

消毒副生成物前駆体としての琵琶湖・淀川水系 における超親水性溶存有機物の存在実態

越後 信哉（京都大学大学院 工学研究科）

小坂 浩司（国立保健医療科学院 生活環境研究部）

1. 本研究の背景と目的

我が国では浄水処理過程において病原微生物の人体への影響を防ぐために塩素処理が行われている。一方、塩素は微生物だけでなく同時に水中の溶存有機物(Dissolved Organic Matters; DOMs)とも反応して DOMs の一部は消毒副生成物(Disinfection byproducts; DBPs)へと変換される。この DBPs の一部が人体に有害であり、特に制御の必要な DBPs に関しては水道水質基準値が定められている。平成 27 年には DBPs の一種であるハロ酢酸(Haloacetic acid; HAAs)の中でもジクロロ酢酸 (Dichloroacetic acid; DCAA) およびトリクロロ酢酸 (Trichloroacetic acid; TCAA)の水道水質基準値が引き下げられ、HAAs の前駆物質の制御および発生抑制に関する研究がより重要になったといえる。

このような条件下で、先行研究¹⁾において環境水中の非常に親水性の高い物質が極めて高い TCAA 生成能を持つことが確認された(図 1)。しかし、その性質および構造に関する情報は皆無である。また、HAAs の前駆体や反応経路については様々な研究が行なわれているものの、明確な構造や反応系は未だ知られていない。環境水中の非常に親水性の高い DOMs (以下、超親水性 DOMs と表記する)の構造が特定できれば、TCAA の前駆体および反応経路の理解につながり、より合理的な水質管理が可能になると期待できる。

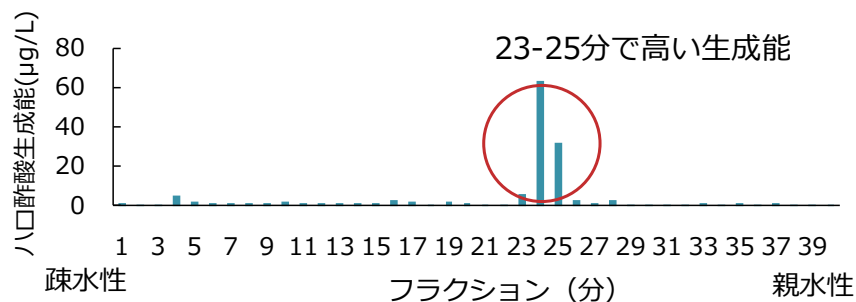


図 1 HILIC による淀川河川水分画後の各画分のトリクロロ酢酸(TCAA)生成能。保持時間が長い、すなわち親水性が極めて高い画分が高い TCAA 生成能を示すことがわかる¹⁾。

以上の背景を踏まえ、本研究では超親水性 DOMs の存在実態に関する調査を行なった。具体的には、琵琶湖・淀川水系内の 3 地点（琵琶湖南湖、桂川、淀川本川）で採水した試料について、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC)を用いた HPLC 分画により超親水性 DOMs の定量を行なった。また、各種固相への保持特性からその化学的特性の把握を試みた。

2. 実験方法

2.1 概要

琵琶湖・淀川水系内の表流水について、HILIC カラムを用いた HPLC による分画により得られた超親水性 DOMs の炭素量を把握し、全有機物に対する超親水性 DOMs の割合を明らかにすることを目的とした。ならびに、従来から用いられている逆相系固相抽出カートリッジを用いた分画から親水性 DOMs の炭素量を把握し、親水性 DOMs に対する超親水性 DOMs の割合を推定した。さらに、イオン交換能を持つ固相抽出カートリッジへの吸着特性から超親水性 DOMs の物性の推定を行った。

2.2 試薬の調製

本研究では、超純水製造システム (Milli- Q Academic; Millipore)により製造した超純水(以下, MQW と表記する)を水溶液の調製等に用いた。また、試薬は特に断らない限り富士フィルム和光純薬から購入し、試薬特級あるいは LC/MS 用を用いた。これらは本実験で要求される純度を満足するものであると考えられた。

