

19 河川の浄化機構に関する研究(第4報)

ガスクロマトグラフィーによる河川水中の低級脂肪酸の定量

堀川武夫, 田川専照, 塩谷勝夫

I 緒 言

河川の自浄作用に於て, BOD減少過程の最終中間生成物が酢酸を主体とする低級脂肪酸であることに注目して,^{(1)~(4)}河川水中の酢酸分解菌数と河川の自浄能との関係について報告されている。⁽⁵⁾⁽⁶⁾

我々は, し尿・下水処理排水の流入する汚濁河川をフィールドに選り, 浄化機構に関する調査研究を実施しているが, 具体的にどのような有機物で汚染されているのか, 又その挙動はどうかについて更に一步解明を進めるべく, 微量有機成分の検索を行なっている。ここでは, 低級脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる分析法を検討した結果, 若干の知見が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 試薬と装置

脂肪酸: 蟻酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, ノルマル酪酸の市販品特級であるが, 酢酸とプロピオン酸は一回蒸留したものを使用。各脂肪酸1 gを精密にはかり水に溶かして100 mlとする。

ガスクロマトグラフィー用充てん剤: Chromosorb 101, 60~80メッシュ(島津)

内部標準物質溶液: trans-クロトン酸をメタノールで再結晶, 更に水で再結晶を繰返した後, 五酸化リン上で減圧乾燥する。その2 gを精密にはかり, 水に溶かして100 mlとする。

ガスクロマトグラフィー用カラム: ガラスカラム(直径3 mm×長さ2 m)にカラム充てん剤をつめ, 200°Cでエージングを行なう。

水蒸気蒸留装置: 杉山元フッ素蒸留装置

ガスクロマトグラフィー: 島津ガスクロマトグラフィー, 7APF型, 水素炎イオン化検出器を使用。

GC Condition

Sample Inj. Volume 3 μ l, Column Temp 170 °C, Injection Temp 250 °C

Carrier Gas N₂ 60 ml/min, H₂ 50 ml/min, O₂ (air) 500 ml/min

Chart Speed 10 mm/min

2. 分析方法

Sample 500 ml
↓
Whatman GF/C filt
1 N-NaOH, PH 8.5
Evaporation to 30 ml
↓
P.P.A (30%) treatment
↓
PH 2
↓
Steam Distillation
500 ml in 1 N NaOH 20 ml

Evaporation to
↓
Dryness
↓
Dry Solids
↓
Dissolution
↓
with P.P.A (1+1)
5 ml
↓
+trans-Crotonic acid
↓
Injection to GC (FID)

Ⅲ 実験結果と考察

1. 各脂肪酸と内部標準物質のガスクロマトグラフ

低級脂肪酸の、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、ノルマル酪酸と内部標準物質 trans-クロトン酸を実験条件に従ってガスクロマトグラフィーを行なった結果を、Tab. 1, Fig. 1に示す。

水中に微量存在する低級脂肪酸を水溶液のままガスクロマト分析する方法は、余り報告されていない。(7)(8)(9) 低級脂肪酸のガスクロに

よる分析について、Emeryらは、⁽⁷⁾FID

を用い Chromosorb Wを担体とし、Tw

een-80を液相として、低級脂肪酸 0.01

%水溶液の分析を行なっているが、カラム

が不安定で、この方法により定量は

不可能と考えられる。また大槻らは⁽⁸⁾、

20%ジエチレングリコールセバケート

ポリエステルsp-61により、0.01%水溶液

の分析を行なっているが、プロピオン酸と

イソ酪酸との分離が余り良くないと報告して

いる。その他、V. Mahadevan,⁽⁹⁾小瀬ら、⁽¹⁰⁾

またBakerらの法、⁽¹¹⁾等幾つか充てん剤の異なる

検討が報告されている。⁽¹²⁾⁽¹³⁾また、エステル

化による報告も多くある。^(14~18)

しかし、炭素数の少ない脂肪酸では、沸点が低いためエステル化の操作で、かえって損失を招く恐れがあり、分析の繁雑さや、時間の短縮からも、水溶液の分析が簡便である。そこで特に遊離脂肪酸には分離が良いとされている

