

高速液体クロマトグラフィーによるフルボ酸関連物質の分析

海賀信好*, 中野壮一郎*

手塚美彦**, 石井忠浩**

* (株)東芝 府中工場

東京都府中市東芝町1

** 東京理科大学理学部応用化学科

東京都新宿区神楽坂1-3

概要

水道水中の溶存物質について、ゲル系カラムのHPLC分析の適用を検討したところ、蛍光検出器を利用し $0.2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液で少量の水道水を展開すると、水道水に含まれるフルボ酸、塩素化フルボ酸の特有のクロマトグラムが得られることがわかった。

キーワード

水道水質, HPLC, 蛍光分析, フルボ酸

1 はじめに

1993年の水道水質基準の改正に伴い、多数の水道水試料を少量で簡単に比較分析のできる方法が必要とされている。著者らは先に、蛍光(Fluorescence: FL)検出器を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の検出手法として用いることで、下水高度処理、高度浄水処理の各種処理水の評価に適用できることを示した。また、日本および海外の水道水中にフルボ酸由来の蛍光物質が広く含まれていることを明らかにした¹⁾。

本論文では、先の報告で使用した分子量分面に利用されるカラムを用い、特殊な前処理を行わず水道水を分析する方法を検討した。さらに微量有機物質、特に蛍光を示す腐植物質の分子量分布に対して、どの程度HPLCが適用できるのかを実験的に示すことを目的とした。

2 実験方法

2.1 分析装置

HPLCは、東ソーのTSKgel G3000SWXLの水系ゲルろ過充填カラム(直径7.8mm×300mm, 基材質シリカ, 粒子5 μm , ポアサイズ25nm), 検出器として示差屈折計RI-8020と蛍光検出器FS-8020を用いた。

2.2 分析方法

カラムの前処理は、減圧下30分間超音波脱気した $0.1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液を流速 $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で4時間カラムに流し、次に脱気した蒸留水で3時間、さらに $0.1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で1時間流し調整した。移動相は $0.05\sim 0.4\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液, $0.2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ リン酸緩衝液(pH6.9)などを用い、クロマトグラムパターンを検討した。

試料水は $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルタを通した水道水で、シリンジを用い $500\mu\text{l}$ 注入した。移動相は、硫酸

ナトリウム溶液 $0.5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で展開した。試料水の採水は利用頻度が多く配管内滞留時間の短い公共施設である駅、空港の蛇口を選び、冷蔵保存して分析に用いた。水道水は有機物が少なく、消毒されているので、採水後1~2週間常温放置しても変化のないことを確認してある。

3 実験結果および考察

土壌学の分野で腐植物質とよばれるフミン物質のうち、pHに関係なく水に溶解するフルボ酸は、環境水中の微量溶存有機物の多くを占める。河川湖沼水を水源とする浄水場では、塩素処理におけるトリハロメタンなど有機ハロゲン化合物の前駆物質として、フルボ酸の挙動を知ることは重要である。通常の浄水処理でフルボ酸は除去されにくく、水道水中にはフルボ酸および塩素化されたフルボ酸が存在する¹⁾。これらフルボ酸類のゲルクロマトグラムを、理想的な分子量分布パターンとして得るために、日本腐植物質研究会より入手したフルボ酸 (Dando soilからI H S S法²⁾により分離精製されたフルボ酸) を標準として用い、移動相の最適条件を検討した。

一般に理論段数の大きなカラムはピーク幅が小さくシャープな左右対称のガウス分布のクロマトグラムが得られる³⁾ことから、対称性の良いピークを得るために硫酸ナトリウム溶液の塩濃度を変化させた移動相で標準フルボ酸を展開した。標準フルボ酸 $1.0\sim 3.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の水溶液を $0.05\sim 0.4\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液で展開したクロマトグラムをFig. 1に示す。各種の分布から理論段数、理論段高さ、クロマトグラム面積、ピーク位置など、HPLCの最適条件を求めた⁴⁾。Fig. 1のデータより、クロマトグラムのピーク半値幅 W と保持容量 V_R を求め、 $N=16(V_R/W)^2$ の式とカラム長さ 300mm を用い、硫酸ナトリウム溶液の塩濃度に対してフルボ酸濃度