2.3 採水および前処理

採水は琵琶湖・淀川流域内の 3 地点から琵琶湖・南湖(2019/12/9 採水, 以下琵琶湖水), 桂川・A 下水処理施設放流口直下(2019/10/10 採水, 以下桂川河川水), 淀川・枚方大橋(2019/12/9 採水, 以下淀川河川水)にて行なった。これら 3 試料は, それぞれガラス繊維ろ紙 GF/F (孔径 0.70 μm ; アドバンテック)で吸引ろ過し, 冷蔵庫で保管した。その後, ろ液をロータリーエバポレーター(REN-1 Series; IWAKI)と窒素吹付け式試験管濃縮装置(Dry Thermo Bath MG-2000; EYELA)を用いて 100 倍濃縮した。この際濃縮により懸濁が生じたため, シリンジと親水性ポリテトラフルオロエチレン(Polytetrafluoroethylene; PTEE)タイプメンブレンフィルター(孔径 0.20 μm ; アドバンテック)により再度ろ過した後, 分画操作に供した。

2.4 HPLC による分画

100 倍濃縮後の試料について HILIC カラムを用いた HPLC 分画(以下, HILIC 分画と表記する)を行ない, 芳香環の存在を示唆する波長 254 nm における紫外部(Ultraviolet; UV)吸収を示した保持時間 22~28 分の画分(以下, この画分を超親水性区間とする)を採取した。この区間には NO_3^- のような無機陰イオンが溶出しており, 非常に親水性の高い物質が溶出しているものと判断できる。図 2 に分画の基本フロー図, 表 1 にこの HILIC による分離の条件を示す。

また予備実験としてまず超親水性 DOMs の炭素量(DOC)測定のための濃縮法を検討した。分画後の試料にはアセトニトリルが含まれるためどの程度の濃縮で DOC のブランク値が十分に低くなるか分画に用いた溶離液を用いて評価した。この評価にはグラディエントをかける前の溶離液の組成比と同じリン酸水溶液 : アセトニトリルが 5:95 となるように MQW 0.5 mL およびアセトニトリル 9.5 mL の混合液を用いた。窒素吹付け式試験管濃縮装置を用いてサンプルを 0.1 mL に, すなわち 100 倍濃縮後のサンプルの DOC を測定したところ, アセトニトリルが残存することが分かった。そのため蒸発乾固後 MQW に再溶解することとし, ブランク値が十分に低くなることを確認した。

