

## ゲルクロマトグラフィーにおけるUV、TOCデータの連続同時測定とその適用

八巻さゆり 野尻 喜好 増田 武司

### 要 旨

ゲルクロマトカラムからの溶出液を分光光度計、全有機炭素計へ送り、一定時間間隔の紫外部吸光度(UV)、全有機炭素量(TOC)測定データをデータロガー、クロマトパック等を用いてコンピュータに取り込み、データファイルを作成し、さらにプロッターでクロマトグラムを作図するシステムを作成した。

従来の操作に比べ、低濃度の試料についても高精度で、迅速簡単な測定が可能であり、ゲルクロマトカラムで分離を始めてから約7時間でUV、TOCのクロマトグラムを書き出すことができた。

また、このシステムを利用し、ゲルクロマトグラフィーを用いて、汚濁河川における浄化実験やし尿処理水の高度処理効果に関する評価を行った。

### 1 緒 言

環境水中の有機物の指標としては、一般にBOD、COD、あるいはTOCなどが用いられている。しかし、これらは有機物量を全体的に捉えて一つの数値で表現しており、組成についての情報は得られない。そこで、近年、ゲルクロマトグラフィーを用いて環境水中の有機物分子量を分画し、各分画について、TOC、UVなどを測定することにより、有機物を二次的に評価する手法が、下水の処理過程の評価、河川水の自浄作用の解明など数多くの研究に用いられてきている<sup>1-4)</sup>。

しかし、この手法を用いる場合、一般的には、ゲルクロマトカラムからの溶出液をフラクションコレクターで分取した後にTOC、UVを測定するため、分取量を少なくして測定精度を上げようとすると測定に時間がかかる、また、試料の有機物が低濃度の場合は測定前のコンタミネーションが起こりやすい。一方、試料の濃縮倍率を上げると、その過程で有機物の変性が生じる危険性がある。

そこで、今回、既存のUV計、TOC計、TOC自動試料注入装置、データロガー、パソコン等を用いて、ゲルクロマトグラフの溶出液のUV、TOCデータサンプリングを自動化し、データ処理、クロマトグラムの作図まで連続して行うシステムを構成したところ、従

来の方法に比較して低濃度で精度よく迅速簡単に測定することが可能になったので紹介する。また、このシステムで測定した結果を用いて、汚濁河川での隣間接触酸化法を用いた浄化実験の効果の解析やし尿処理水の高度処理に関する評価を試みたので報告する。

### 2 装置の構成

本実験で作成したシステムの概要を図1に、また、使用した主な装置を表1に示した。

システムの各部についての説明を以下に記す。

#### 2・1 ゲルクロマトカラム

使用したカラムは、内径2.6cm長さ100cmのガラス製で、カラムジャケットの水は恒温式循環水槽につなぎ25℃に設定した。試料の注入及び溶離液送入の流量制御は、ペリスタポンプP1により行った。P1はギア交換により流量を選択するタイプで、1.5ml/分の安定した流量が得られた。ゲルの圧縮、流量の低下を防ぐために上向法で流出させた。

