

環境汚染原因物質の検索方法に関する研究（第1報）

Analysis of Environmental Organic Pollutants (Part1)

稲村 江里 小林 進 小野 雄策

要 旨

廃油処理を行っている事業所の近くで、地下水（井戸水）汚染によるものとみられる臭気の問題がおきた。そこで、有機スポットテスト、高速ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（高速GPC）による分子量分画クロマトグラムの比較、アンバーライトXAD-2樹脂で抽出した中性物質のガスクロマトグラムの比較及びXAD-2樹脂の酸性物質分画の検討を行った結果、井戸水汚染は明らかに廃油処理事業所から出てくる水と密接な関連があることがわかった。特に、水系ゲルを用いた高速GPCによる分子量分画クロマトグラムはこのことを良く示していた。また、XAD-2樹脂で分画した酸性物質は蛍光をもち、その蛍光物質はUV吸収スペクトルで245nm付近に吸収がある芳香族化合物であることがわかった。

1 はじめに

最近、トリクロロエチレン等の有機ハロゲン化合物による地下水汚染が問題となってきた。特に、先端技術産業では集積回路製造の際、洗浄工程での使用量は多く、使用後の処理に伴う汚染が多発している。

使用済溶剤は蒸留して回収されるが、その残渣は焼却処分されるか、最終処分場に埋立てられ、それぞれ大気汚染や地下浸透による地下水汚染をひきおこす。

また、地下水汚染の問題は、一般廃棄物や産業廃棄物の最終処分場への埋立てもその一因をなしており、これは、廃棄物埋立の際に生ずる浸出水が地下浸透することによって、地下水が汚染されるものと考えられる。

他方、いろいろな工場の敷地内で、工場から排出された廃水や廃棄物を不用意に放置したり、十分な施設を用いずに処理処分しようとする場合、有害物質が地下に浸透し、地下水を汚染する場合もある。

そこで、これらのいろいろな原因によって環境汚染問題が生じた場合に、その原因となる事業場、原因物質、汚染経路及び汚染範囲などを早急に調査するための手法を確立することは重要である。

たまたま、廃油処理を行っている事業所の近くで、地下水（井戸水）汚染によるものとみられる臭気の間

題がおきたため、汚染の因果関係について調査したところ、若干の知見を得たので報告する。

2 試料及び調査方法

2.1 試料

汚染井戸と廃油処理事業所との位置関係及び試料のサンプリング場所を図1に示す。試料は6件で、その

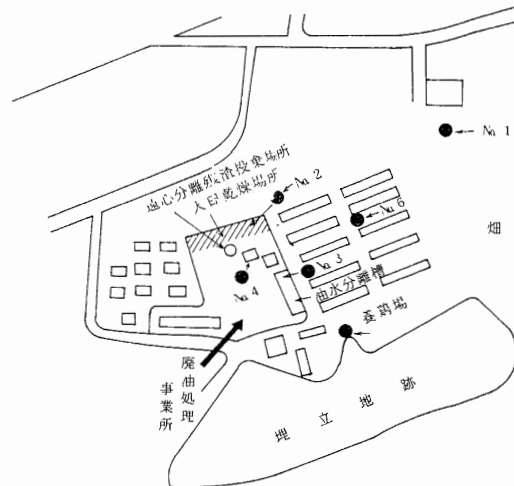


図1 汚染井戸No.1と廃油処理事業所との位置関係と試料のサンプリング場所（No.1～No.6）

種類は次のとおりである。

- No. 1 汚染井戸水 (深さ 6 m)
 - No. 2 廃油が少し混じった廃液の天日乾燥試料
 - No. 3 油水分離槽出口の施設排水
 - No. 4 貯槽水
 - No. 5 バックグラウンドとして採取した養鶏場内の深さ 30m の井戸水
 - No. 6 養鶏場内の深さ 5 m の井戸水
- それぞれの試料水の色は、No. 1 と No. 6 が薄黄色、No. 2 と No. 3 が暗茶色、No. 4 が暗赤茶色、No. 5 は無色透明であった。また、No. 5 以外は蛍光がみられた。