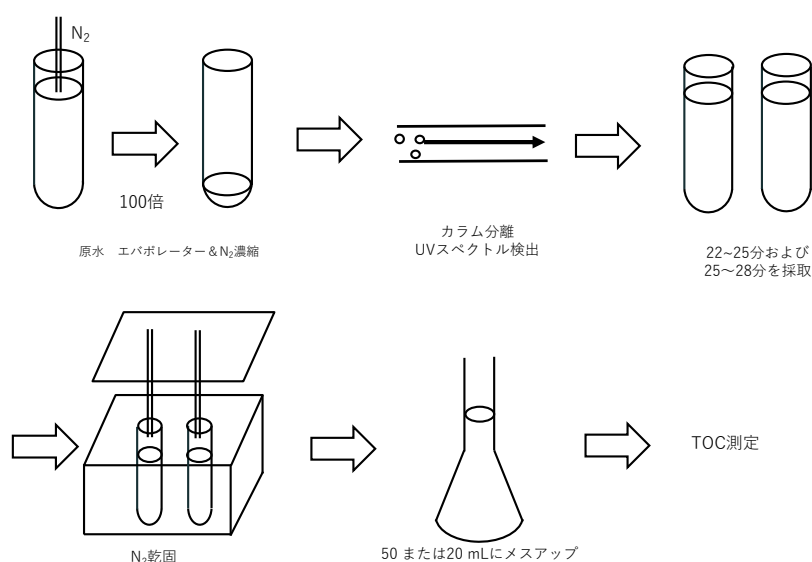


図 2 分画フロー概念図

表 1 HILIC 分画の測定条件

LC	Prominence 20A (Shimadzu)
フラクションコレクター	FRC-10A (Shimadzu)
UV	SPD - M20A (Shimadzu)
カラム	HILIC-OH5、4.6×150 mm (Agilent Technologies)
移動相	A 液：1.5 mM リン酸水溶液、B 液：アセトニトリル
グラディエント条件 (%)	B 液：95 (0 ~ 15 分)→5 (25 ~ 42 分) →95 (45 ~ 62 分)
カラム温度 (°C)	30
1 回あたりの注入量 (μL)	50
注入回数	8
フラクション	1~8、8~15、15~22、22~25、25~28、28~32
流量 (mL/分)	0.5

次いで、対象とするフラクションについて検討した。まず、60 倍濃縮試料を 1~40 分について 1 分ごとに分画しそれぞれ 10 mL 回収した。全て蒸発乾固させた後 MQW 50 mL に再溶解し DOC を測定した。その結果、全てのサンプルが DOC 下限値付近であり測定できなかった。そのため、濃縮倍率を 60 倍から 100 倍に上げるとともに作業の効率化のため超親水性 DOMs の存在が示唆されている 22~25 分をまとめて回収した。その結果、100 倍濃縮すると超親水性区間に共存するとされている塩の影響によりピークの幅が広がるとともに 25 分以降の 25~27 分にもピークが得られた。このため、サンプルが UV 検出器からフラクションコレクターに到達するまでの時間も加味し、22~25 分に加えて 25~28 分の画分も同時に採取することにした。

以上の検討から、100 倍濃縮試料を表 1 の条件で分画後、22~25、25~28 画分の試料を溶離液を含めてそれぞれ 10 mL 採取した。分画後の試料は窒素吹付け式試験管濃縮装置で蒸発乾固させた。その後、分画後のサンプルの DOC が比較的高いと予想される桂川河川水の試料については MQW 50 mL に再溶解、比較的低いと予想される琵琶湖水、淀川河川水については MQW 20 mL に再溶解し、DOC を測定した。また、各試

料について 2 回ずつ同じ測定を行い再現性を確認した。MQW についても濃縮の段階から同様の操作を行ないブランク値とした。

2.4 固相による分画手順

同一の水系で適用例のある逆相系の Bond Elut Plexa (Agilent Technologies) カートリッジを用いて分画(以下、逆相分画と表記する)し、DOMs の疎水性画分と親水性画分の量を把握した(注:ここでいう疎水性、親水性は従来の分画法による分類に類するもので、超親水性画分と従来の親水性画分の量を比較することを意図している)。このカートリッジは逆相系のもので疎水性物質を保持し親水性物質は通過する。カートリッジのコンディショニングにメタノール 20 mL, 0.01 M HCl 1 L の順にともに流量 25 mL/分で通水した。試料 500 mL を HCl により pH を 2 に合わせ、流量 25 mL/分で通水した。その後、通水開始から 3~5 分後に採取したサンプル 50 mL の DOC (これが従来の意味での親水性画分の DOC) , および比較対象として同様に前処理を行なった通水前のサンプルの DOC を測定した。この前後の差が疎水性画分の DOC となる。各試料について 2 回ずつ同じ測定を行ない再現性を確認した。また、MQW についても同様の操作を行ないブランク値が十分に低いことを確認し、測定結果に対してブランク値はごく僅かであったことから 0 とみなした。

