

B-65 フーリエ変換質量分析計を用いた 下水二次処理水中有機物の分析 及び前処理法の検討

○中許 寛之^{1*}・栗栖 太¹・春日 郁朗¹・古米弘明¹

¹ 東京大学大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

* E-mail: nakamoto@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

近年下水道の普及に伴い、受水域に対する下水由来の負荷は、未処理下水から下水処理水へと変化している。閉鎖性水域の湖沼や海洋の環境基準である化学的酸素要求量(COD)は漸増傾向を示すことが報告されており、2008年の環境基準達成率は湖沼が53.0%、海域が76.4%となっている¹⁾。CODと異なり生物化学的酸素要求量(BOD)濃度は減少しているため、難分解性溶存有機物の蓄積がその原因だと考えられている²⁾。難分解性溶存有機物と流域発生源の関係の調査の結果、下水二次処理水が湖沼、海域のCOD増加に大きく寄与していることが報告されている³⁾。しかし、下水処理水中有機物の組成については、包括的な指標で評価されてきたのみであり、分子レベルでどのような有機物を含有しているかについてはほとんど明らかにされていない。

Fourier Transform Mass Spectrometry (FT-MS) は質量分析計の中でも極めて高い質量分解能を持ち、精密質量数から分子式の推定を行うことが可能である。近年、底沼間隙水中の有機物の同定など、環境水への適用事例も報告されている⁴⁾。

そこで本研究では、下水二次処理水に含まれる有機物組成を、FT-MSを用いて分子レベルで解析することを試みた。FT-MS分析を行うための前処理として、有機物を濃縮し、かつ塩分を除去する必要がある。本研究では吸着原理の異なる3種類の固相抽出を比較し、それぞれの樹脂で抽出された有機物の回収率を評価するとともに、抽出物をFT-MSで分析し抽出された有機物の種類を評価した。

2. 実験方法

(1) サンプルング及びろ過

試料採取は2010年7月14日に標準活性汚泥法で処理を行っている首都圏の下水処理場で行った。550℃で4時間処理した孔径0.7μmのガラス繊維ろ紙(GF/F, Whatman)でろ過した。次いで孔径0.2μmのヌクレポアフィルター(Whatman)で更にろ過した。ろ過試料はガラス瓶に入れ、冷蔵保存した。

(2) 固相抽出

固相抽出には Bond Elut C18 (Varian) (以下 C18)、Bond Elut PPL (Agilent Technology) (以下 PPL)、HyperSep Retain PEP (ThermoFisher Scientific) (以下 PEP) の3種類の固相抽出カートリッジを用いた。C18 固相抽出法は極性の低い有機物を分離・濃縮する方法であり質量分析の前処理法として広く使われている。一方で PPL、PEP 固相抽出法は非極性有機物だけではなく極性有機物も保持する事ができる。抽出操作は三連で行い、Milli-Q 水を用いてブラントテストも行った。ろ過試料の量は 400mL とした。カートリッジの容量はすべて 6mL、充填材量は C18、PPL が 1g、PEP が 500mg のものを用いた。

固相抽出操作の条件は文献や各カートリッジに付属の説明書を基本に、以下の手順で行った。1) 試料調整: C18、PPL についてはろ過試料 400mL に 2mol/L 塩酸を 2mL 加え pH2 程度に調整した。PEP についてはろ過試料 400mL に 99% 濃硫酸 4mL を加えた。2) コンディショニング: C18 にはメタノール 10mL に続いて蒸留水 10mL、PPL にはメタノール 6mL、PEP にはメタノール 6mL に続いて蒸留水 6mL を流し、コンディショニングを行った。流速は全て 2mL/min 以下とした。3) サンプル通水: サンプルの通水速度は全て 5-10mL/min 以下とした。4) カートリッジ洗浄: C18 には pH2 に調整した蒸留水 10mL、PPL には蒸留水 12mL、PEP には 95% メタノール/水溶液 10mL で洗浄した。流速は全て 2mL/min 以

下とした。5) 乾燥: PPL のみ窒素で 5min 乾燥させた。6) 溶出: 全てについて、メタノール 20mL を 2mL/min 以下で通して溶出させた。

(3) 回収率測定

各固相抽出液のうち 10mL を採取し、固相抽出による有機物の回収率の測定を行った。試験管エバポレーターによりメタノールを揮発させたのち、窒素気流にて完全に揮発させた。蒸留水 10mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、超音波にかけて抽出有機物を再溶解させた。これら再溶解した試料、ブランク試料、固相抽出前の試料の全有機炭素 (TOC) 濃度を TOC-V CSH (Shimadzu) により測定した。また C18 固相抽出に関しては、カートリッジを通過した試料、および洗浄液の TOC 濃度も測定した。