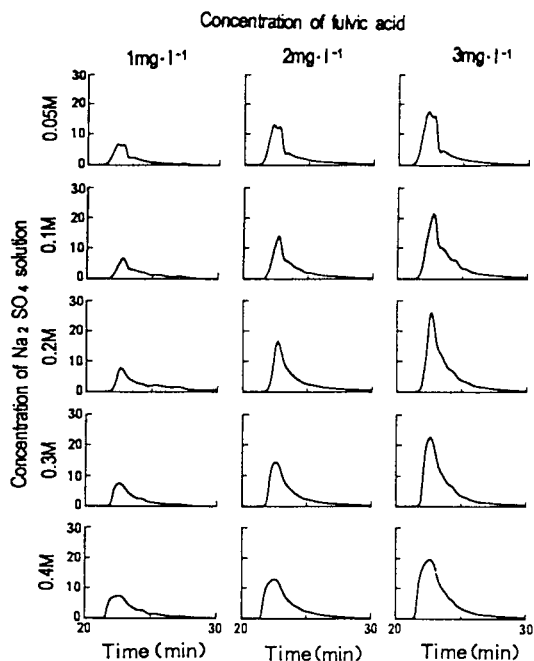


Fig.1 Effect of the concentration of Na_2SO_4 solution on chromatograms as a function of concentration of fulvic acid

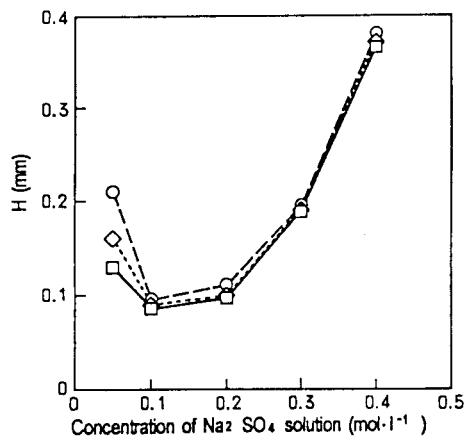


Fig.2 Changes of height equivalence to a theoretical plate (H) as a function of concentration of Na_2SO_4 solution

fulvic acid \square $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, \diamond $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, \circ $3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

1.0, 2.0, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の理論段高さHを求めるとFig. 2が得られる。理論段高さ $H = L/N$ (L:カラム長さ, N:理論段数)においてHの値が小さい方がカラム性能は良好で、一般に0.01~0.1mmの範囲が利用されている³⁾。0.3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の硫酸ナトリウム溶液では分離の良いピークは得られず、0.1から0.2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ が最適であることがわかった。

さらに確認のため、Fig. 1のデータからクロマトグラムの相対面積を求めた結果をFig. 3に示す。面積は0.4 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ の硫酸ナトリウムが最大で0.05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ が最小となった。フルボ酸など腐植物質は陰イオン性の官能基を多く持つ天然の高分子物質であるため、カラムへの吸着は無視できない。塩濃度の増加は、カラムと試料中のイオン交換性物質との相互作用を弱くし、逆に塩濃度の低下はイオン交換性物質のカラムへの吸着が起こりやすくなるため、硫酸ナトリウム溶液の濃度は0.2から0.3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ が最適と判断される。また0.2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ のリン酸緩衝液を用いたところ、理論段高さHの値は硫酸ナトリウム溶液より増加、0.2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下としてもカラムとの吸着が大きく有効性は見いだせなかった。さらに、無機塩濃度の効果を調べるため、2.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 標準フルボ酸にNaCl水溶液を添加、NaCl濃度600 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ として、0.2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液で展開したが、塩濃度による保持時間の移動やクロマトグラムのパターン変化は認められなかった。これより、様々な塩濃度からなる水道水をはじめ天然水中の腐植物質の分析には、0.2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液の使用が適していると考えられる。

上記のHPLCの分析条件で、世界および日本各地の水道水の分析を行った。本分析方法は蛍光物質を捕らえるため、水道水の蛍光強度がほぼクロマトグラムの面積に比例する。

海外の水道水のクロマトグラムを縦軸

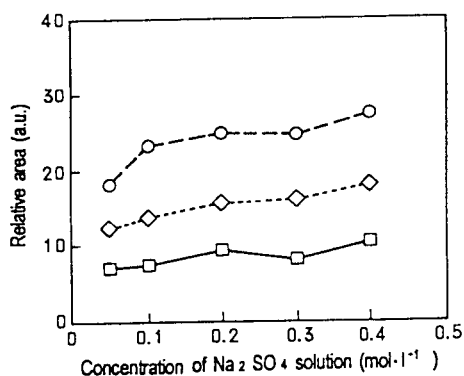


Fig.3 Changes of relative area of chromatograms as a function of concentration of Na₂SO₄ solution

fulvic acid □ 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ◇ 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ○ 3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