2.2 調査項目

それぞれの試料について、pH、EC、有機スポットテスト¹⁾、高速ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (高速GPC) による分子量分画クロマトグラムの比較²⁾、アンバーライト XAD-2 樹脂で抽出した中性物質のガスクロマトグラムの比較³⁾、及び XAD-2 樹脂の酸性物質画分にある蛍光をもつ物質についての紫外部 (U-V) 吸収スペクトルと薄層クロマトグラフィー (TLC) の比較、またその蛍光物質の蛍光スペクトルについて測定した。

表1 有機スポットテスト法

項 目	分 析 方 法
予 備 試 験	アンモニウム塩生成による有機酸 試料にアンモニアを加えて、アンモニウム塩を作り、120℃に熱すると分解し、アンモニアを生成するため、このアンモニアをネスラー試薬と反応させ、赤褐色の沈澱として確認する。 シュウ酸、クエン酸、酒石酸、マロン酸、コハク酸、フタル酸等の強酸性、中級程度のカルボン酸やスルホン酸を確認できる。キ酸、酢酸、プロピオン酸のような弱酸性有機酸は検出不能。
	リンモリブデン酸による還元性物質 モリブデン化合物はリンモリブデン酸の錯イオンの状態では還元性有機物に容易に還元され、モリブデンブルーになることを応用して確認する。 ベンズアルデヒド (10μg)、フェノール (0.1μg)、レゾルシン (0.01μg)、アニリン (5μg)、チオ尿素 (5μg)、ハイドロキノン (0.05μg) などを検出。
	カップリングし得る化合物に対するエールリッヒのシアソ試験 亜硝酸でスルファニール酸のジアソニウム塩を作り、これとフェノール類・芳香族アミン類をカップリングさせ、それぞれ酸性アゾ色素、塩基性アゾ色素として確認する。 フェノール (0.2μg)、レゾルシン (0.8μg)、α-ナフトール (2μg)、アニリン (5μg) などが検出される。
各 個 試 験	ミロン試薬によるフェノール類 フェノール類は、ミロン試薬と反応して赤色に呈色することを利用。 フェノール (1μg)、レゾルシン (0.5μg)、ハイドロキノン (10μg)、ピロガロール (5μg)、p-ニトロフェノール (2μg)、O-オキシベシズアルデヒド (5μg)、α-ナフトール (1μg) などを検出。
	O-ジアニジンによるアルデヒド O-ジアニジンがアルデヒドと縮合し、着色シッフ塩基をつくる。 ホルムアルデヒド (50μg)、アセトアルデヒド (30μg)、アクロレイン (0.1μg)、クロトンアルデヒド (2μg)、アニスアルデヒド (2μg)、p-アミノベンズアルデヒド (5μg)、フルフラール (0.24μg)、バニリン (3μg) などが検出される。
	p-シメチルアミノベンズアルデヒドによるピロール ピロールは、p-シメチルアミノベンズアルデヒドと反応し、赤紫色を呈することを応用して検出する。 ピロール (0.04μg)、インドール (0.06μg) を確認できる。
	フルオレッセインクロリドによる第1アミン、第2アミン 脂肪族第1アミンと第2アミンは無水ZnCl ₂ の存在下、フルオレッセインクロリドと溶融すると、ロタミン系の色素を生じ、蛍光を呈する。芳香族アミンは無蛍光である。 メチルアミン (10μg-黄緑)、エチルアミン (10μg-黄緑)、ジエチルアミン (4μg-橙)、ピペリジン (4μg-橙)、ピロール (40μg-青)、インドール (12μg-青)、カルバゾール (30μg-青) を確認できる。

2・3 分析方法

有機スポットテストは、予備試験として、アンモニウム塩生成による有機酸とリンモリブデン酸による還元物質及びカップリングし得る化合物に対するエールリッヒのジアゾ試験を、また、各個試験としてミロン試薬によるフェノール類とロージアニジンによるアルデヒドとP-ジメチルアミノベンズアルデヒドによるピロール及びフルオレッセイクロリドによる第1アミンと第2アミンの7種類を行った。その方法について表1に示す。

高速GPCによる分子量分画は、Shodex OH-803カラムを用い、りん酸緩衝液を移動相として測定した。

測定は、655型日立高速液体クロマトグラフ=UV吸収検出器(220nm)で行った。

アンバーライトXAD-2樹脂は、米国ローム・アンド・ハース社製のをメタノール、アセトニトリル及びエーテルで各8時間ソックスレー抽出器を用いて順次洗浄し、メタノール中に懸濁させてガラスカラムに充てんし、XAD樹脂カラムを作成した。試料水2 l以上をXAD樹脂カラムに通し有機物を吸着させた後、0.1N塩酸、0.1N水酸化ナトリウム水溶液で順次塩基性成分と酸性成分を溶出させ、さらにエーテルにより中性成分を溶出させた。中性成分はクゲルナダニッシュ