(4) 質量分析

三連で行った固相抽出液を 2mL ずつ採取して一つに混合した後、孔径 0.22 μ m の PTFE フィルター (DISMIC, Advantec) でろ過し、FT-MS (Exactive, ThermoFisher Scientific) により測定した。測定はポジティブイオンモード/ネガティブイオンモード両方で行い、イオン化はエレクトロスプレーイオン化法を選択した。質量分解能は 50,000 で行った。LC カラムをつけていない HPLC 装置 Accela (ThermoFisher Scientific) を用い、メタノールと 10mM 酢酸ナトリウム水溶液の 1:1 混合液で FT-MS に試料を導入した。質量範囲は $m/z=100-1000$ m/z を対象とした。常に測定されるパルミチン酸、ステアリン酸、フタル酸エステル、シロキサン の精密質量を常時モニタリングして補正する事で、質量精度を向上させた。

分析結果は、まずソフトウェア Sieve (ThermoFisher Scientific) を用いて、試料と Milli-Q 水の検出ピークを比較し、Milli-Q 水でも検出されているピークを除いた。ピーク強度 100,000 以上を持つイオンピークに対してソフトウェア Qual Browser (ThermoFisher Scientific) を用いて以下の手順で分子式同定を行った。1) ^{13}C 同位体ピークの m/z より対象イオンピークの価数を決定するとともに、C のおよその個数を推定した。2) ^{34}S 同位体ピークより S の有無及び個数を確認した。夾雑ピークにより ^{34}S 同位体の存在有無が不明な場合でも Kendrick Mass defect (KMD) [CH_2] が同じ値を取るイオンピークがあり、そのピークで確認できる場合はその結果を参照した。3) 分子式を構成する元素及び原子数は C 1 以上、H 1 以上、O 0 以上、N 0 以上、S 0~2 (2 価の時のみ 0~4)、Na 0~2 (Na はポジティブイオンモードのみ) とし、質量精度 1.5ppm として存在する可能性のある候補の式を検出した。なお、窒素の個数の偶奇は窒素ルールに準じて決定した。4) 存在する可能性の低い分子式を除くため、

原子数は以下の式に従うとした。 C_2O 、 C_2N 、 $2\text{C}+\text{N}+4\text{H}\geq\text{C}/3$ (ポジティブイオンモードの場合)、 $2\text{C}+\text{N}+2\text{H}\geq\text{C}/3$ (ネガティブイオンモードの場合)。5) 質量誤差 1.5ppm では該当する分子式の候補がなくなる場合、質量誤差を 5ppm まで許容した。6) 以上の手順で一つに絞られなかった場合は、質量誤差が一番小さい候補式を採用した。

3. 結果

(1) 固相抽出による回収率

各固相抽出の TOC 回収率を図 1 に示した。PPL の回収率は 45.3% であり、C18 の回収率 (30.9%) よりも高かった。PEP は、PPL と同様の抽出原理が想定されたが、実際の回収率は 19.2% と最も低く、顕著な差が見られた。C18 の固相抽出について、有機物のマスバランスに着目すると、樹脂に捕捉されずに通過した TOC は全体の 26.9% に相当していた。このことは、樹脂に 75% 程度の有機物が捕捉されていることを意味しており、溶出条件の検討により、回収率を向上できる可能性があると考えられる。なお、C18 の洗浄液の TOC は、全体の 3.5% であり、洗浄工程による損失は大きくないことも確認できた。

(2) FT-MS による分析結果

各固相抽出で得られた下水二次処理水中の有機物を FT-MS で分析した。検出されたピークの重複の状況を図 2 に示した。いずれの抽出物についても、ポジティブイオンモードでより多くのピークが検出されるという特徴が見られた。各固相抽出法における検出ピーク数を比較すると、ネガティブイオンモードでは、TOC 回収率と同様に $\text{PPL} > \text{C18} > \text{PEP}$ の順になったが、ポジティブイオンモードでは、 $\text{C18} > \text{PPL} > \text{PEP}$ の順であった。また両イオンモードにおいて、C18 のみ、もしくは PPL のみ検出されているピークが、それぞれの抽出法で検出される物質の約半分を占めた。PEP のみ検出されたピー

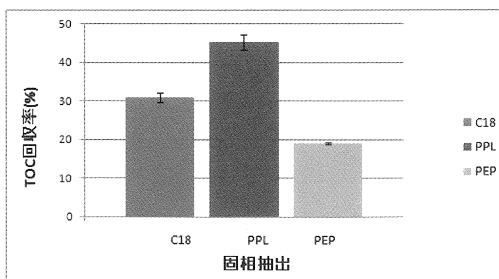


図1 各固相抽出法における TOC 回収率の比較 (平均値±標準偏差)