#### 2・2 紫外部吸光度測定

ゲルクロマトカラムからの溶出液の紫外部220nm

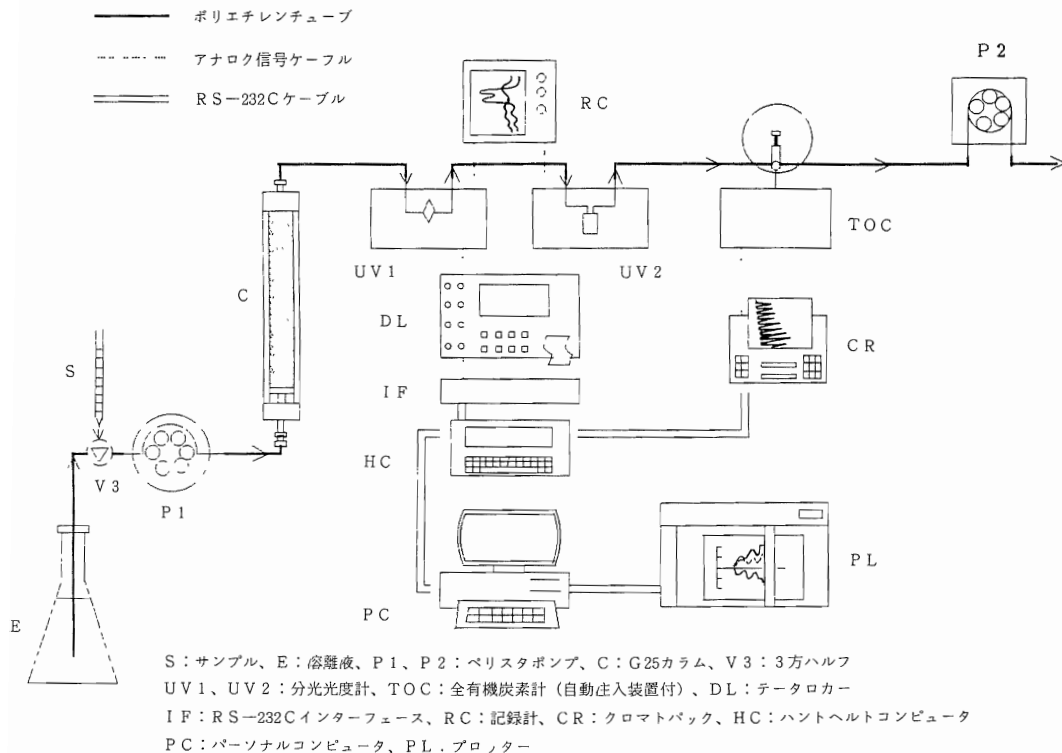


図1 システムの概略

表1 主な使用装置

ケルクロマトカラム	ファルマシア、Kカラムシステム (ジャケット付)
分光光度計 UV1	島津、UV-120-02
分光光度計 UV2	島津、UV-150-02
全有機炭素計	島津、TOC-10B 自動試料注入装置 ASI-501
テータロガー	A&D、マルチロギングメータ AD-5311
RS-232Cインターフェース	A&D、インターフェースアダプター AD-8522
クロマトパック	島津、CR2A(X)
ハンドヘルドコンピュータ	NEC、PC-8201
パーソナルコンピュータ	NEC、PC-9801VM2
プロッター	グラフィック、マイプロットIII MP2000

と260nmの吸光度( $A_{220}$ 、 $A_{260}$ )を、分光光度計2台(UV1、UV2)を用いて測定した。

UV1では、カラムから溶出液を導いてくるポリエチレンチューブをセミオートフローセルユニット(島津、SFU-120)の試料注入口に接続した。フローセルは光路長10mm、容量は約0.36mlであった。UV2では

角型セルホルダーにマイクロフローセル(光路長10mm、容量約0.4ml)を取り付けて使用した。UV1、UV2のフローセル間のチューブ容積は、約1.3mlで約50秒のタイムラグが生じている。

このUV1、UV2の測定信号をモニターのためにレコーダへ送ってチャートを記録すると共に、マルチロ

ギンクメータAD-5311で収集し、さらに、RS-232Cを介してハンドヘルドコンピュータ（ハンドヘルド）へ1分間隔で $A_{220}$ 、 $A_{260}$ のデータを転送し、UVデータファイルを作成した。