濃縮器で濃縮した後、シリカゲルカラム(ワコーゲルC-200)により、イソオクタンで脂肪族炭化水素(画分1)を、イソオクタン:ベンゼン(1:1)で芳香族炭化水素(画分2)を、ベンゼン:メタノール(1:1)で含酸素化合物(画分3)を段階的に分取した。これらの画分について、ガスクロマトグラフィー(島津GC-7A型による)を行った。

UV吸収スペクトルと蛍光スペクトルはそれぞれ島津製UV-240型分光光度計及び日立650-60形分光けい光光度計により測定した。

3 結果

3・1 有機スポットテスト等の比較

pH、EC、有機スポットテストの結果を表2に示す。カップリングし得る化合物、たとえばフェノール類や芳香族アミン類は、6試料とも検出限界以下であった。有機酸類及び還元性物質は、バックグラウンドとしたNo.5の深井戸を除き、他の5試料はすべて陽性であった。また、P-ジメチルアミノベンズアルデヒドによるピロール反応は、No.1, 2, 4が陽性で、あとは陰性であった。フルオレッセイクロリドによる第1アミンと第2アミンの反応では、No.2とNo.3に青色がかった蛍光がみられたが、一般にピロール誘導体も

表2 有機スポットテスト 結果

項目		サンプル	No 1 No 2 No 3 No 4 No 5 No 6					
			No 1	No 2	No 3	No 4	No 5	No 6
予備試験	1	pH	6.0	7.8	7.9	5.3		
	2	EC (ms/cm)	1.1	5.2	4.0	2.5		
	3	アンモニウム塩生成による有機酸	+++	++	++	++	---	++
	4	リンモリブデン酸による還元性物質	+	+	+	±	-	±
	5	カップリングし得る化合物に対するエールリッヒのジアゾ試験	-	-	-	+(黄±)	-	-
各個試験	1	ミロン試薬によるフェノール類	-	-	-	-	-	-
	2	ロージアニジンによるアルデヒド	±	±	±	±	±	±
	3	P-ジメチルアミノベンズアルデヒドによるピロール	+++	++	---	++	---	---
	4	フルオレッセイクロリドによる第一アミン、第二アミン	黄緑	青色	青緑	黄緑	黄緑	黄緑

このような反応を示すため、No.2とNo.3にはピロール及びその誘導体が含まれているとも考えられる。しかし、P-ジメチルアミノベンズアルデヒドのピロール反応の結果とは一致しておらず、これは、検出限界や反応性のちがいによるものと思われる。黄緑の蛍光は、メチルアミンなどの脂肪族第1アミンによるものである。

以上のことから、汚染された井戸水と、天日乾燥用廃液及び貯槽水には何らかの関係があることが認められた。

3.2 高速GPCによる分子量分画クロマトグラムの比較

Shodex OH-803カラムを使用した、水系高速ゲルクロマトグラフィーによる分子量分画クロマトグラムを図2に示した。このクロマトグラムは、試料を0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過したものを直接分析して得たものである。

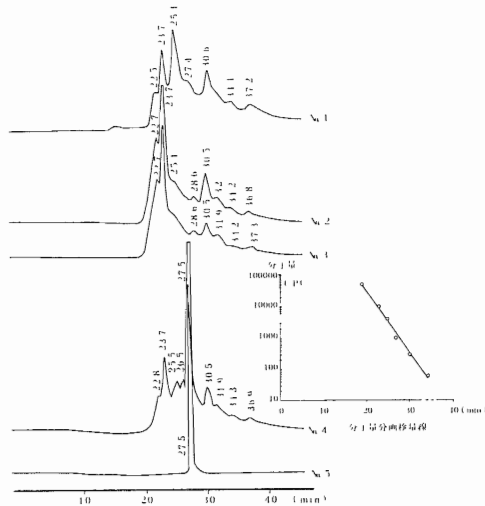
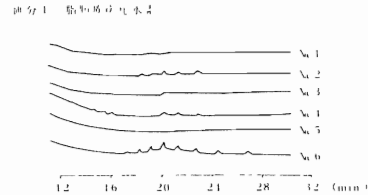


