

# 蛍光光度法による環境水中のクマリンの分析

城間一哲

## Analysis of Coumarin in Environmental Water by Fluorometric Method

Ittetsu SHIROMA

**要旨**：公共用水域における油流出事故が起きた際、油汚染の有無や汚染範囲および油種の特特定等を行う必要がある。流出した油の油種の判別にはGCあるいはGC-MSを用いた方法はあるが、蛍光光度法により判別した事例は少ない。そのため、油流出事故を想定してA重油を海水および河川水に混合し日光に暴露させた条件下で蛍光光度法によりクマリンを分析した。その結果、クマリンは分散、乳化、溶解、蒸発、光酸化等の風化作用により油層中から減少するものの、蛍光光度法により測定可能であった。また、A重油は日光への暴露により蛍光スペクトルが変化し、蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) と積算照度 ( $Mlx \cdot h$ ) の間には、開放系では有意な正の相関  $r = 0.91$  ( $p < 0.01$ )、閉鎖系では有意な負の相関  $r = -0.81$  ( $p < 0.01$ ) が認められた。したがって、流出油 (A重油) の蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) から漏洩後の時間的経過を推測することも可能であると示唆された。併せて、今年度の油流出事例についても蛍光光度法により分析した。その結果、試料から想定試験と類似な蛍光スペクトルが得られたことから油種をA重油と判別した。また、試料の蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) より漏洩から約12時間経過後と推測した。以上より、蛍光光度法による環境水中のクマリンの分析は油種の判別に有用であった。

**Key words**：クマリン、蛍光光度法、A重油、油流出、蛍光強度比

### I はじめに

本県には大小様々な貯油施設がある。貯油施設における流出・漏洩事故は、度々発生しており、当研究所では過去21年間(2000-2020年)で42件の油流出事例に関する分析をした。

公共用水域における油流出事故が起きた際、油汚染の有無や汚染範囲および油種の特特定等を行う必要がある。そのため、当研究所では2020年度に蛍光光度計を整備した。蛍光光度法は、灯油やA重油に添加されている識別剤のクマリンを分析することで灯油やA重油と軽油との判別ができる(図1)。この手法を油流出事故時の対応に取り入れることで、従来よりも油種の判別が容易にできるようになると考える。

流出油の油種の判別にGCあるいはGC-MSを用いた方法がよく用いられる。この手法では、A重油の99.5%が軽油と同じ成分であるため成分分析による判別がしにくい点があった<sup>1)</sup>。そのため、クマリンの有無によってA重油と軽油との判別が容易にできる蛍光光度法は有用であると考えられる。しかしながら、懸念点も挙げられる。クマリンは、オクタノール/水分分配係数 ( $\log P_{ow}$ ) が1.39と低いため海水に溶解しやすく、油膜が薄い試料の場合には蛍光光度計ではほとんど検出されないとの報告がある<sup>2)</sup>。

そのため、本研究では公共用水域にA重油が流出

したことを想定し、A重油を海水および河川水に混合し日光に暴露させた条件下で、蛍光光度法を用いてクマリンが測れるのか、またクマリンがどのような挙動を示すのかを分析したのでその結果を報告する。併せて今年度、油流出事故が起きたため、蛍光光度法により環境水中のクマリンを分析したのでその結果も報告する。

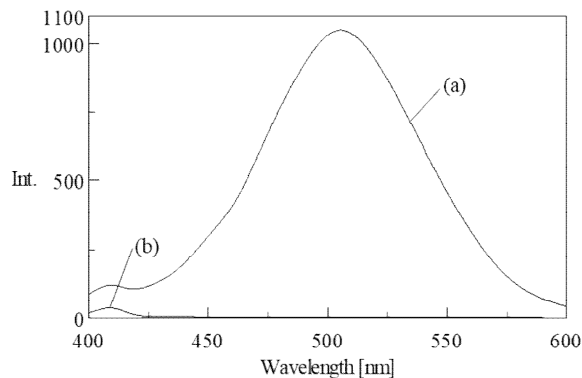


図1. (a)A重油および(b)軽油の蛍光スペクトル。

### II 実験

#### 1. 装置

日本分光製FP-8500分光蛍光光度計を用いて定量測定、スペクトル測定した。励起、蛍光バンド幅は、いずれも10 nmに設定して測定した。照度 ( $Mlx$ ) は、HOBOペンダントロガー (Onset社)を用いて1時間毎に測定した。積算照度 ( $Mlx \cdot h$ ) は、1日あた