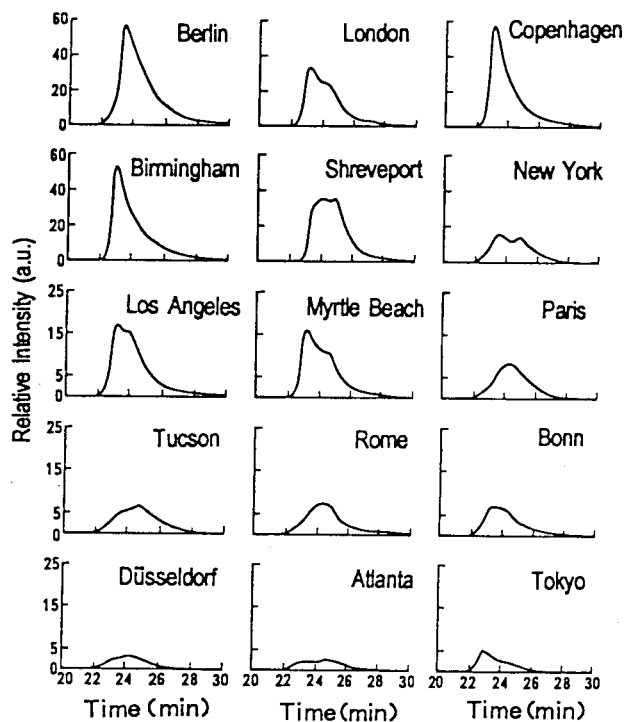


Fig.4 Changes of chromatograms of tap water in various parts of the world by use of the FL detector

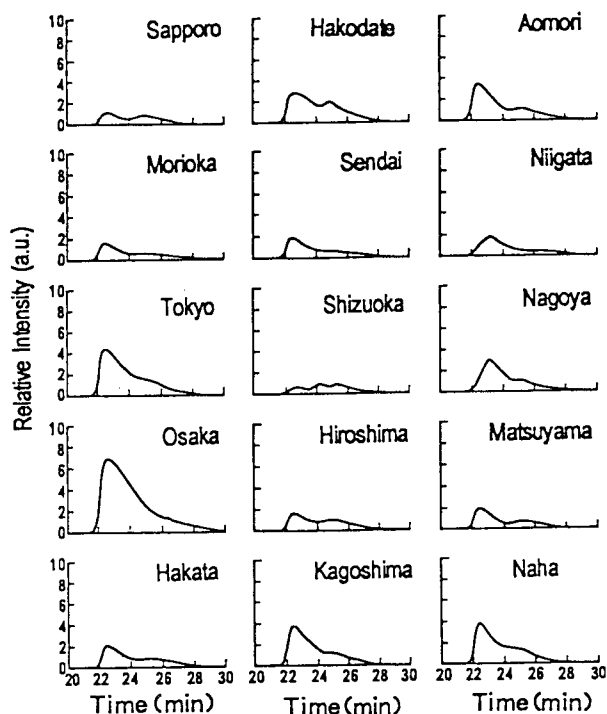


Fig.5 Changes of chromatograms of tap water in various parts of Japan by use of the FL detector

フミン酸、フルボ酸などの生物難分解性物質、土壌、森林、排水、工場排水、都市下水などからの供給量の推定ができるものと考えられる。

参考文献

- 1) 海賀信好, 中野壮一郎, 手塚美彦, 石井忠浩 蛍光分析法による水道水の評価, 水環境学会誌投稿中
- 2) 篠塚則子 (1993) フミン物質と環境, 生産研究, 45(7)
- 3) 日本分析化学会関東支部編 (1985) 高速液体クロマトグラフィーハンドブック, 丸善株式会社
- 4) 石井大道他著 (1992) 高速液体クロマトグラフ法, 日本分析化学会編, 2-9

相対蛍光強度25と60でFig. 4に, 日本の水道水を縦軸相対蛍光強度10でFig. 5に示す。水道原水の腐植物質が, 浄水工程で塩素やオゾンなどの酸化処理を受け蛍光強度自身は減少したものの, 保持時間22分から30分まで幅広い分子量分布でフルボ酸, または塩素化フルボ酸, 酸化フルボ酸として含まれている。ベルリン, コペンハーゲンなど高分子のフルボ酸類が, ニューヨーク, デュッセルドルフでは高分子, 中分子のフルボ酸類が含まれ, 日本では大都市の水道水に高分子のフルボ酸類が多かった。

4 まとめ

水道水中の溶存物質について, 少量の試料でゲル系カラムのHPLC分析の適用を検討したところ, FLの検出器を利用, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 硫酸ナトリウム溶液で水道水を展開すると, 水道水に含まれるフルボ酸, 塩素化フルボ酸の特有のクロマトグラムが得られることがわかった。

このHPLCを用いた手法は, 水道水の評価にとどまらず, 浄水工程でのフルボ酸の除去, 塩素やオゾンなど酸化剤による蛍光減少, 塩素処理によるトリハロメタン生成能の推定, また水道水源流域調査では,