図2 高速 GPC による分子量分画クロマトグラム

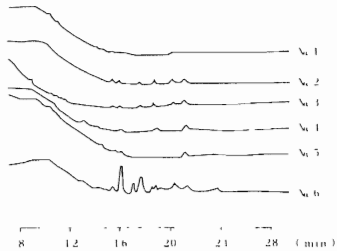
No.5の深井戸は硝酸態窒素のピーク (Rt 27.5分) しかみられないが、No.1, 2, 3及び4はいくつかのピークがみられ、またそのクロマトパターンはよく一致しており、それら試料の因果関係を明らかに示している。

3.3 アンバーライトXAD-2樹脂を用いて分画した中性有機化合物のガスクロマトグラフィーによる比較

古賀らの方法³⁾により分画した中性有機化合物の各画分について、ガスクロマトグラフィー (GC-FID) を行い、クロマトグラムパターンを比較した。画分1と画分2のクロマトグラムを図3に、画分3のクロマトグラムを図4に示した。また、任意に選んだ含酸素化合物について、画分3の場合と同条件でガスクロマトグラフィーを行い、そのクロマトグラムを図5に、化合物名を表3に示した。



画分1 中性有機化合物



画分2 芳香族化合物 (特に多環芳香族化合物)
 図3 XAD-2により分画した中性成分 (画分1と画分2) のガスクロマトグラム GC条件: 3% OV17, ガスクロムQ (80~100メッシュ) 2M×3mm カラム カラム温度 120° ~280°C (10°C/min)

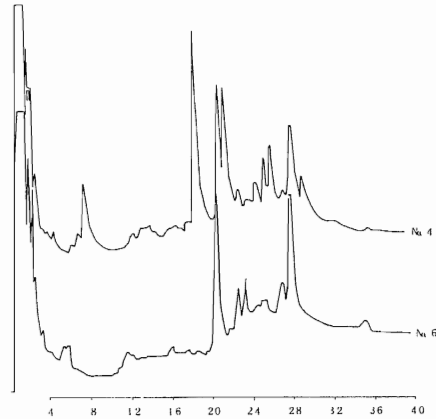


図4 XAD-2により分画した中性成分 (画分3) のガスクロマトグラム GC条件: 5% OV-225, ガスクロムQ (80~100メッシュ) 2M×3mm カラム カラム温度 120° ~200°C (5°C/min)

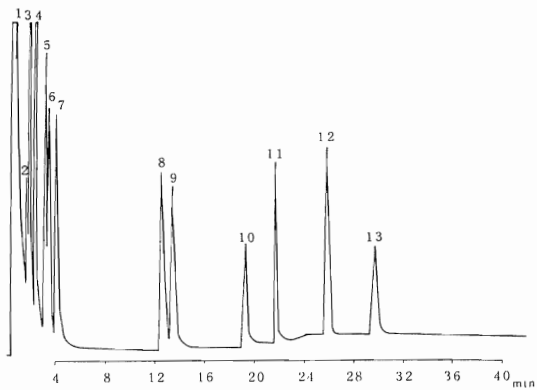


図5 標準物質のガスクロマトグラム
GC 条件：図4と同じ

脂肪族炭化水素はNo. 2, 4, 6に、芳香族炭化水素はNo. 2, 3, 6に検出された。両者ともピーク高が小さく、クロマトグラムパターンの比較はよくできなかった。

また、画分3の含酸素化合物はNo. 4とNo. 6についてしか検出できなかった。さらにいくつかの標準物質のクロマトグラムも作成して比較してみた。No. 4とNo. 6のクロマトグラムにおいて、同じリテンションタイム(Rt)のピークは20分付近と28分付近にみられるのみで、クロマトグラムパターンはあまりよく一致しなかった。また、任意に選んだ標準物質とRt.の一致するものはなく、物質の同定はできなかった。

表3 図5に示した標準物質の化合物名

ピークナンバ	化合物	M.W.
1	n-アミルアルコール	88
2	フルフラール	96
3	2-エチルヘキシルアルコール	130
4	ベンズアルデヒド	106
5	2,3-ジヒドロ2-メチルベンゾラフラン	134
6	安息香酸メチル	136
7	アセチルアセトン	120
8	3',4'-ジメチルアセチルアセトン	148
9	1-インタノン	132
10	m-ニトロベンズアルデヒド	151
11	フタル酸ジエチル	222
12	9-フルオレノン	180
13	フタル酸ジ-n-ブチル	278