Chromosorb 101を用い分析の検討を行なった。

Chromosorb 101は、Styrene-Divinyl Benzeneの共重合体で表面積は $50m^2/g$ 以下、ポア-サイズは、 $0.3 \sim 0.4 \mu$ である。Fig. 1に示すように、Chromosorb 101による脂肪酸の分離は良好で、シャープなピークが得られた。しかし、竹下ら⁽¹³⁾によれば、trans-クロトン酸と吉草酸のピークが重なり、この内部標準物質は、定量試験に於て妨害になると報告されている。Tab. 1に各脂肪酸の保持時間を示す。蟻酸は1%溶液、その他は0.005%溶液である。蟻酸から内部標準物質まで約10分の分析時間である。

2. 低級脂肪酸の水蒸気蒸留による分離

水溶液から微量低級脂肪酸を分析するのにまず必要なことは、効率良く濃縮し分離することである。濃縮には、常圧濃縮、減圧濃縮、凍結乾燥濃縮等があるが、低級脂肪酸は揮発性であるため、不揮発性塩として比較的短時間に収率良く濃縮出来る減圧濃縮法をとった。即ちサンプルを過液500 mlをNaOHアルカリ性とし、約30ml位に濃縮する。これをリン酸酸性に戻し、水蒸気蒸留による分離を行なう。

Tab.1 Relative Retention Time of Lower Fatty Acids

Lower Fatty Acids	Retention Time (min)	Relative Retention Time
Formic acid	1.00	0.13
Acetic acid	1.55	0.21
Propionic acid	2.90	0.39
iso-Butyric acid	4.40	0.51
n-Butyric acid	5.30	0.71
trans-Crotonic acid	7.40	1.00

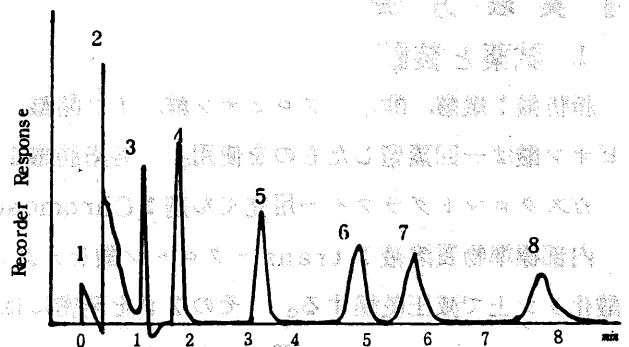


Fig.1 Gas Chromatographic Separation of Short Chain Fatty Acids in Aqueous Solution

- | | |
|--------------------|------------------------|
| 1: Air | 5: Propionic acid |
| 2: Solvent (Water) | 6: iso-Butyric acid |
| 3: Formic acid | 7: n-Butyric acid |
| 4: Acetic acid | 8: trans-Crotonic acid |

揮発酸を水蒸気蒸留する場合は、分子量が大きく、水に対する溶解度が小さい酸ほど速やかに留出する。即ち、初留分には殆ど全部の酪酸、プロピオン酸と一部の蟻酸、酢酸が留出し、あとの留分は蟻酸、酢酸ばかりである。

そこで、0.005%酢酸100mlにリン酸10mlを加えて水蒸気蒸留を行ない、留液100mlずつを分取し、各々指示薬フェノールフタレイン、0.01N-NaOHで滴定し、酢酸の留出曲線を見ると、Fig.2の結果になった。この結果から、留出液量は500mlを必要とすることが分り、3回の平均回収率は98%であった。

水蒸気蒸留による留出液は再び減圧濃縮し、乾固して少量のリン酸で溶解、内部標準物質を加え、必要ならミクロガラスフィルターで吸引分別する。5ml定容としてGC試験溶液とする。

3. 定量と測定例について

Fig.3に実験条件に従って作成した検量線を示す。酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、ノルマル酪酸、trans-クロトン酸の6μgまで良い直線性を示している。またTab.2に、河川水に脂肪酸を添加したときの回収結果を記す。汚濁河川水の分析では、この程度の精度で一応満足すべきであると考えられる。測定例としては、汚濁河川水（底喰川の三郎丸橋）を採取し、既述の方法で得られた測定結果をTab.3に、クロマトグラムをFig.4に示す。

河川BODと脂肪酸との関係は認められず、脂肪酸のBODに占める割合も小さい。酢酸で1.6~7.0%、プロピオン酸で0.4~3.0%、酢酸、プロピオン酸の含量で、2.2~10%であった。⁽⁹⁾また酪酸については、定量限界以下であった。（ND:イソ酪酸0.3ppm以下、ノルマル酪酸0.5ppm以下）

