

琵琶湖・淀川水系における超親水性溶存有機物の 強酸性官能基の存在実態

京都大学大学院地球環境学堂 多田悠人, 越後信哉

1. 背景と目的

水道水源中に存在する溶存有機物 (DOM) は、発がんリスクなど人体に悪影響を及ぼす消毒副生成物の前駆体となり得る¹⁾。安全で安心な水を生成するためには、DOMの動態を十分に把握し、消毒副生成物生成の制御に努める必要がある。しかし、その複雑な組成やそれに伴う多種多様な物理化学的特性は十分に理解されておらず、依然として消毒副生成物の制御は喫緊の課題である。

DOMの研究において、その極性(親水性-疎水性)をもとに分画が行われることが多い。海外の水道水源は疎水性画分の割合が高く、またその分離・濃縮の容易さから、疎水性画分の研究が中心に行われてきた¹⁾。しかし、琵琶湖・淀川水系に代表される我が国の水道水源のようにDOMが比較的低濃度である場合、親水性画分も重要な画分となってくる²⁾。

私たち研究グループが行った先行研究において、通常の逆相クロマトグラフィーカラムでは保持されず親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラムで十分に保持される極めて親水性の高いDOM(超親水性DOM)が、琵琶湖・淀川水系の複数地点において代表的な消毒副生成物であるハロ酢酸(HAA)の主要な前駆体の1つであることを示し、それらの存在量が炭素ベースで20%程度であることを明らかにした^{3,4)}。たった20%しか存在しない超親水性DOMがHAA前駆体の大多数を占めることが明らかにされ、超親水性DOMの水道工学上の重要性が説かれた。しかし、先行研究の対象は琵琶湖・淀川水系に限られており、超親水性の存在が普遍的なものであるかは不明であった。

また、超親水性DOMのある浄水場内での挙動とHAA生成能(HAAFP)の関係について調べたところ、超親水性DOM物は総DOMに比べ除去されにくく、処理が進むにつれ超親水性DOMのHAAFP寄与率は上昇し、処理水(塩素添加前)中のHAA前駆体はほぼ全て超親水性DOMであることが判明した⁵⁾。超親水性DOMは既存の処理施設では処理されにくく、その処理方法の確立が消毒副生成物の抑制には必須であることが示された。

さらに超親水性DOMの化学的描像について研究を行ったところ、70-80%は1kDa以下の物質であること、60-90%が強酸性物質であることが示され、超親水性DOMの主要な構成物質はリンや硫黄原子を含む低分子物質ではないかと推察された⁵⁾。このような強酸性官能基を持つ低分子物質を消毒副生成物の前駆体として取り扱った例はなく、これら物質のさらなる特性把握が超親水性DOMの制御手法の開発につながると考えられた。

以上の背景を踏まえ、本研究では、まず琵琶湖・淀川水系を含む日本全国の環境水および水道原水中に含まれる超親水性DOMの存在量とHAAFPの把握を試みた。次に、琵琶湖・淀川水系における超親水性画分内の強酸性低分子化合物に着目し、精密質量分析計による網羅的解析により、リンや硫黄原子を含む超親水性DOMの存在を確認した。

2. 実験方法

2.1 概要

本研究は、(1)国内の複数地点で採取した環境水および水道原水中に存在する超親水性DOMの存在量の把握とHAAFPに関する調査と(2)超親水性DOMを構成する強酸性

物質の精密質量分析計による網羅的解析の2点により構成される。以下にそれぞれの実験方法について述べる。

2.2 試料

琵琶湖・淀川水系内の3地点（琵琶湖・南湖，桂川・A下水処理場放流口直下，淀川・枚方大橋）で採取した環境水（以後，琵琶湖水，桂川水，淀川水と表記）と関東地方（2地点），関西地方（1地点），九州・沖縄地方（1地点）で採取した水道原水（以後，関東A水道原水，関東B水道原水，関西水道原水，九州・沖縄水道原水と表記）を用いた。各試料の採水日，pH，DOC濃度を表1に示す。pHおよびDOCはpHメーター（LAQUA D210P, HORIBA），全有機炭素計（TOC V_{CSH}, Shimadzu）により測定した。採水は高水温期（9–10月）と低水温期（1月）の2回に分けて行った。これら試料は採水後，研究室内に持ち帰り，ガラス繊維ろ紙GF/F（Whatman, 孔径0.7 μm）により吸引ろ過を行い，使用まで冷蔵庫内で保管した。

