サイズによって細分画した画分の COD 値を測定した結果を図 9 に示す。HoA 画分では、細分画前に比べて、炭素当たりの COD 値が減少したように見え た。これは、分画中のろ過や精製過程での有機物の損失等が原因として考えられた。 また、HoA 画分の分子サイズの大きい画分(HoA-L)の炭素 1mg 当たりの COD 値は 0.79 mg0/mgC で、中サイズの画分(HoA-M) は 0.86 mg0/mgC であったが、分子サイズの小さ い画分(HoA-S) はそれらよりも低く 0.44 mg0/mgC であった。同様の傾向は TrA 画分 でも観察された。すなわち、HoA 画分や TrA 画分では分子サイズが小さいほど COD 分解 耐性があるように見えた。

HoN 画分の HPSEC クロマトグラムは HoA 画分と類似していたが、サイズ毎の COD 特性 は異なっていた。HoN 画分では、HoN-M 画分の炭素 1mg 当たりの COD が最も低かった。 この傾向は Hi/HoB 画分でも同様であった。それとは逆に、TrN 画分は、TrN-M 画分が 炭素 1mg 当たりの COD 値が最も高かった。今回は、分子サイズによって細分画した画 分の構造特性解析を実施していないため、構造特性と COD 特性との関係は把握できな かった。しかし、分子サイズによっても COD 特性が大きく異なることを示すことがで きた。



図 8 DOM と樹脂分画した各画分の炭 素 1mg 当たりの COD 値 ※エラーバーは DOM の繰り返し分析から 算出した変動係数(5.3%)を表す



図 9 HPSEC 分画した各画分の炭素 1mg 当たりの COD 値 ※エラーバーは DOM の繰り返し分析から 算出した変動係数 (5.3%) を表す

4. まとめ

本研究では、琵琶湖水中の DOM を親水性-疎水性や酸性-塩基性、さらに分子サイズ によって細分画し、各画分の COD 特性(有機体炭素 1mg 当たりの COD 値)と構造特性 との関係を明らかにしようとした。しかし、樹脂吸着クロマトグラフィーによって得 られた HoA、HoN、TrA、TrN、Hi/HoB 画分の COD 特性には、SUVA₂₅₄や py-GC/MS による 構成成分組成と明瞭な関係性は見られなかった。各画分の構造特性と COD 特性と相関 関係を示すためには、より多くの試料の分析や核磁気共鳴(NMR) スペクトル分析が必 要である。

各画分を分子サイズで細分画したところ、分子サイズによって炭素当たりの COD 値 が異なることが明らかになった。さらに、分子サイズと COD 特性の大小関係は画分に よって異なることが分かったが、その理由は不明であった。

また、図 10 に示したように、今回分離精製した画分の元の試料水 COD 値への寄与は 約 37%であり、DOM の全体像の把握には課題が残った。これは、今回は COD の測定を しなかった HiN 画分の分析や、各画分の精製過程の見直しによる回収率の向上によっ て改善すると予想される。加えて季節変化の把握などの課題も考えられるが、本研究 によって樹脂吸着クロマトグラフィーと HPSEC によって DOM の COD 特性を把握できる 可能性が示された。本研究の進展によって、COD の指標的意義の見直しや再評価が可能 になると期待できる。



図10 各画分の琵琶湖試料水の COD 値への寄与

5. 謝辞

琵琶湖での採水にご協力いただいた滋賀県立琵琶湖環境科学研究センターの早川和 秀様にこの場を借りて御礼申し上げます。

6. 参考文献

- [1] 国土交通省河川局河川環境課(2009) 今後の河川水質管理の指標について(案)
- [2] Jandl R and Sollins P (1997) Biol Fertil Soils, 25, 196
- [3] Imai A et al. (2001) Wat Res, **35**, 4019
- [4] Becher G et al. (1985) Environ Sci Technol, 19, 422
- [5] Iimura et al. (2013) Soil Biol Biochem, 57, 60
- [6] Amon RMW and Benner R (1994) Nature, **369**, 549
- [7] Leenheer JA (1981) Environ Sci Technol, 15, 578
- [8] Aiken GR et al (1992) Org Geochem, 18, 567