2.5 イオン交換能を持つ固相抽出カートリッジを用いた超親水性 DOMs の特性解析

超親水性 DOMs がどのような官能基を有するのかを検討するために、HILIC 分画を行なう前の各試料にイオン交換能を持つ固相抽出カートリッジを適用した。固相には Oasis MCX カートリッジ(容量 6 cc, 固相重量 500 mg; Waters)と Oasis MAX カートリッジ (容量 6 cc, 固相重量 500 mg; Waters)を用いた(以下、それぞれのカートリッジを MCX ならびに MAX と表記する)。MCX のコンディショニングは、メタノール 20 mL, 1%ギ酸 20 mL, MQW 20 mL の順で行なった。MAX のコンディショニングは、メタノール 20 mL, 1%アンモニア水溶液 20 mL, MQW 20 mL の順で行なった。試料は、10 mL を流量 1 mL/分で通水した。固相抽出カートリッジを通過した試料と通過前の試料をそれぞれ 5 倍濃縮した後、それらについて HILIC カラムを用いた HPLC 分析を行ない、波長 254 nm における UV 吸光度を測定した。UV 吸光度測定条件は表 1 と同様であり、波長 254 nm において超親水性区間のピーク強度の変化が得られるか確認した。MAX は逆相-強陰イオン交換ポリマーで、酸性化合物に対する選択性がある²⁾。一方で、MCX は、逆相-強陽イオン交換ポリマーで、塩基性化合物に対する選択性があり²⁾、両カートリッジを用いることで酸性化合物、塩基性化合物および中性化合物に区分可能である。

3. 結果および考察

3.1 各試料のUV クロマトグラム

各濃縮試料の波長254 nmにおけるUV のクロマトグラムを図3に示す。22~28分付近のピークが超親水性DOMsの存在を示唆している。いずれの試料でも超親水性DOMsに対応するシグナルが検出された。各UV クロマトグラムの22~28 分のピークエリアは、琵琶湖水では 9.91×10^4 mAU・分、桂川河川水では 3.85×10^5 mAU・分、淀川河川水では 1.49×10^5 mAU・分と算出され、大小関係としては桂川>淀川>琵琶湖となった。