### 2・3 TOC測定

全有機炭素計の付加装置である自動試料注入装置を利用して自動測定を試みた。この装置はマイクロシリンジによる試料注入操作をロボット化したものである。

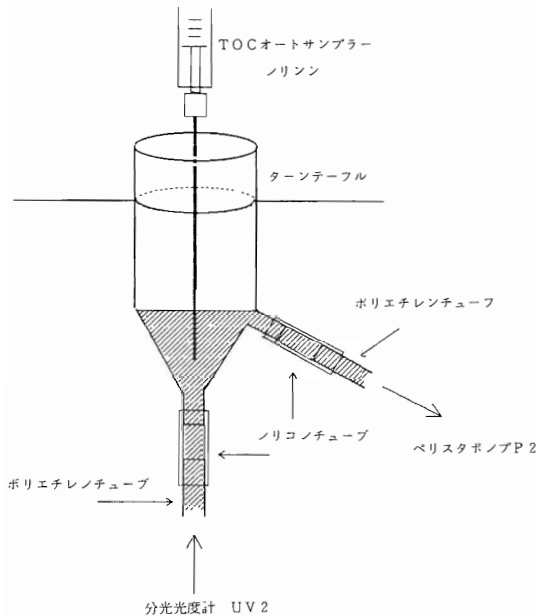


図2 TOCフローセル

そこで、図2に示すTOC用のマイクロフローセルを作成し、マイクロシリンジの試料採取部に取り付けた。UV2通過後の溶出液をセルの下端から取り込み、セル横の排出口に取り付けたポリエチレンチューブをペリスタポンプP2につなげて排出させた。そして、このセル中の溶出液を、約4分間隔で $40\mu\text{l}$ ずつマイクロシリンジで採取しTOCの自動連続測定を行った。UV2とTOCのフローセル間のチューブ容積は約 $1.7\text{ml}$ で、約68秒のタイムラグが生じている。

このTOC出力信号をクロマトパックで処理し、測定終了後、RS-232Cを介してハンドヘルドへ溶離時間、ピーク高さ等のデータを転送し、TOCデータファイルを作成した。

TOCのフローセルを通過した溶出液は、フラク

ションコレクターに導入して他の項目の試験に供するか、メスシリンダーに入れて溶出量の確認に用いた。

### 2・4 データ処理

ハンドヘルド上に作成したUV、TOCの2つのデータファイルを、RS-232Cを介してパソコンへ転送した。このファイルを基に、横軸が溶出液量 ( $\text{ml}$ )、縦軸のプラス方向がUV (ABS)、マイナス方向がTOC ( $\text{mg}/\text{l}$ ) の標準的なクロマトグラムをプロッターで作図した。UV1、UV2及びTOC間のタイムラグはここで補正した。

## 3 実験

### 3・1 試料の前処理

試料は $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで減圧あるいは加圧ろ過し、TOC、ICを測定した。その後、TOC濃度で約 $30\text{mg}/\text{l}$ 以上になるように、ロータリーエバポレーターを用いて $36^\circ\text{C}$ 以下で減圧濃縮し、再度 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過して析出物を除去した。

また、一般にゲルクロマトグラムの溶出液のTOC測定は、フラクションコレクターで分取したものについてTC、ICを測定して求める方法と、ICを除去して直接TOCを測定する方法がある。しかし、今回の装置では、溶出液を直接フローセルに受けてTOC測定を行うため、途中でICを除去することは困難であった。そこで、濃縮ろ過後の試料を微量の塩酸でpH4に調整し、減圧下で超音波による脱気処理を行うことによりあらかじめ試料の二酸化炭素を除去した。

### 3・2 操作

カラムにSephadexG-25,Fine (ファルマシア)を約 $90\text{cm}$ の高さに常法に従って充填した<sup>5)</sup>。溶出液量と分子量の関係を既知の分子量を持つ数種類のポリエチレングリコールを用いてチェックした。排除限界は、分子量約 $2500-2800$ であった。溶離液の水は、蒸留水をあらかじめ沸騰し、脱気したものを放冷して使用した。

測定前に、G-25カラムに溶離液を流速 $1.5\text{ml}/\text{分}$ で約 $1000\text{ml}$ 流し、安定させる。また、この時、システム全体にも溶離液を流し、洗浄する。UV計、TOC計はウォーミングアップを完了させておく。

三方バルブの上端に取り付けた $10\text{ml}$ のメスピペット

から試料を注入する。ペリスタポンプをスタートして溶離を開始した時刻を溶離開始時刻とし、UV、TOCデータの取り込みも同時に開始する。サンプルを10ml注入した時点で、ポンプを停止し三方バルブを溶離液側に切り替え、直ちにポンプを再スタートさせる。溶出液約500ml(約5時間30分)でUV、TOC計、データの取り込みを停止する。データファイルの転送を行い、プロッターに作図、結果の解析を行う。