なお、9月13日分採水の底喰川末端では、BOD30ppm、酢酸0.38ppm、プロピオン酸ND（0.25ppm以下）であった。

脂肪酸の代謝については、将来の興味ある問

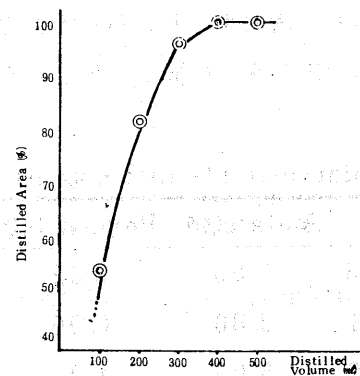


Fig.2 Steam Distillation Curve of Acetic acid

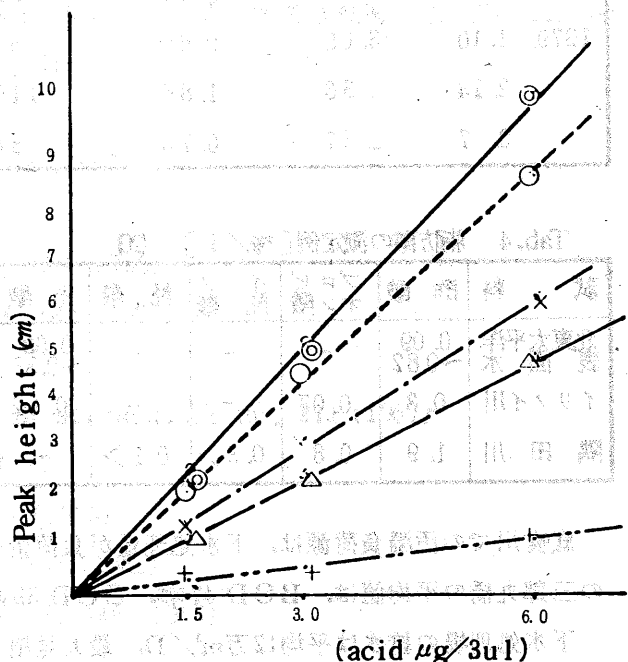


Fig.3 Calibration Curve of Lower Fatty Acids
 ●:Acetic acid △:n-Butyric acid
 ○:Propionic acid +:Crotonic acid
 ×:iso-Butyric acid

Tab.2 Recovery of Low Fatty Acids Added to River Waters

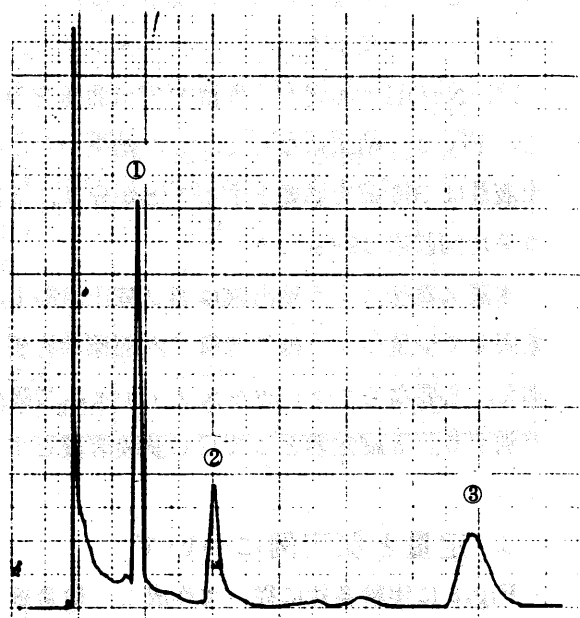
Volatile Fatty Acids	n	$\bar{x}$ (%)	S.D.
Acetic acid	5	90.9	6.5
Propionic acid	5	92.7	4.0
isoButyric acid	5	89.8	3.8
Butyric acid	5	92.6	2.0

題であるが、今後陸水中の脂肪酸をより多く測定し、この点を究明出来ればと考えている。

Tab.4に、その他の測定例を示す。底喰川は、し尿処理水の影響もあり、隅田川に比較して若干高目の値が出ている。小瀬ら⁽¹⁰⁾によれば、し尿処理排水中では、 C_2 酸が大部分で、その他の酸は曝気過程で除去され、汚水中のBOD原因物質に占める揮発性脂肪酸の割合は極めて高いものの、下水道終末処理場への流入水では低かったとある。