表1 試料の採水日，pH，DOC濃度

	採水日	pH	DOC (mg C/L)
琵琶湖水	2022/9/7	7.8	1.5
	2023/1/10	7.6	1.6
淀川水	2022/9/7	7.9	1.6
	2023/1/10	7.9	1.6
桂川水	2022/9/7	7.4	2.1
	2023/1/10	7.5	3.2
関東A水道原水	2022/10/5	7.9	4.1
	2023/1/12	7.6	3.1
関東B水道原水	2022/10/3	7.9	1.1
	2023/1/5	7.7	0.9
関西水道原水	2022/10/13	7.8	1.9
	2023/1/4	7.8	1.2
九州・沖縄水道原水	2022/10/5	7.4	3.5
	2023/1/11	7.7	1.4

2.3 HILIC 分画による超親水性 DOM の抽出と定量

超親水性 DOM は，HILIC カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分画により抽出した。まず，400 mL の試料をロータリーエバポレーター（N-1300, EYELA）と窒素吹き付け式試験管濃縮装置（MGS-3100E, EYELA）により4 mLにまで濃縮した。その際，濃縮液中に沈殿が見られたため，濃縮液を親水性ポリテトラフルオロエチレン（HPTFE）タイプメンブレンフィルター（孔径0.2 μm, アドバンテック）により再度ろ過し，HILIC分画操作に供した。

HILIC分画の条件を表2に示す。カラムにはHILICカラム（HILIC-OH5, 4.6×150 mm, Agilent Technologies）を用い，移動相はアセトニトリルと1.5 mMリン酸水溶液を用いた。HILIC分画と並行し波長254 nmにおけるUV吸光度を測定した。また，保持時間28–32分において分取した画分を超親水性画分とした。先行研究^{4,5)}では22–28分が超親水性画分であったが，本研究では使用したHPLCシステムが異なるため保持時間のずれが生じていることには留意されたい。分取後，超親水性画分10 mLを濃縮用ガラス管に移し，窒素

吹き付け式試験管濃縮装置により乾固させることで画分内に含まれるアセトニトリルを除去した。その後、20 mL の超純水に再溶解し、DOC 濃度を測定した。また、低水温期に採取した試料については HAAFP の測定も行った。コントロールとして、超純水に対し同等の操作を行った。

表 2 HILIC 分画の測定条件

項目	
LC システム	Prominence 20AD (Shimadzu)
UV 検出器	SPD-20A (Shimadzu)
フラクションコレクター	FRC-10A (Shimadzu)
カラム	HILIC-OH5, 4.6 × 150 mm (Agilent Technologies)
移動相	A: 1.5 mM リン酸水溶液, B: 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)
温度 (°C)	30
1 回あたりの注入量 (μL)	50
注入回数 (回)	8
フラクションの保持時間 (分)	28-32
流量 (mL/分)	0.5

2.4 HAAFP 試験

10 mL 褐色のガラス容器に試料 2 mL と攪拌子を入れ、リン酸緩衝液を加え pH 7.0 (最終濃度 5 mM) とした。これに塩素濃度が DOC 濃度の 10 倍となるように少量の次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、20 秒間攪拌し、20 °C の暗所で 24 時間反応させた。その後、残留塩素濃度を *N,N*-ジエチルパラフェニレンジアミン (DPD) 法により測定し、塩素が十分量残存することを確認したのち、塩化アンモニウム溶液を 50 mg N/L になるように少量加え、反応を停止した。この試料をバイアル瓶に移し、HAA 測定に供した。HAA は、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) (4000 QTRAP, AB sciex) を用いて測定した。分析条件を表 3 に示す。モノクロロ酢酸 (MCAA), ジクロロ酢酸 (DCAA), TCAA の定量下限値は 10, 3, 3 μg/L であった。

2.5 精密質量分析計を用いた超親水性 DOM の強酸性官能基の解析

超親水性 DOM の構成原子や官能基などの部分構造を解明するため、Orbitrap 型イオントラップ質量分析計 (Orbitrap/MS) を用いた網羅的分析を行った。