ゲルの充填、安定化、試料の濃縮操作等の準備が完了していれば、1サンプルの測定からデータ解析まで約7時間で行うことが可能であった。

## 4 測定例

### 4・1 溶離液のゲルクロマトグラムに及ぼす影響

環境試料にゲルクロマトグラフィーを適用する場合、溶離液は蒸留水を用いるのが一般的である。しかし、試料中の無機塩濃度が低い時は、酸性物質や塩基性物質がゲルの官能基(カルボキシル基等)の影響により分子ふるい効果以外の諸効果(イオン排除効果や吸着効果)を受ける。これは、無機塩を加えイオン強度を一定にする事により抑制されるが、溶出パターンが平滑化されパターン分析が困難になる傾向がある。

本システムを用いて、河川水(市野川、徒歩橋)について溶離液を蒸留水、0.025M硫酸ナトリウム水溶液、pH3.3に調整した希硫酸溶液とした場合それぞれのクロマトグラムを測定し、パターンに与える影響を比較した。ろ過後の河川水を10倍濃縮して試料とした。試料のTOCは27.4mg/lであった。

図3にそれぞれの溶離液のゲルクロマトグラムを示す。TOCのクロマトグラムを見ると、蒸留水を溶離液とした場合は、排除限界の165ml付近から立ち上がって290、355、390mlに鋭いピークを持つパターンを示す。希硫酸の場合は、蒸留水の場合とパターンは類似しているが、355mlと390mlのピークがそれぞれ20ml程度低分子側へシフトする特徴がある。これは、イオン排除効果が多少抑制され、ゲルの粒子内部に進入した結果逆に吸着が生じたものと考えられる。溶離液を硫酸ナトリウム水溶液とした場合、蒸留水で見られた290、355、390mlの3つのピークが消失し、345ml付近のブロードなピークとなり、クロマトグラムのテーリングも長い。これは、硫酸ナトリウムによってイオン強度が一定となり、イオン排除効果が抑制され、カラ

ム本体との吸着が多少生じたためと考えられる。ピークの形状から考えて、蒸留水、希硫酸を溶離液とした場合には、イオン排除効果に依存する物質がかなり多いと考えられる。し尿処理水等についても溶離液の影響を検討したところ、ほぼ同様の傾向が得られた。