Tab.3 Volatile Acids in Socobami River Water

Date	Acetate(ppm)	Propionate(ppm)	BOD(ppm)
1978. 9.13	1.80	0.52	100
10.11	2.80	0.90	24
10.19	5.00	1.00	63
11. 1	2.40	0.50	34
11.29	2.85	0.95	32
1979. 1.10	3.05	0.60	57
2.14	5.36	1.86	110
3. 7	2.27	0.75	84



Tab.4 脂肪酸の測定例〔mg/l〕 (20)

試料	酢酸	プロピオン酸	イソ酪酸	酪酸	ギ酸	乳酸
北東太平洋表面水	0.09 ~0.82	-	-	-	0.03 ~0.38	0.03 ~0.08
イリノイ川	0.3	0.07	-	-	0.12	0.19
隅田川	1.9	0.8	0.3>	0.1>	-	-

Fig.4 底喰河川水のクロマトグラム

成分番号 ① Acetic acid
② Propionic acid
③ trans-Crotonic acid

底喰川での汚濁負荷源は、下水処理場が負荷量の90%以上を占め、昭和48年度から昭和51年度までの三郎丸橋の平均値は、BOD 47 ppm、COD 39 ppmで、平水流量は約30万 m^3 /Dと見積もられている。²⁾

下水処理場の排水は平均12万 m^3 /D、最大見積もって15万 m^3 /Dと考えられ、下水処理場上流の玉川橋からの流量が15万 m^3 /D近くあるものと推定される。玉川橋でのCODは2~6 ppmで、BODとの比がほぼ1:1と考えられ、下水処理場より上流からの脂肪酸負荷は殆どないものと推察されることから、下水処理排水からの低級脂肪酸濃度は、三郎丸橋の約2倍量あると推定される。

IV 結 語

水中に微量存在する低級脂肪酸のガスクロマトグラフィー(FID)による定量を検討し、充てん剤にクロモソルブ101を使用することで、 C_2 ~ C_4 の低級脂肪酸、0.005%水溶液の分析を試みた所、分離も良く、0.02%の範囲まで検量線の直線性が得られた。

これを応用して、汚濁河川水を水蒸気蒸留後、濃縮して定性定量した結果、 C_2 酸と C_3 酸が検出されたが、BODに対する割合は小さかった。今後、低級脂肪酸の陸水域における測定を重ね、挙動を究明してゆきたいと考える。

参 考 文 献

- 1) J.K.G Silvey et al: Studies on Microbiotic Cycles in Surface Waters, Jour.A.W.W.A
56, 60 (1964)
- 2) J.K.G Silvey : The Role of Aquatic Actinomyces in Self-Purification of Fresh Water
Streams, 1st International Conference on Water Pollution Research
Seet 1, Paper No 15, (1962)
- 3) H.F. Muller et al: Chromatographic Identification and Determination of Organic Acid
in Water, Anal Chem, 30, 41 (1958)
- 4) J.J. Murtaugh et al: Acidic Components of Sewage Effluents and River Water, J.W.P.C.F
37, 410 (1965)
- 5) 井上善介他: "生物酸化に關与する酢酸分解菌の培養方法とその特性" 水処理技術, 7, (6) 5
(1966)
- 6) 井上善介他: "河川水中の酢酸分解菌と自浄作用における役割" 水処理技術, 7, (7) 21, (1966)
- 7) E.M. Emery et al : Anal. Chem, 33, 146 (1961)
- 8) 大槻晃他: 日本化学雑誌, 84, 10 (1963)
- 9) V. Mahadevan et al : Anal. Chem, 39, 1652 (1967)
- 10) 小瀬洋喜他: 衛生化学, 19, (5) 239 (1973)
- 11) R.A Baker et al : J. Gas Chromatog, 4, 418 (1966)
- 12) J.J van Huyssteen : Water Research, 4, 645 (1970)
- 13) 竹下隆三他: 食衛誌, 11, 143 (1970)
- 14) M.H. Grosjean et al : Rev.Ferment. Ind. aliment. 22, (6), 211 (1967)
- 15) P.O. Bethge et al : Analyst, 99, 137 (1974)
- 16) C.W. Gehrke et al : Anal. Chem, 35, 76 (1963)
- 17) L.D. Metcalfe et al : Anal. Chem, 33, 363 (1961)
- 18) W.H. Tallent et al : J. Lipid Research, 9, 146 (1968)
- 19) 小瀬洋喜他: 衛生化学, 19, (5) 264 (1973)
- 20) 菅原健 他: "地球化学入門" P194, (1964) (丸善)
- 21) 田川専照他: 本報, 6, 233 (1976)