前処理として固相抽出法を採用し、夾雑物を排除した。固相は Oasis MCX カートリッジ (容量 6 cc, 固相重量 500 mg, Waters) を用いた。Oasis MCX カートリッジの固定相は、逆相-強陽イオン交換ポリマーであり、疎水性物質や塩基性化合物を選択的に保持する⁶⁾。コンディショニングとして、Oasis MCX カートリッジにメタノール 20 mL, 2%ギ酸水溶液 20mL, 超純水 20 mL を通液した。その後、試料 100 mL をカートリッジに通過させ、通過液を回収した。回収した通過液はロータリーエバポレーターと窒素吹き付け式試験管濃縮装置により 100 倍濃縮し、HPTFE メンブレンフィルターによりろ過したのち LC-Orbitrap/MS (Q executive focus, Thermo fisher scientific) による網羅的分析に供した。全ての試料は 3 回測定を行い、再現性の確認を行った。分析条件を表 4 に示す。LC 部の条件は移動相に 0.1%酢酸水溶液を用いたことを除き HILIC 分画と同じ条件に統一した。

得られたマスペクトルデータは Compound discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いて差異解析を行った。保持時間 22–28 分，検出強度 500,000 以上のピークの内，コントロール（超純水を同様に前処理した試料）に対しピークエリア値の比が 10 以上であり，優位な差 ($p < 0.05$) が確認されたものを対象のピークとした。推定分子式の構成要素として，原子数や比について以下の条件を設定した: C ($3 \geq$), H ($H/C \leq 3.5$), O ($O/C \leq 2$), N ($N/C \leq 1$), P (0–3), S (0–3)。また，推定分子式の理論 m/z と測定値の差が 5 ppm 以上のものは除外した。

表 3 LC-MS/MS による HAAs 分析条件

項目		
LC 部	LC システム	Prominence 20A (SHIMADZU)
	カラム	ZORBAX SB-Aq, 4.6 × 150 mm (Agilent Technologies)
	移動相	A 液: 0.3% ギ酸水溶液, B 液: メタノール
	グラディエント条件 (%)	B:1 (0–0.5 分) → 50 (5 分) → 99 (21–31 分) → 1% (32 分)
	温度 (°C)	50
	流量 (mL/分)	0.4 mL/分
MS 部	機種	4000 QTRAP (AB Sciex)
	イオン化法	ESI-
	イオンスプレー電圧 (V)	-3000
	ターボイオンスプレー温度 (°C)	300
	カーテンガス (psi)	50
	ネブライザーガス (psi)	80
	ターボガス (psi)	50
	コリジョンガス (psi)	6
	MRM 条件	MCAA 92.889→35.000, -35, -4, -16, -3
	(Q1→Q3, DP (V), EP (V), CE (V), CXP (V))	DCAA 126.779→82.880, -30, -4, -14, -3
		TCAA 160.819→116.700, -25, -4, -10, -3

表 4 LC-Orbitrap/MS による分析条件

装置	Orbitrap/MS 部	Q EXACTIVE Focus (Thermo Fisher Scientific)
	LC 部	UltiMate™ 3000 SD (Thermo Fisher Scientific)
スキャン	Scan Type	Full MS
パラメータ	Scan range (m/z)	100 to 1500
	Resolution	70,000
	Polarity	Negative
	Microscans	1
	AGC target	1.0×10^6
	Maximum inject time	100
イオン化 パラメータ	Sheath gas flow rate	50
	Aux gas flow rate	14
	Sweep gas flow rate	3
	Spray voltage (kV)	2.5
	Capillary temp. (°C)	270
	S-lens RF level	50
	Aux gas heater temp (°C)	440

3. 結果と考察

3.1 日本国内の環境水および水道原水中に存在する超親水性 DOM の存在量と HAAFP

図1に7地点で採取した試料のDOCと超親水性画分のDOCを示す。また、図2にそれぞれの試料中の総DOCに対し超親水性由来DOCが占める割合を示す。琵琶湖・淀川水系の3地点に着目すると、高水温期の超親水性DOMは琵琶湖水、淀川水、桂川水でそれぞれ0.42, 0.51, 0.79 mg C/Lであり、存在比は29–38%であった。琵琶湖水、淀川水については、低水温期に超親水性由来DOCの減少が見られ、それぞれ0.17, 0.30 mgC/Lであり、存在比も10, 18%と減少した。一方、下水処理水放流口直下で採取した桂川水に関しては、低水温期に総DOC、超親水性DOCの双方とも増加が見られ、超親水性DOCの存在比は大きな変化はなかった。つまり、下水処理放流水中に含まれる超親水性DOCの存在比は季節変動が少ないことが明らかになった。淀川水は桂川水の下流に位置し、琵琶湖水より下水処理水の影響を受けると考えられるため、琵琶湖水より低水温期に超親水性DOCおよび存在比の減少量が少なくなったと推察された。