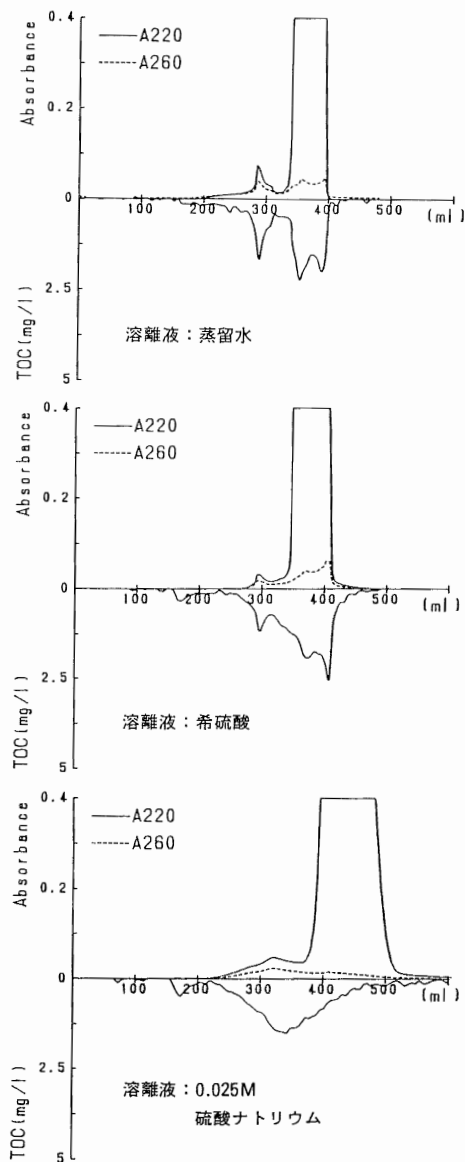


図3 溶離液のゲルクロマトグラムに及ぼす影響  
試料：河川水(市野川、徒歩橋)  
10倍濃縮

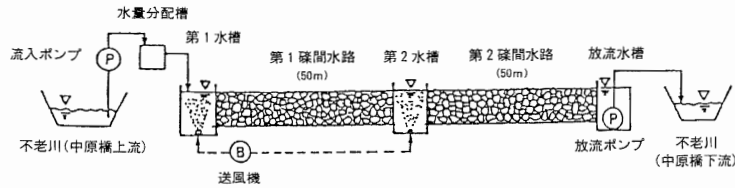


図4 実験施設の概要 (7)より転載)

#### 4・2 汚濁河川での浄化実験効果評価

昭和61年7月から昭和62年1月まで、生活排水による汚濁の著しい不老川の狭山市南入曽において、埼玉県川越土木事務所が、礫間接触酸化方式を用いた浄化実験を行った(図4)。水路を1m幅で4つに区切り、流入水量、曝気風量を変え、曝気付礫間接触法2系列、礫間接触法2系列の比較を行った<sup>7)</sup>。

ここでは、曝気付礫間接触法を行った系列2を取り上げ、2-1(第1礫間水路末端で採水)、2-2(第2礫間水路末端で採水)の検体のゲルクロマトグラムを測定し、不老川原水(水量分配槽で採水)と比較して礫間接触酸化法による河川水の溶解有機成分の除去特性を評価した。系列2は、流入水量600m<sup>3</sup>/日で、礫間水路前と水路中間の2ヶ所に設置された水槽で対水量5倍の曝気を受ける。検体は1月24日に採水し、5倍濃縮して試料とした。原水、2-1、2-2の試料のTOC濃度はそれぞれ63.8、50.8、61.9mg/lであった。

図5にそれぞれの試料のゲルクロマトグラムを示す。原水と2-1のTOCを比較すると、400mlのピークの大きさは殆ど変わらないが、300、340、380ml付近のピークが2-1では大きく減少し、また、排除限界付近(約165ml)のピークは増加している。これは、礫間接触の生物酸化により生物易分解性の物質が分解したために300-380mlのピークが減少し、生物代謝の結果として高分子物質が生産されて165mlのピークが増加したと考えられる。この高分子物質は好気性生物処理過程で中間代謝物質として生じる高分子多糖類と思われる<sup>2-3)</sup>。さらに、2-2のクロマトグラムを見ると2-1と同様のパターンを示しており、165ml付近のピークが多少増加している。2-2は、2-1の処理の2倍の礫間接触距離があるが、クロマトグラムからは流下距離延長の効果はあまり認められなかった。第1水路(50m、約4時間)の滞留中に溶解性の生物易分解性の有機物質はかなり分解されたものと思われる。