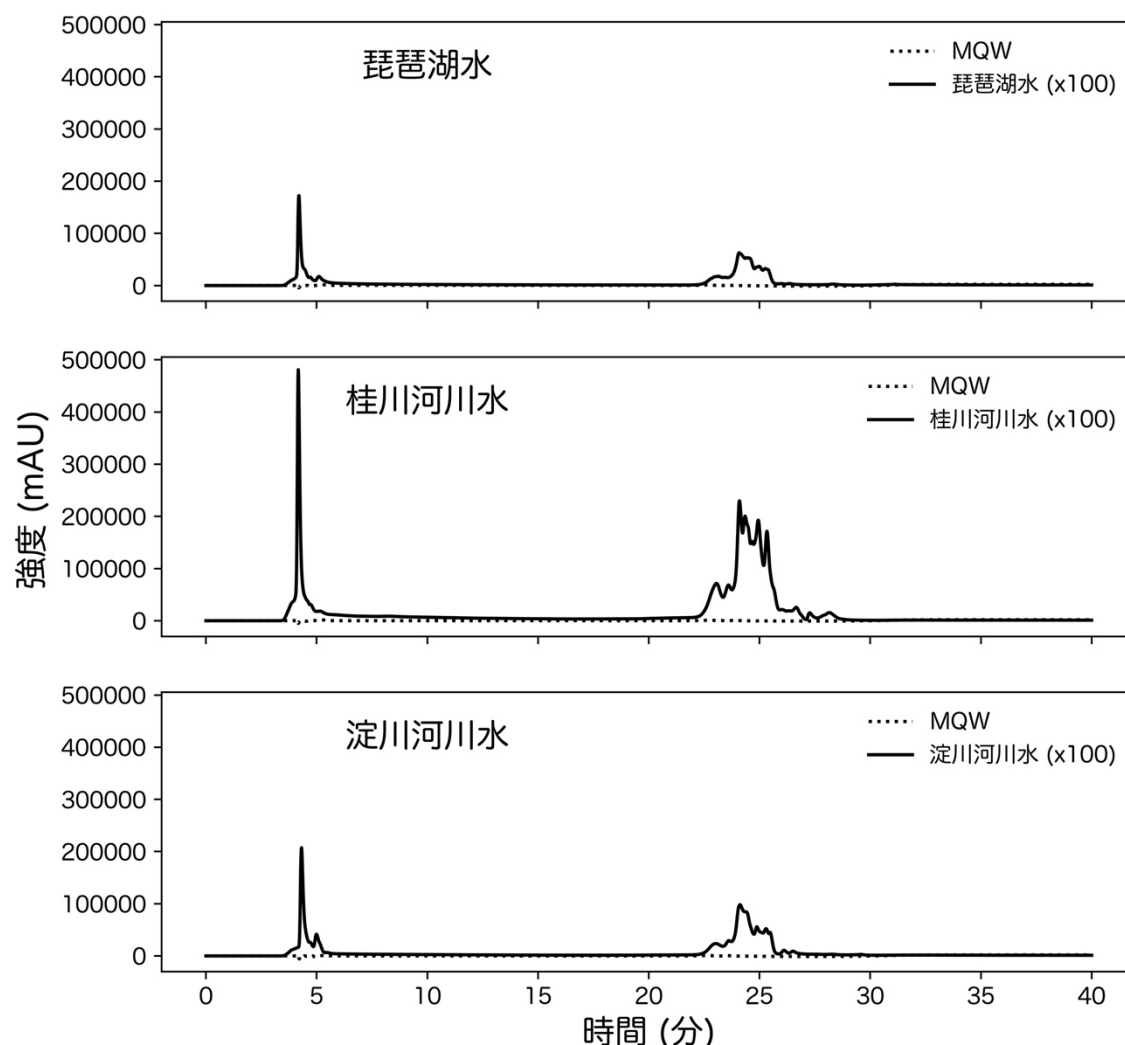


図3 HILIC カラムによる各試料の波長 254 nm における UV クロマトグラム

3.2 超親水性 DOMs の定量

原水の DOC ならびに HILIC 分画により測定したブランク、琵琶湖水、桂川河川水、淀川河川水、それぞれの超親水性区間の DOC を表 2, 3 に示す。なお、超親水性区間の DOC の値は濃縮倍率で割った値、すなわち元の試料に含まれる超親水性 DOMs の濃度である。琵琶湖、淀川原水の DOC は約 1.5 mgC/L であるが、桂川は DOC が約 3.4 mgC/L と高くこれは下水処理施設の影響を受けているためであると考えられる。ブランク値を引いた超親水性区間の DOC は琵琶湖、淀川では 0.17, 0.21 mgC/L とおよそ 0.20 mgC/L であり、桂川では 0.52 mgC/L と他 2 地点に比べて高い値を示した。前項の UV におけるピークエリアと比較すると、超親水性区間 UV ピークエリア/超親水性区間 DOC 比はそれぞれ、琵琶湖河川水が $5.83 \times 10^5 \text{ mAU} \cdot \text{分} \cdot \text{L} / \text{mgC}$ 、桂川河川水が $7.40 \times 10^5 \text{ mAU} \cdot \text{分} \cdot \text{L} / \text{mgC}$ 、および淀川河川水が $7.10 \times 10^5 \text{ mAU} \cdot \text{分} \cdot \text{L} / \text{mgC}$ であり、ほぼ同等の値を示した。

また、逆相(カートリッジによる)分画前のサンプルの TOC ならびに分画により測定した琵琶湖水、桂川河川水、淀川河川水、それぞれの親水性 DOMs の DOC を表 4, 5 に示す。琵琶湖、淀川原水の DOC は HILIC 分画を行なった際と同様の値を示したが、桂川の DOC がやや減少したのは採水してから時間が経過したことによると考えられ

た。琵琶湖，淀川原水中の親水性 DOMs はともに 0.89 mgC/L，桂川は 1.85 mgC/L であり，原水の DOC に比例して親水性 DOMs の DOC も高くなった。

表 2 原水の DOC

試料	DOC(mg/L)
琵琶湖水	1.55
桂川河川水	3.42
淀川河川水	1.65

表 3 HILIC 分画による超親水性 DOMs の炭素量

試料	DOC(mg/L)		
	1回目	2回目	平均
ブランク	0.06	0.05	0.05
琵琶湖水	0.23	0.22	0.22
桂川河川水	0.58	0.56	0.57
淀川河川水	0.25	0.27	0.26