他水系の水道原水に着目すると、どの水道原水中にも超親水性DOMの存在は確認されたが、超親水性DOCおよび総DOCに対し超親水性DOCが占める割合は大きく異なっていた。最も存在量および存在割合が少なかった関東Bの水道原水では、高水温期、低水温期に存在量はそれぞれ0.07, 0.07 mg C/Lであり、存在比は6.2, 8.1%であった。最も超親水性DOMの存在量が高かったのは関東Aの水道原水であり、高水温期に1.46 mg C/Lであった。存在量比に関しては冬季にもかかわらず、藻類増殖の影響を受けたと見られる関西地方の水道原水が62%と最も高くなった。季節間の変動について、関西地方の水道原水を除けば、琵琶湖・淀川水と同様に冬季に減少の傾向が見られた。

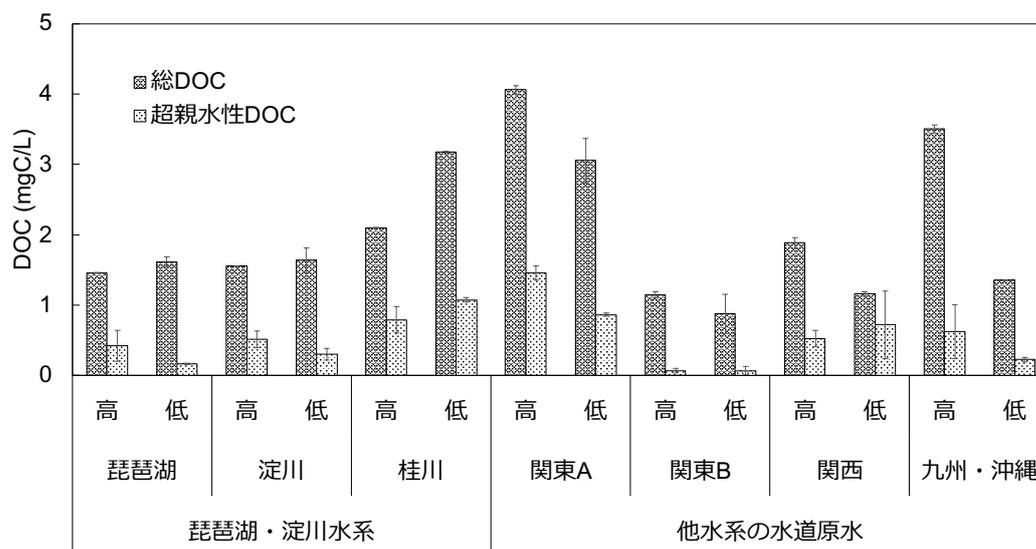


図1 琵琶湖・淀川水系と他水系の親水性DOMの存在量
(高: 高水温期採取試料, 低: 低水温期採取試料)

図3に琵琶湖・淀川水系3試料の波長254 nmにおけるUV吸光度のクロマトグラムを示す。3試料とも高水温期は非常に類似したクロマトグラムであった。保持時間29.7分と31分あたりに大きな2本のピークが確認された。波長254 nmにおけるUV吸光度は芳香族化合物の存在を示す指標として使われ、複数の芳香族化合物の存在が示された。一方で低水温期では、全体的に検出強度の低下が見られ、ピーク形状も変化が見られた。超親水

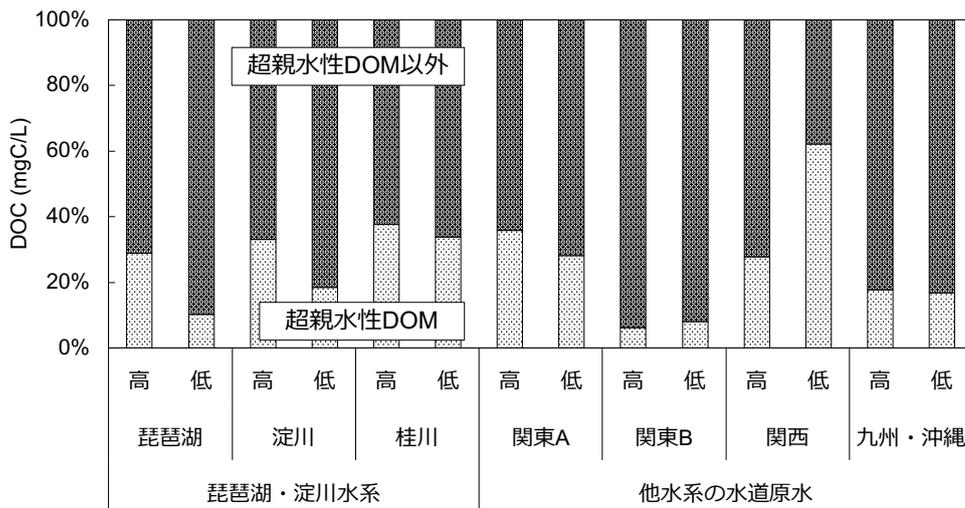


図2 琵琶湖・淀川水系と他水系の親水性 DOM の炭素量あたり存在量比 (高: 高水温期採取試料, 低: 低水温期採取試料)