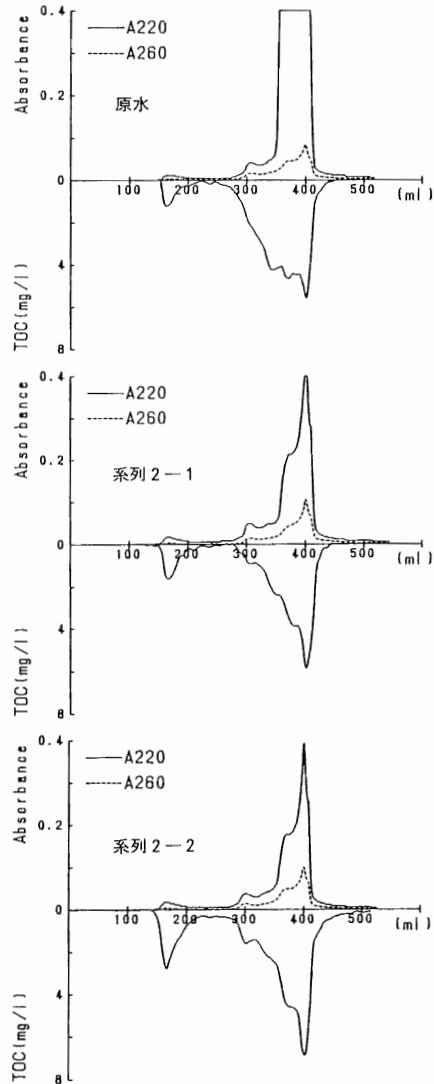


図5 不老川浄化実験施設の原水及び第2系列(Case 2)のゲルクロマトグラム  
溶離液: 蒸留水

#### 4・3 し尿処理水の高度処理効果評価

し尿処理工程における生物処理後の二次処理水に対し、凝集あるいはオゾン酸化の高度処理実験を行い、二次処理水、凝集処理水、オゾン酸化処理水、凝集+オゾン酸化処理水のゲルクロマトグラムを用いて、それぞれの処理効果の評価した。

凝集処理は、凝集剤に硫酸アルミニウムを使用し、pH5.5で行った。二次処理水1ℓに対し硫酸アルミニウム400mgを注入した。オゾン酸化処理は、山口ら<sup>9)</sup>の方法に従った。オゾン化空気(オゾン濃度3.0mg/ℓ)を二次処理水1ℓに対し44ℓ、凝集処理水1ℓに対し25ℓそれぞれ通気した。各処理水を4倍濃縮して試料とした。二次処理水、凝集処理水、オゾン酸化処理水、凝集+オゾン酸化処理水のTOC濃度はそれぞれ

108、53.5、83.4、48.0mg/ℓであった。

図6に、それぞれの試料のゲルクロマトグラムを示す。二次処理水と凝集処理水のTOCを比較すると、凝集処理水では185、300ml付近のピークがほとんど消失している。これは、凝集処理によって、二次処理水中の比較的高分子域の有機物が良く除去されたためと考えられる。また、400ml前後の大きなA<sub>220</sub>のピークは硝酸イオンによるものと考えられるが、このピークが変化していないことから硝酸性窒素は凝集処理ではほとんど除去されないことが示される。これは、イオンクロマトグラフィーを用いて試料の硝酸イオンを測定した結果と一致した。次に、二次処理水とオゾン酸化処理水を比較すると、オゾン酸化処理水のTOCのピークは、二次処理水のピークと比べて200ml付近で