表 4 逆相カートリッジ（従来法）による分画における通水前の DOC

試料	DOC(mg/L)		
	1回目	2回目	平均
琵琶湖水	1.53	1.56	1.55
桂川河川水	3.04	3.05	3.05
淀川河川水	1.62	1.67	1.64

表 5 逆相カートリッジ（従来法）による分画における通水後の DOC

試料	DOC(mg/L)		
	1回目	2回目	平均
琵琶湖水	0.89	0.89	0.89
桂川河川水	1.96	1.74	1.85
淀川河川水	0.90	0.87	0.89

次いで，これら DOC 値により算出した全有機物に対する親水性 DOMs ならびに超親水性 DOMs の存在比を図 4 にまとめる。琵琶湖水，桂川河川水，淀川河川水中 DOMs に対する超親水性 DOMs は炭素基準でそれぞれ 11.0%，15.2%，12.7%であり，原水自体の DOC が高いほど超親水性 DOMs の割合がやや高かった。また，超親水性区間のピ

ークエリア/総 DOC 比はそれぞれ、琵琶湖河川水が 6.39×10^4 mAU・分・L/mgC、桂川河川水が 1.13×10^5 mAU・分・L/mgC、および淀川河川水が 9.03×10^4 mAU・分・L/mgC であり、同様の傾向を示した。超親水性 DOMs には自然由来の物質だけでなく人為由来の物質が寄与している可能性がある。また、逆相系カートリッジを用いた分画方法では河川水のうち約 60%が親水性 DOMs であると考えられ、分画方法が異なるものの、親水性 DOMs のうち超親水性 DOMs は 20~25%程度であると推定された。

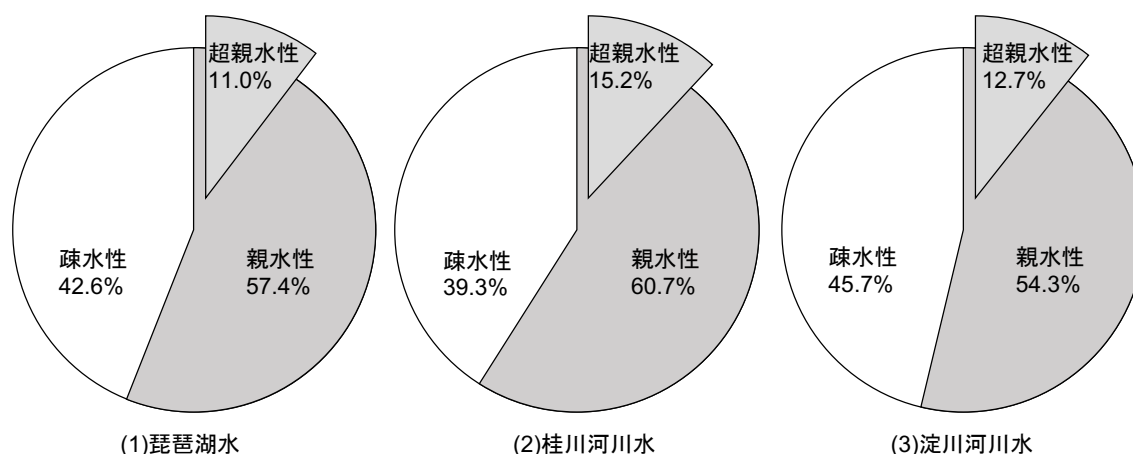


図 4 全有機物に対する親水性 DOMs, 超親水性 DOMs 存在比(DOC 比)