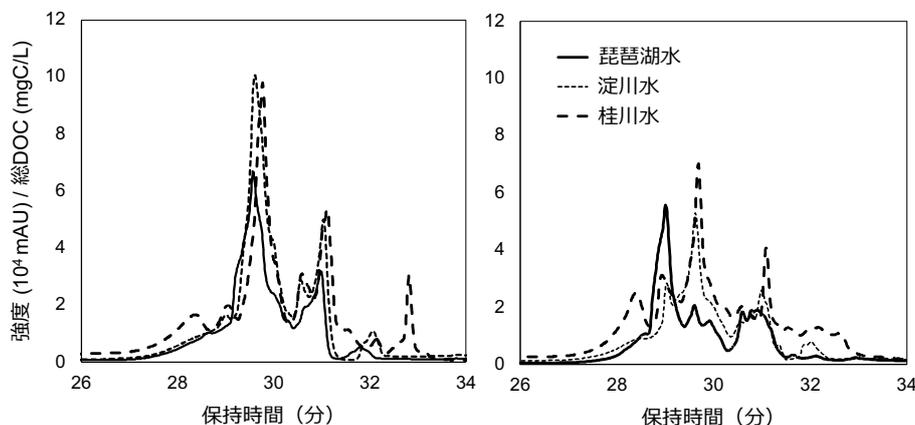


図3 琵琶湖・淀川水系環境水中の超親水性画分 (保持時間 28–32 分) における UV 254 nm 吸光度 (左: 高水温期, 右: 低水温期)

性 DOM の存在割合の減少が確認されなかった桂川水においてもピークの減少が見られた。このことから、季節により超親水性 DOM の構成要素が変化していることが示唆された。

図4に他水系4試料の254 nmにおけるUV吸光度のクロマトグラムを示す。図3に示した琵琶湖・淀川水系3試料と異なるピークを複数持つことが示された。また、水道原水によって大きくクロマトグラムの形状が異なっていた。特に関東AおよびBの水道原水は保持時間29分や30.8分あたりに大きなピークが確認されていた。季節間の変動に着目すると、藻類の影響を受け大きく受け低水温期に超親水性DOMの存在量および存在比の増加が見られた関西の水道原水は、この傾向と同様にUVクロマトグラムのピークエリアも低水温期に増加が見られた。また、低水温期に超親水性DOMの存在量および存在比の減少が見られた関東Aの水道原水は、同様に低水温期にUVクロマトグラムのピークエリアも小さくなることが確認された。一方で、九州・沖縄地方の水道原水は超親水性DOMの量と存在比ともに低水温期に減少するにもかかわらず、UV吸光度は増加した。これは、波長254 nmにおいて高い吸光度をもつ物質が低水温期にのみ存在することを示唆してい