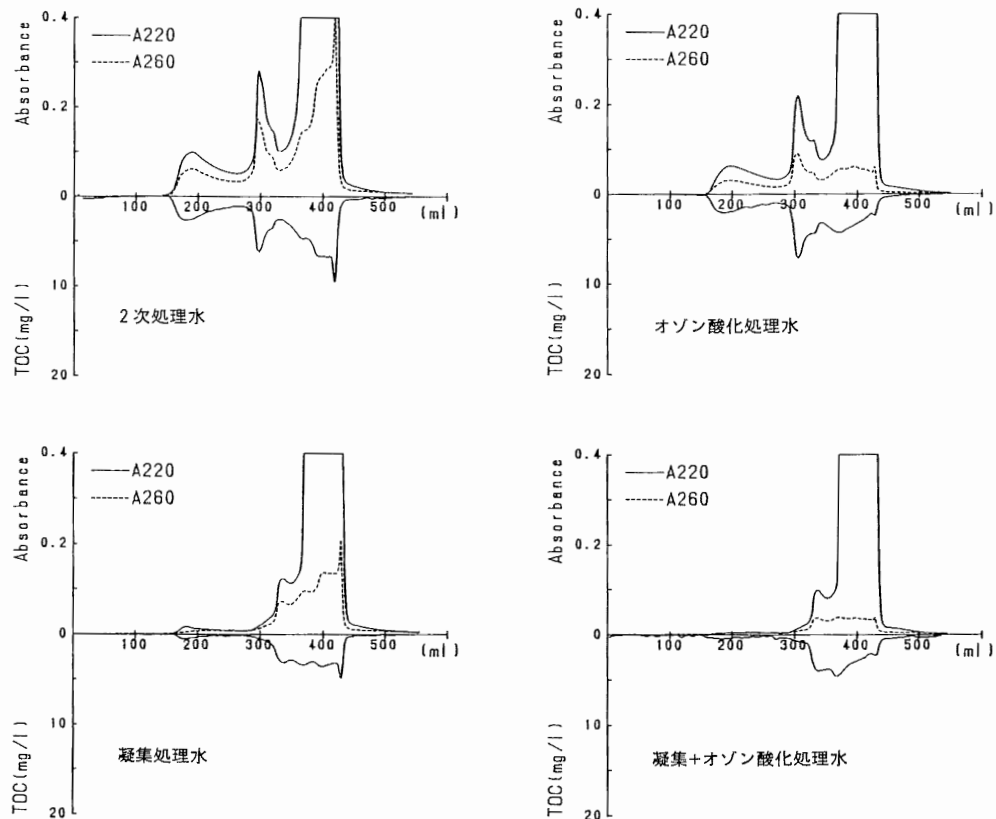


図6 し尿の2次処理水及び高度処理水のゲルクロマトグラム  
溶離液：蒸留水

は減少し、300ml付近では増加している。これは、オゾン酸化により高分子量の有機物質の分子が切断され、低分子化が起きたためと考えられる。また、凝集処理後、さらにオゾン酸化処理を行った場合のクロマトグラムを見ると、TOC、 $A_{220}$ のピークは凝集処理のみの場合とほとんど変わらないが、 $A_{260}$ のピーク全体は低くなっている。オゾンが260nmの波長の光を吸収する物質、すなわち、処理水中に存在する有機分子中の不飽和結合と反応しやすいことが分かる。

## 5 結 語

今回作成したシステムを用いることにより、ゲルクロマトグラフィーにおけるUV、TOCの測定、データの蓄積、作図による解析を精度よく、簡単迅速に行うことが可能となった。また、溶出液はTOC測定にごく微量使用されるだけなので、フクラシオンコレクターに分取後、他の特定成分の分析に供することが可能であることも大きなメリットであると考えられる。ゲルクロマトグラフィーの場合溶出液量が多いことを生かして画群に対する情報を増やしていくことが必要だと思われる。

一方、ゲルクロマトグラムのパターン解析を主として考えた場合、短時間で測定が行える高速ゲルクロマトグラフィーが有効な手段として注目されている。現在では、検出器として主にUV、RIが用いられているが、有機物絶対量を示し得るTOCを検出器として接続できるように改良し、ゲルクロマトグラフについて今回作成したシステムと同等のものを、高速ゲルクロマトグラフについても作成することを検討している。

## 文 献

- 1) 亀井翼・丹保憲仁：水質のマトリックス的評価のためのゲルクロマトグラフィー，水道協会雑誌、〔519〕，24-41,1977.
- 2) 丹保憲仁ら：好気性生物化学プロセスからの代謝廃成分の挙動と性質（I），下水道協会誌，〔210〕，1-10,1981.
- 3) 富士元英二ら：ゲルろ過法による高度処理プロセスの評価，用水と廃水，26(12)，1284-1294,1984.
- 4) R.Gloor et al.: Exclusion Chromatography with Carbon Detection. A Tool for Further Characterization of Dissolved Organic Carbon, Water Res., 15, 457-462, 1981.
- 5) L.Fischer著,永井裕, 林利彦訳：ゲルクロマトグラフィー，東京化学同人,1974
- 6) R.A.van Steenderen and A.Malherbe : The Molecular Mass Distribution of Organic Compounds in Activated Sludge Plant Effluent Determined by Means of Gel Permeation Chromatography, Water Res., 16, 745-748, 1982.
- 7) 埼玉県川越土木事務所，日本上下水道設計株式会社：不老川の浄化対策に伴う浄化実験調査および実施プラントの検討報告書，昭和62年3月
- 8) 山口明男ら：オゾンによる染色排水の処理の研究（第2報），埼玉県公害センター年報，〔13〕，94-99,1986.