り 14 時間 (6-19 時) として、1 時間毎の測定結果を積算した。積算照度 (Mlx·h) からの日数換算 (day) は、対象期間の積算照度 (Mlx·h) を 1 日あたりの積算照度 (Mlx·h/day) で除し算出した。1 日あたりの積算照度 (Mlx·h/day) は、全測定期間中の積算照度 (Mlx·h) を積算時間 (h) で除した数に 14 (h) を乗じ算出した。振とうは、いずれもタイテック社製の強力振とう機 SR-2DW と産廃溶出振とう機 TS-4N を用いた。

## 2. 試薬および試料

A 重油は県内石油メーカーから入手した。測定に用いた試薬は、全国石油協会<sup>3)</sup>が定めた A 法に準じて用意した。クマリン標準品は関東化学製鹿 1 級を用いた。トルエン、ドデカン、水酸化ナトリウム、硝酸ナトリウム、1-ブタノールおよびエタノールは、いずれも富士フィルム和光純薬製特級を用いた。水は超純水 (Merck 社製 Milli-Q 水) を用いた。海水および河川水は公共用水域の実試料を用いた。1 mL の A 重油試料からクマリンを抽出するために、6 mL のドデカン、8 mL のアルコール溶液および 5 mL のアルカリ性水溶液の 3 種類の抽出溶媒を調製した。アルコール溶液は 1-ブタノールとエタノールを 4:3 の体積比で混合し調製した。流出事例の前処理に用いた無水硫酸ナトリウム、ヘキサンはいずれも富士フィルム和光純薬製残留農薬・PCB 試験用を用いた。

## 3. 実験方法

### (1) 前処理

#### 1) 分散・乳化による影響

海水に A 重油を 5, 10% の体積割合で振とう機を用いて混合した。振とう速度は、縦振りの 100, 200, 300 rpm (以下, 100 rpm (縦), 200 rpm (縦), 300 rpm (縦) と記す) および横振りの 200 rpm (以下, 200 rpm (横) と記す) で行った。振とう時間は、1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480 および 960 分で行った。

#### 2) 溶解による影響

海水に A 重油を 0.5, 1, 5, 10, 25 および 50% の体積割合で振とう機を用いて混合した。振とうは 200 rpm (横) を 5 分間行った。

次いで、A 重油を同様の体積割合で海水が入った試験管の壁面に沿うように加え、静置し 1, 2, 3 および 7 日後に測定した。

#### 3) 溶媒による影響

海水、河川水、超純水、希硫酸 (6, 9 mol/L) お

よび pH4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 の溶媒に A 重油を 10% の体積割合で振とう機を用いて混合した。振とうは 200 rpm (横) を 5 分間行った。

#### 4) 蒸発・光酸化による影響

A 重油および海水に A 重油を 5, 10% の体積割合で振とう機を用いて混合した試料を用意した。振とうは 200 rpm (横) を 5 分間行った。A 重油および混合試料を当研究所屋上にて、直射日光が当たるように配置した。その際、雨水の混入を防ぐため試料に透明なプラケースを被せた。また、各試料いずれも保存容器を開けた場合 (以下, 開放系) と閉めた場合 (以下, 閉鎖系) を用意した。

#### 5) 流出事例

事業所から河川への油流出事故があり、当日のヤード内汚染水、下流の汚染水 (当日と 4 日後) および対照試料として周辺の河川水を採取した。試料 500 mL をヘキサンの抽出、無水硫酸ナトリウムで脱水、エバポレーターで濃縮し 1 mL とした。

### (2) 測定

(1) で前処理した試料をねじ口試験管に入れ、ドデカン、アルコール溶液およびアルカリ性水溶液を加え、撹拌子を入れた。ねじ口試験管をキャップして振とう機で 200 rpm (横) の 5 分間混合した後、5 分間静置した。静置後、蛍光光度計の試料室にねじ口試験管をセットし、撹拌子を回転させながら 5 分間紫外線 (波長 360 nm) を照射し異性化した。光異性化後、励起波長を 360 nm で設定し、500 nm 付近の蛍光極大強度を測定した。

## III 結果および考察

### 1. 分散・乳化による影響

海水に A 重油を 5, 10% の体積割合で種々の速度と時間で混合した試料の油層中クマリン残存率を図 2 に示す。

10% 試料の場合、200 rpm (横) では 1 分、300 rpm (縦) では 30 分、200 rpm (縦) では 240 分の振とうで残存率 64% の恒量に達した。100 rpm (縦) では 960 分の振とうで残存率 68% であった。5% 試料の場合、200 rpm (横) では 5 分、300 rpm (縦) では 20 分、200 rpm (縦) では 480 分、100 rpm (縦) では 960 分の振とうで残存率 43% の恒量に達した。よって、クマリンは海水と混ざり合うほど海水に溶解し、油層中から減少することが確認された。また、クマリンは 100 rpm のような比較的緩やかな速度であっ