る。以上より、水道原水によって超親水性 DOM は存在量のみならず質的にも大きく異なることが示唆された。

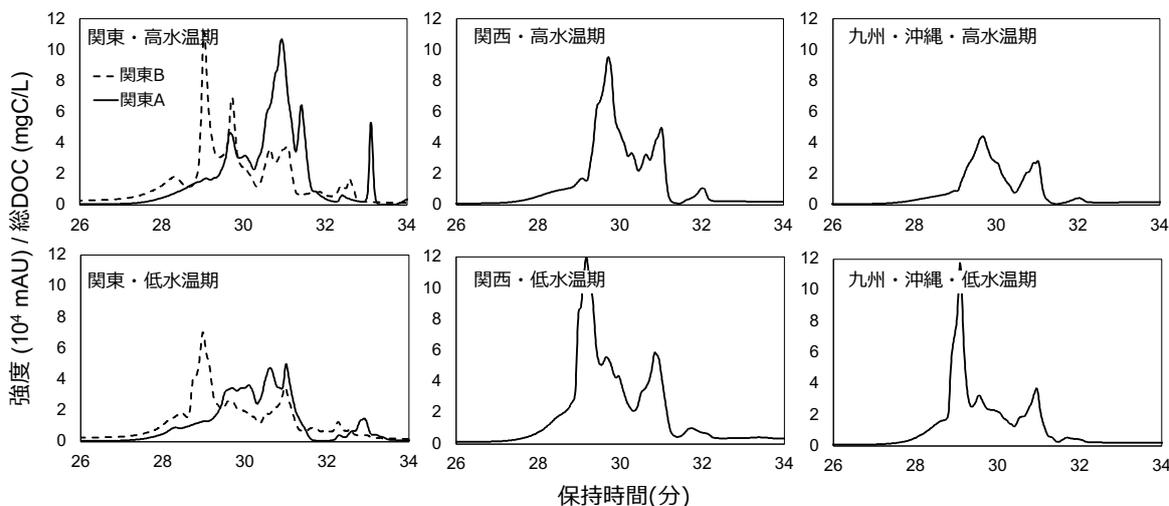


図4 他水系水道原水中の超親水性画分（保持時間 28–32 分）における UV 254 nm 吸光度（上: 高水温期, 下: 低水温期, 左: 関東, 中: 関西, 右: 九州・沖縄地方水道原水）

図5に低水温期採水試料のHAAFPを示す。MCAAはどの試料においても検出下限値以下であったことから、ここではTCAAFPとDCAAFPの結果のみを示す。琵琶湖水のDCAAFPを除き、全ての試料で超親水性DOMがHAAFPを持つことが分かった。超親水性DOMのHAAFPへの寄与率はTCAA, DCAAそれぞれ21–31, 30–61%であった。TCAAFPでは琵琶湖・淀川水系と他水系との間に大きな変化は見られなかったが、DCAAFPは大きな違いが見られた。淀川水、桂川水中の超親水性DOMのDCAAFPへの寄与率が26, 32%であるのに対し、関東Bおよび関西地方の水道原水による寄与率は58, 61%と2倍程度の違いが見られた。また、DOCあたりのHAAFPに着目すると（図6）、多くの試料において超親水性画分のHAAFPが原水のHAAFPより高いことが分かった。このことより、超親水性DOMがより他のDOMよりもHAAFPの高いHAA前駆物質であることが示唆された。