さらに、上記の結果と奥田による本研究と同様の HILIC 分画による環境水の TCAA 生成能¹⁾から、採水時期は異なるものの超親水性 DOMs の炭素基準の TCAA 生成能を推定できる。琵琶湖水の 22~28 分の画分の TCAA 生成能は $20.8 \mu\text{g/L}$ であり、上記の結果である超親水性 DOMs の濃度 0.17 mgC/L を用いると、超親水性 DOMs の TCAA 生成能は $20.8/0.17$ から $122 \mu\text{g/mgC}$ と算出できる。同様の方法で桂川河川水、淀川河川水の超親水性 DOMs の TCAA 生成能はそれぞれ $154 \mu\text{g/mgC}$, $213 \mu\text{g/mgC}$ となる。個別物質のハロ酢酸生成能の文献値^{3,4)}との比較から、炭素あたりの TCAA 生成能は、フェノール性物質等の TCAA 生成能が高い物質の生成能のレンジと一致する。また個別物質の HILIC 分離特性（データ未掲載）とあわせて考えるとチロシンとトリプトファン(TCAA 生成能はそれぞれ 127.29 , $104.43 \mu\text{g/mgC}$)といった両性物質が該当することがわかった。以上のことから、両性物質かつ芳香環を持つ物質が超親水性画分に存在し、それが TCAA の生成に寄与しているものと推定された。

3.3 イオン交換能を持つ固相抽出カートリッジへの保持性からみた物性の把握

図 5 に各カートリッジ通水前後の波長 254 nm における UV クロマトグラムを示す。いずれののカートリッジについても通水後では 3 試料全てにおいて超親水性区間のシグナルがほぼ消滅した。これにより超親水性 DOMs は単なるフェノール性物質ではなく、塩基性でプラスの電荷を持ちうる窒素を含む両性物質であることが分かった。ただし、琵琶湖水、淀川河川水に対してはわずかに MAX カートリッジによるピークの減少量 > MCX カートリッジによるピークの減少量であったことから、超親水性 DOMs の大部分は両性物質であるが一部は窒素等を含まない酸性物質であると推定された。なお、MAX および WAX カートリッジは疎水性物質も保持するが、今回対象とした有機物の画分は、親水性が高いことが HILIC 分画により分かっており、疎水性相互作用に