3・4 XAD-2樹脂で分画した蛍光をもつ酸性物質について

試料はブランクのNo. 5を除き青い蛍光があり、XAD-2を用いて分画すると、その蛍光は酸性物質画分にあることがわかった。そこで酸性画分について190~300nmのUV吸収スペクトルをとるとともに、TLCを行い蛍光成分が同一のものかどうかの確認を行った。さらにその蛍光成分について蛍光スペクトルも測定した。UV吸収スペクトルを図6に、TLCを図7に、蛍光スペクトルを図8に示した。

UV吸収スペクトルは、ブランクとしたNo. 5の深井戸を除き、すべて245nm付近に吸収がみられ、芳香族

化合物が存在することを示している。スペクトルパターンはNo. 1, 2, 3, 4, 6とも非常に良く一致しており、それらの試料の間には関係があることを示している。

また、蛍光成分について展開溶媒ベンゼン：エタノール(1:10)でTLCを行うと、No. 5を除き、すべてRf値(0.86)の同一な蛍光物質が検出された。この蛍光物質は、極大励起波長315nm、極大けい光波長427nmの蛍光を示した。

天然水中にはいろいろな蛍光物質が含まれており、有機性汚濁との関連についても種々検討されている。有機性汚濁の指標として蛍光光度法を用いることは、

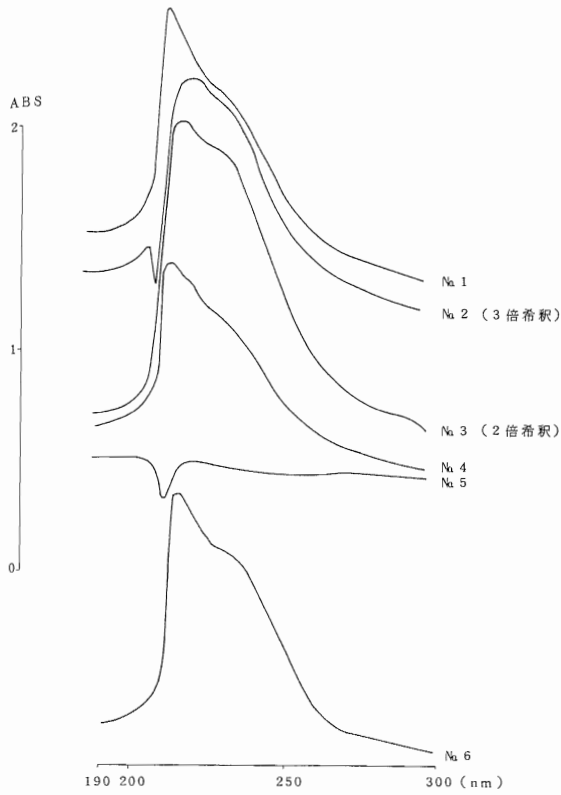


図6 XAD-2により分画した酸性物質画分の紫外吸収スペクトルの比較

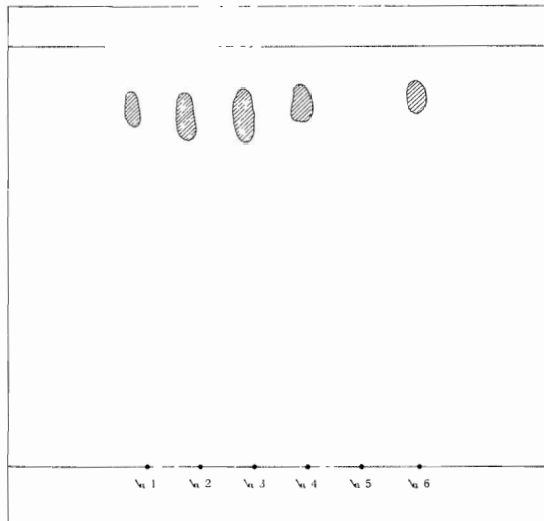


図7 XAD-2により分画した酸性物質画分の薄層クロマトグラフィー
展開溶媒；ベンゼン-エタノール (1:10)、硫酸発色

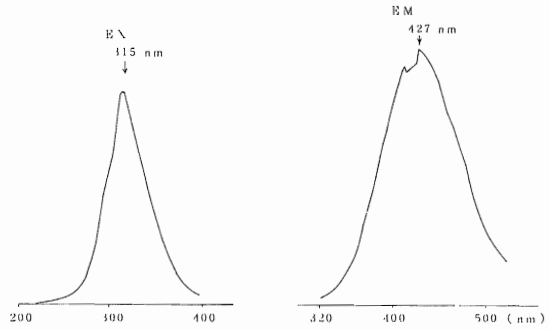


図8 XAD-2により分画した酸性物質画分の蛍光スペクトル (0.1N-NaOH So²)

感度が良く、しかも妨害物質が少ないなどの利点はあるが、蛍光物質については同定されている例が少ない。

4 考察

有機スポットテストは、水中に含まれるいろいろな有機成分の概略的な特性を判断するために有効な手段である。しかも少量の試料で、比較的短時間に簡単に行える上、ある物質や官能基に特有な呈色反応を利用していることが多く、水中有機成分について重要な情報を与える。しかしながら、スポット試料で行うということは、試料中に含まれている成分の絶対量が少ないことを意味し、高濃度に含まれているものだけが検出されることになる。また、それぞれの有機成分が同じ官能基を持っていたとしても、同じ条件のもので同じように反応するとは限らない。従って、有機スポットテストの結果のみで水中有機成分を判断することは危険であり、あくまで目安として利用すべきものである。

今回行ったスポットテストは、種類が少なかったために因果関係をはっきりと示すことはできなかった。今後、スポットテストの種類を増やすなどの充実をはかることにより、さらにはっきりした判断を可能にするよう、検討しなければならない。