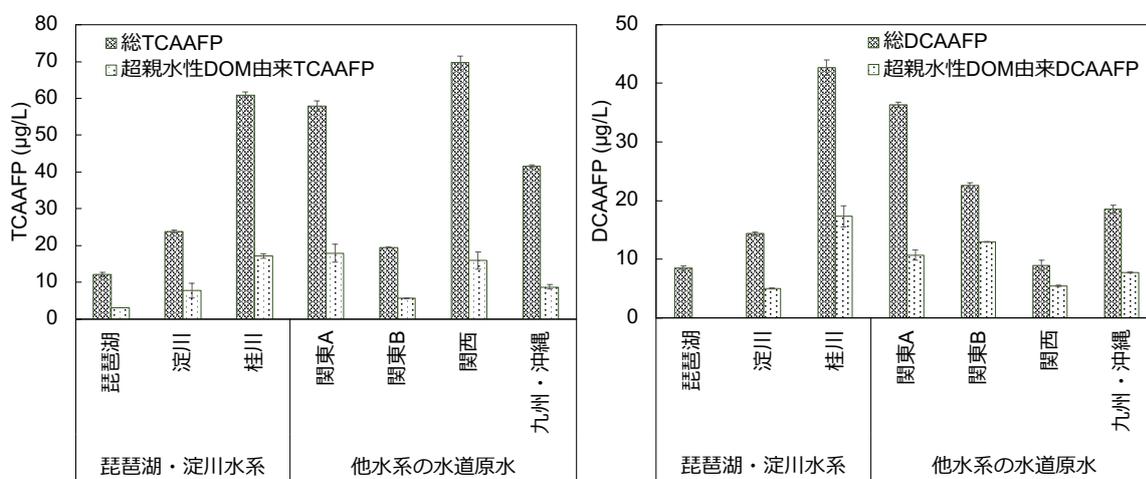


図5 低水温期試料の (a) TCAAFP, (b) DCAAFP
（琵琶湖水のDCAAFPは検出下限値以下）

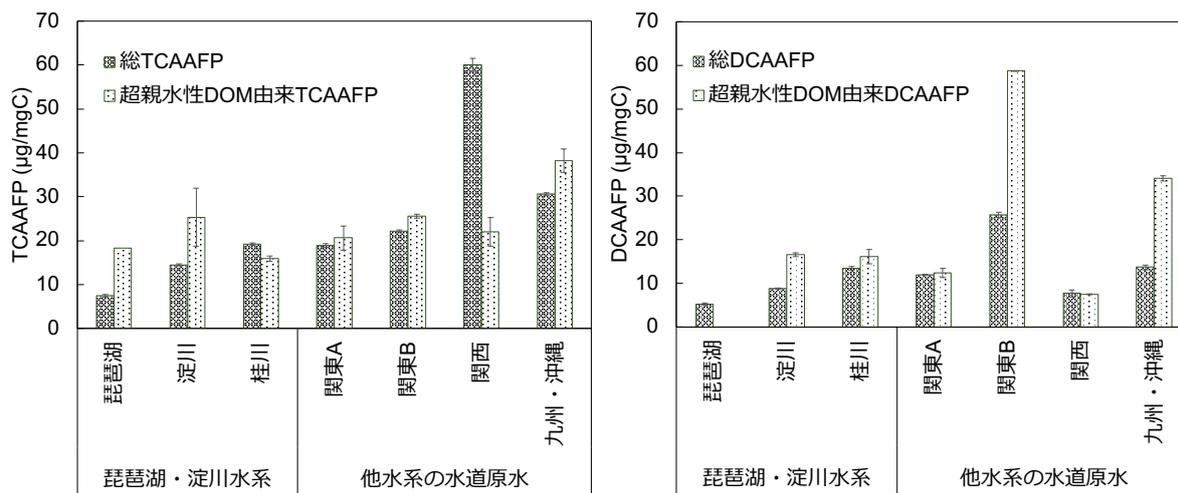


図6 低水温期試料の炭素量あたりの(a) TCAAFF, (b) DCAAFF
(琵琶湖水のDCAAFFは検出下限値以下)

3.2 琵琶湖・淀川水系の環境水中に存在する強酸性超親水性DOMの精密質量分析

図7にLC-Orbitrap/MSのFull MSスキャンにより得られたTICクロマトグラムを示す。高水温期の琵琶湖水のみしか示していないが、他試料においても同様の傾向が見られた。Oasis MCXカートリッジの通水により、23–24分に大きなピークが減少した。先行研究によるとOasis MCXカートリッジの通水により超親水性画DOM由来のDOCは10–20%ほどしか減少しないことが示されており⁵⁾、このピークは酸性超親水性DOMに由来するものではなく、夾雑物の除去によるものと考えられた。また、保持時間22–28分内に全てのピークが確認されたことから解析対象範囲も22–28分と設定した。

図8にLC-Orbitrap/MSによる網羅的解析により検出された超親水性画分中に含まれる硫黄、リン原子を含む物質の検出数を示す。硫黄、リン原子ともに、総検出数の50–70%を占め、多数の硫黄、リン原子含有物質の存在が示唆された。最も検出数が多いものはDOC濃度が最も高い低水温期の桂川水であり、122物質が検出され、そのうち硫黄、リン含有物質数は68, 59物質であり、どちらも含まない物質は33物質であった。低水温期の桂川水を除き、他試料は全て硫黄よりもリン原子を含有する物質の検出数が高い結果となった。