よる保持の可能性は排除できる。以上のことから、超親水性 DOMs の多くは両性物質であることが、示された。

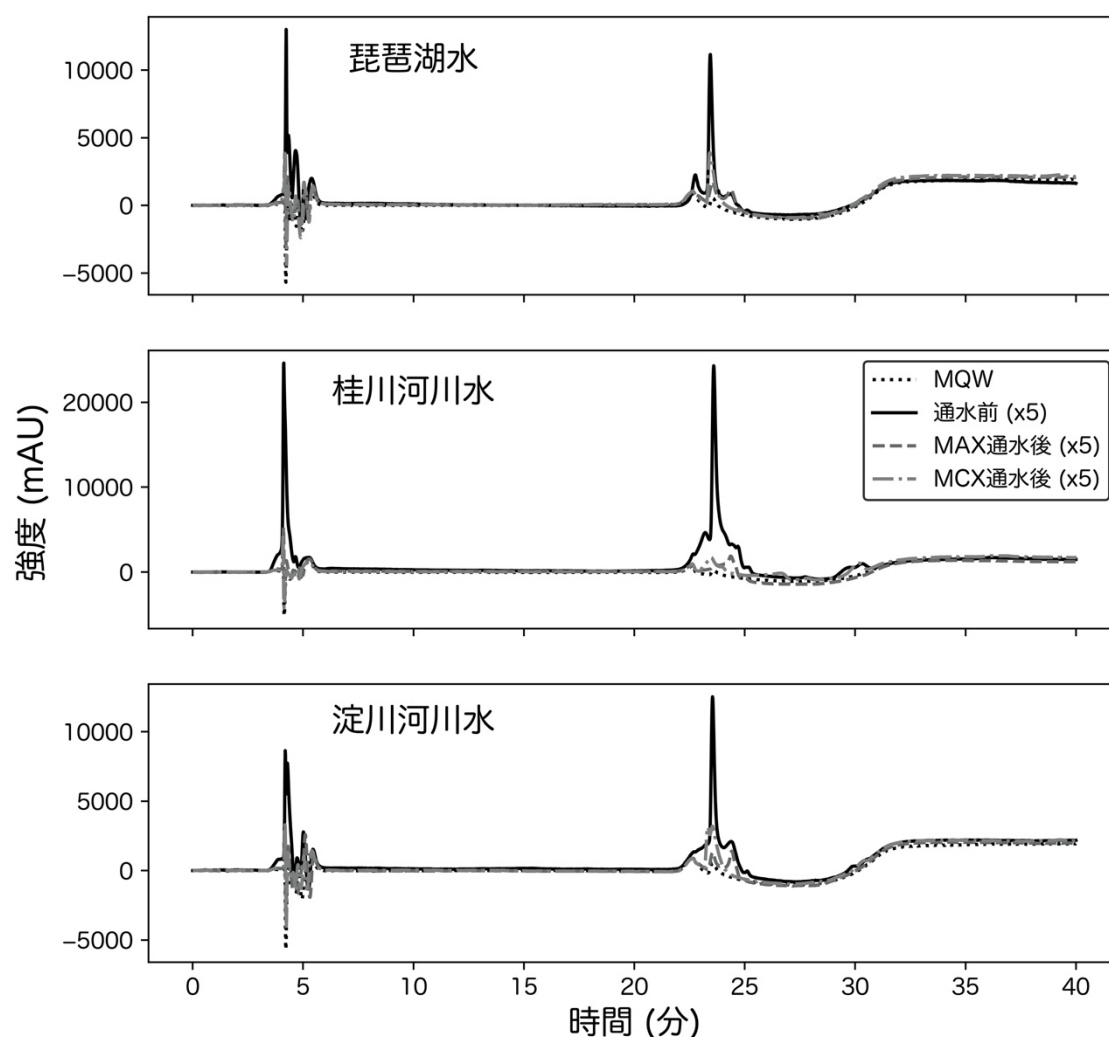


図5 HILIC カラムによる各試料の固相通水前後の波長 254 nm における UV クロマトグラム

4. まとめ

本研究では超親水性 DOMs に関する特性解析を行なった。HILIC を用いた HPLC 分画により超親水性 DOMs の炭素量を測定することで定量を行なった。また、個別物質の HILIC カラムに対する保持時間との比較および各種固相への保持特性による解析から、物性および官能基の推定を試みた。以下に、得られた知見をまとめる。

定量に関しては、琵琶湖水、桂川河川水、淀川河川水の 3 試料中の超親水性 DOMs は炭素基準(DOC)で全 DOMs 中 10～15%程度、親水性 DOMs の 20～25%程度であることが分かった。地点間での大きな差は認められなかった。

物性については、イオン交換能を持つ固相抽出カートリッジでの保持特性から超親水性 DOMs は酸性および塩基性官能基をともに有する両性物質である可能性を示した。

以上のことや TCAA 生成能に関する文献値から、超親水性 DOMs 中の TCAA 前駆物質は芳香環を持ち、かつ大部分は塩基性官能基（すなわち窒素）と酸性官能基を有する両性物質であると推定された。

参考文献

- 1) 奥田恵理香：浄水処理過程におけるハロ酢酸の主要生成機構とその前駆体の推定，京都大学大学院工学研究科修士論文，2019.
- 2) Waters: Oasis サンプル前処理製品. https://www.waters.com/waters/ja_JP/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?locale=ja_JP&cid=513209(2020 年 2 月閲覧).
- 3) He, K., Okuta, E., Cordero, J.A., Echigo, S., Asada, Y., and Itoh, S. Formation of chlorinated haloacetic acids by chlorination of low molecular weight compounds listed on pollutant release and transfer registers (PRTRs). J. Hazard. Mat., Vol.351, pp.98-107, 2018.
- 4) 越後信哉，矢野雄一，徐育子，伊藤禎彦：溶存有機物を構成する化学構造からのハロ酢酸生成特性，環境工学研究論文集，Vol. 44, pp. 265–273, 2007.