また、高速GPCによる分子量分画クロマトグラフィーは、非常に有効な手段であることがわかった。それは、短時間で分析でき、しかもクロマトグラムパターンを比較するだけで、因果関係が明らかになるからである。しかしながら、220nmのUV吸収波長によって検出しているために、220nmにUV吸収のない物質は検出されず、屈折率検出法などの他の方法を併

用しなければならない。また、クロマトグラム上のピークを同定することは難しく、どのピークが主な汚染物質なのかを決めることが困難である。そこで、試料の検出や同定に極めて有効な手段であるマススペクトロメトリー (MS) を組み合わせ、高感度でしかも確実な同定や定量を行うためのシステムが開発されてきているが、まだ一般化されていない。従って、高速GPCはあくまでパターン分析として有効な手段であり、汚染物質を特定するためには、別の方法をとらなければならない。

アンパーライトXAD 2樹脂はほとんどの有機化合物を吸着し、しかもエーテルによって容易に溶出させることができるため、有機物濃縮の非常に有効な手段として使用できる。⁶⁾ しかも吸着させた有機化合物を、溶出溶媒を希塩酸、希水酸化ナトリウム水溶液、エーテルと順次変えることにより、アルカリ性画分、酸性画分、中性画分に分けることができる。中性画分はガスクロマトグラフィーやGC-MSで直接分析することにより、有機化合物を同定することが可能であり、また、酸性画分やアルカリ性画分も適切な処理をすることによりガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなどで分析することができる。今回の汚染源調査では、中性画分の有機化合物をさらに2つに分画してそれぞれのガスクロマトグラムを比較し、また酸性画分についてはTLC、UV吸収スペクトル、蛍光スペクトルを測定した。汚染の因果関係については、中性画分のガスクロマトグラフィーからははっきりしたことはわからなかったが、酸性画分の蛍光物質はTLCにより同一であることがわかり、明らかに関係があることが認められた。

また、TLCは一度に多種の検体を同時に展開することにより、短時間でそれぞれの検体中の成分を分離することができる。またRf値を測ることによって同一成分であるかどうかを知ることができる。その上、必要に応じてかき取り抽出を行うことにより、有機化合物を同定することも可能である。しかしながら、Rf値の非常に近い物質の分離は難しく、展開溶媒をいろいろと変えることによって分離するかどうかを検討しなければならない。

以上のように、臭気のある井戸水の汚染原因は廃油処理事業所であることを示すような実験の結果を得た。しかし、さらにそれを明確にするためには、天然には普遍的に存在しないような汚染源固有の物質をとらえ、これをマーカーとして汚染の因果関係を明らかにする