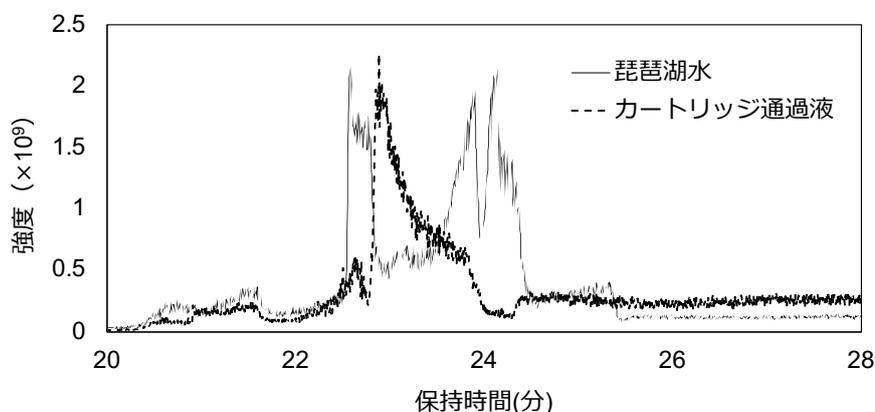


図7 LC-Orbitrap/MSによる測定により得られたTICクロマトグラム

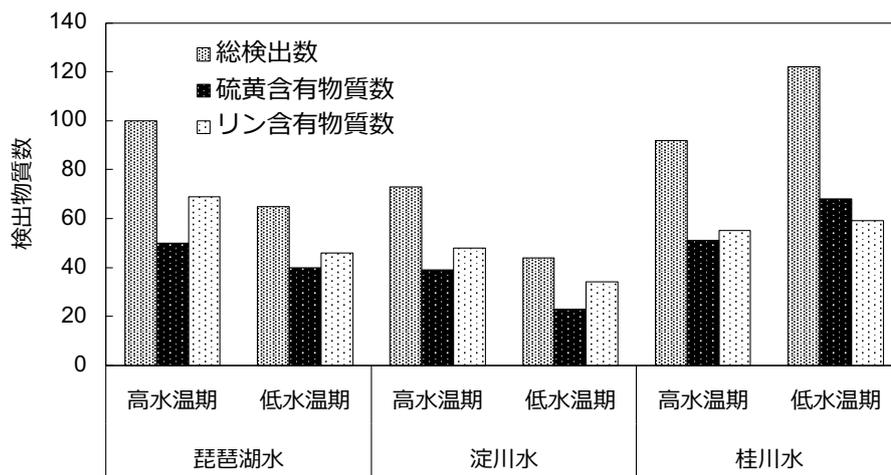


図8 硫黄，リン原子を含む物質の検出数

図9に硫黄，リン原子を含む超親水性DOMの硫黄・リン原子の含有数を示す。1原子のみならず，2原子および3原子含む物質も数多く見られた。DOMが超親水性となるには，複数の親水性に寄与する官能基が必要である可能性が考えられた。また，硫黄に比べ，リンを複数含む物質の割合が高いことが示された。生体由来のアデノシン三リン酸（ATP）やアデノシン二リン酸（ADP）に代表されるような複数のリンを構成要素として持つ物質が強酸性親水性DOMの主要な起源の可能性が考えられた。

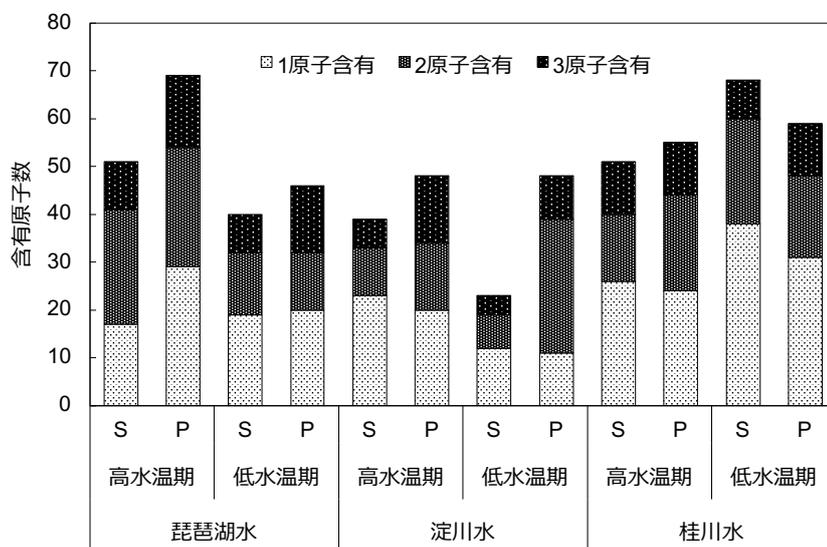


図9 硫黄，リン原子を含む超親水性DOMの硫黄・リン原子の含有数

4. まとめ

本研究で得られた知見は以下の2点に整理できる。

- 琵琶湖・淀川水系以外の他水系においても超親水性DOMの存在が確認され，超親水性DOMの量・割合・構成要素は地域間によって異なることが示された。
- 精密質量分析計より超親水性DOMは硫黄原子やリン原子を有する化合物により構成されることが示され，複数個有する物質の存在が示された。

謝辞： 試料を提供していただいた水道事業者各位に感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) 伊藤禎彦, 越後信哉: 水の消毒副生成物, 技報堂出版, 2008.
- 2) Imai, A., Matsushige, K. and Nagai, T. :Trihalomethane formation potential of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, Water Research, Vol. 37, No. 17, pp. 4284–4294, 2003.
- 3) 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.
- 4) 越後信哉, 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, 平成31年度水質保全研究助成成果報告書,
- 5) 越後信哉, 琵琶湖・淀川水系における超親水性溶存有機物の化学的描像, 令和3年度水質保全研究助成成果報告書
- 6) Waters: Oasis サンプル前処理製品.
https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=ja_JP&lid=1529729 (2023年3月閲覧).