クも見られたが、その数は両イオンモードとも全体の 1 割未満であり、抽出率の高い C18、PPL に加えて抽出率の低い PEP を追加的に用いるメリットは余り多くないといえた。

分子式を同定した有機物群を、H/C 元素比、O/C 元素比でプロットする van Krevelen Diagram を用いて整理した (図 3)。同種の有機分子は、それぞれある一定範囲の H/C 元素比及び O/C 元素比を有することから、大まかにグループ化できる。既に報告されている有機物グループを図 3 に重ねて円で示した⁴⁾。下水二次処理水に含まれる有機物は、リグニン、タンパク質、脂質、炭化水素、被子植物由来の物質などに近い元素組成を有する多様な成分から構成されることが示唆された。特に C18 では被子植物由来の物質、H/C : 0.5-1.5 かつ O/C : 0.05-0.15 の物質が、PPL では H/C : 1.5-2.5 かつ O/C : 0.05-0.2 の物質、リグニンがより多く検出された。一方 PEP では検出ピーク数が少ないこともあり C18、PPL と比べて特徴的な検出は見られなかった。下水二次処理水中に含まれる有機物があるグループに限定することなく網羅的に分析するには C18、PPL 両方で検出する必要性が示された。

PEP のみでしか回収できない物質数も少なく下水二次処理水への固相抽出としては適当ではなかった。一方で C18 と PPL は、一方でしか回収できない物質は各固相抽出液の検出総数の半分以上の数あり、C18 と PPL が別の種類の有機物を捕捉している事が分かった。回収率と化合物数の両面から、C18 では抽出できないような極性物質にも注目する重要性が示された。同時に下水二次処理水の有機物組成を網羅的に分析するためには PPL だけではなく PPL、C18 の両方を用いることが有用と考えられた。

参考文献

- 1)環境省：平成 22 年版環境・循環型社会・生物多様性白書，2010
- 2)今井章雄：湖沼における新たな問題，土木学会誌，Vol.85，No.7，pp.53-55，2000.
- 3)天野耕二，松本邦治，今井章雄，松重一夫：河川水中の溶存有機物分画データと流域特性の関係，水環境学会誌，Vol. 27，No.10，pp.659-664，2004.
- 4)Frauke Schmidt, Marcus Elvert, Boris P. Koch, Matthias Witt, and Kai-Uwe Hinrichs: Molecular characterization of dissolved organic matter in pore water of continental shelf sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol.73, No.11, pp.3337-3358, 2009.

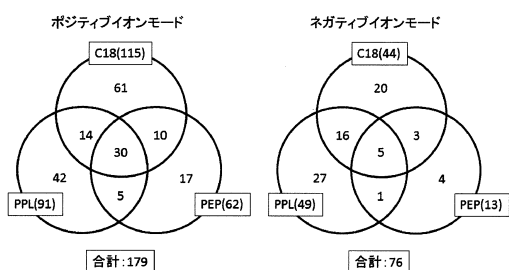


図2 各固相抽出物のポジティブ/ネガティブイオンモードによる検出ピーク数

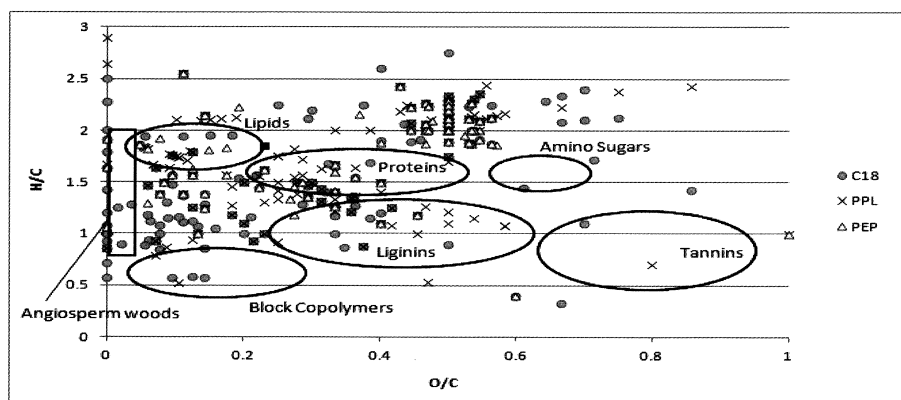


図3 分子式同定した下水二次処理水中有機物の H/C および O/C の比較 (図中の円は既報の結果⁴⁾)