必要がある。従って、マーカー物質検索のために、汚染源固有の物質で、しかも地下浸透などの移動によっても変化することの少ない物質を特定するための手法を開発する必要がある。

たとえば、コプロスタノールは排泄物汚濁の有機指標として河川の排泄物汚染の状況を把握するための有力なマーカーとなる物質である。特に、し尿処理場の排水が流入する付近の河川底質にはコプロスタノールが著しく高く、排泄物汚染のない河川底質平均に比べると2000倍近い高濃度で検出されたと報告されている。⁷⁾ この場合、コプロスタノールの同定や微量検索にはGC-MSを使用しており、微量の汚染物質追跡にはGC-MSは不可欠のものとなってきている。

また、地下水汚染で最近特に騒がれているトリクロロエチレンなどの塩素系有機溶剤は、使用範囲が広く、しかも土壌の無機成分に吸着しにくい⁸⁾ため、地下浸透性が高く、地下水での検出率も高い。⁹⁾ トリクロロエチレンなどの有機溶剤は未規制ではあるが、ある程度分析方法や毒性の検討もなされており、いろいろな方向からのアプローチが多くの人によってなされている。¹⁰⁾

しかしながら、多種多様な廃棄物の投棄等による地下水汚染の場合、個々の汚染物質を特定することは難しく、またある程度汚染が進んでから着色・着臭などによって気がつくことが多い。その場合、汚染物質自体が未知であるために、どのような分析方法が適切であるかといったことがわからずに、方向ちがいの分析をしてしまう可能性もある。

特に、廃棄物由来の地下水汚染は、汚染原因物質の種類(有機物、重金属、酸・アルカリ、有毒物質、細菌その他)だけで決定されるものではなく、投棄方法(地下注入、地中埋設、衛生埋立、陸上投棄など)や、処分場所の周辺環境などによっても異なる。¹¹⁾ このような原因不明の地下水汚染は、今後著しく増加する傾向にあると思われる。従って、汚染の原因物質や汚染経路、汚染の範囲などを調査検討するための分析方法の確立や、汚染を示すマーカー物質の検索方法について検討することが急務であると思われる。

5 まとめ

有機スポットテストと高速GPCによる分子量分画クロマトグラフィーの結果、井戸水の汚染は廃油処理を行っている事業所から出てくる水と密接な関連があることがわかった。特に、水系ゲルを用いた高速GPCによる分子量分画クロマトグラムは、このことを

良く示すものであった。

また、アンバーライトXAD-2樹脂で分画した酸性物質は蛍光をもち、その蛍光物質はTLCで同じRf値をもつことがわかった。さらにその蛍光物質は、UV吸収スペクトルで245nm付近に吸収がある芳香族化合物であることがわかった。

文 献

- 1) 半谷高久, 安部喜也編著: 水質汚濁研究法, 245~266, 丸善 (1972)
- 2) 原昭二ら: ハイオメディカルクロマトグラフィー 第2集, 9~25, 南江堂 (1981)
- 3) 古賀実ら: GC-MSによる水道水および河川水中微量有機物の検索, 水質汚濁研究, 1, (1), 23~32, (1978)
- 4) P.L. Smart, et al. The Relation of Fluorescence to Dissolved Organic Carbon in Surface Waters, Water Research, 10, 805~811 (1976)
- 5) 安部明美, 吉見洋: 河川水に観測されるけい光物質について, 水質汚濁研究, 1, (3), 216~222 (1978)
- 6) G.A. Junk, et al. Use of Macroreticular Resins in the Analysis of Water for Trace Organic Contaminants, J.Chromatogr, 99, 745~762 (1974)
- 7) J.P. Hassett, G. Fred Lea. Sterols in Natural Water and Sediment, Water Research, 11, 983~989
- 8) 児玉剛則: 底質中における排泄物汚染指標としてのコプロスタノールについて, 水質汚濁研究, 7, (2), 51~54 (1984)
- 9) 杉戸大作: 地下水汚染, 水道協会雑誌, 52(10), 53~61 (1983)
- 10) 第4回日本水質汚濁研究協会セミナー講演資料集: 有機ハロゲン化合物による地下水汚染とその制御対策, 日本水質汚濁研究協会 (1984)
- 11) 井上頼輝, 森沢真輔: 地下水の汚染—その実態と傾向, 公害と対策, 10, (9), 919~930 (1974)