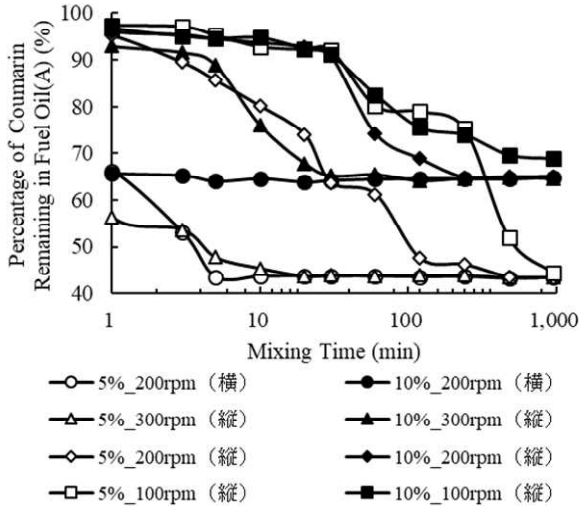


図 2. 海水に A 重油を 5, 10%の体積割合で種々の速度と時間で混合した時の油層中クマリン残存率.

でも、960 分でほぼ恒量に達することから、油流出事故後 1 日経過する頃には分散・乳化による影響の恒量に達している可能性が高いと考えられる。

2. 溶解による影響

海水に A 重油を 0.5-50%の種々の体積割合で混合した試料の油層中クマリン残存率を図 3, 同様の割合で静置した試料の油層中クマリン残存率の経時変化を図 4 に示す。

海水に A 重油を 0.5-50%の種々の体積割合で 200 rpm (横) の 5 分間混合した場合、残存率は 50%試料では 98%, 25%試料では 85%, 10%試料では 64%, 5%試料では 43%, 1%試料では 13%, 0.5%試料では 7%となった。よって、海水に占める A 重油の割合が小さくなるほど、残存率も減少することが確認された。

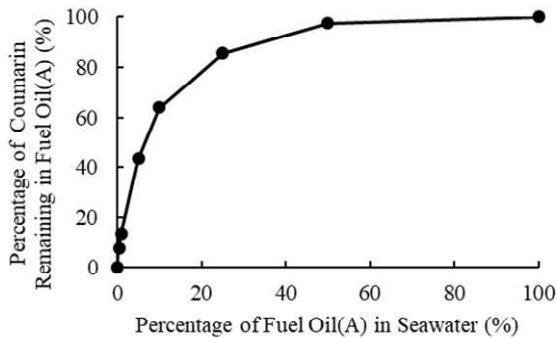


図 3. 海水に A 重油を 0.5-50%の種々の体積割合で混合した試料の油層中クマリン残存率.

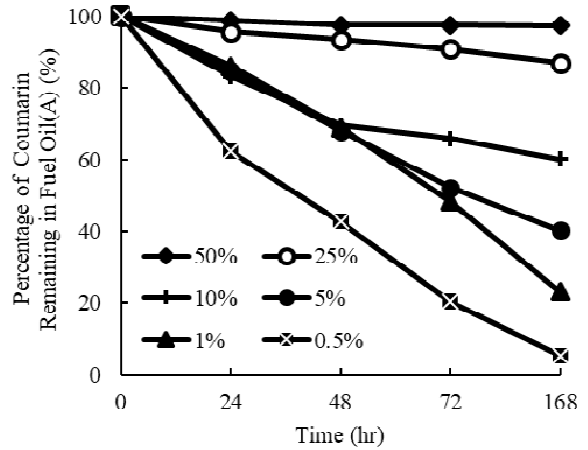


図 4. 海水に A 重油を 0.5-50%の種々の体積割合で静置した試料の油層中クマリン残存率の経時変化.

次いで、海水に A 重油を 0.5-50%の種々の体積割合で静置した場合、残存率は時間経過に伴い減少した。振とうした場合と比較して緩やかに減少し、1 週間後には 1%試料を除いて振とう時と同程度まで減少した。よって、クマリンは溶解による影響を受けやすいことが確認された。流出油は、河川や海水等に希釈され続けるため、環境水へのクマリンの溶解は避けられない。流出後なるべく早期に回収処理してクマリンの減少を抑えることが重要である。

3. 溶媒による影響

A 重油を種々の溶媒に 10%の体積割合で混合した試料の油層中クマリン残存率を図 5 に示す。

残存率は、pH4 の弱酸性から pH10 の弱アルカリ性条件下では、55-64%と同程度であった。一方、pH11 では 33%, pH12 では 2%と強アルカリ性条件下では大きく減少した。この結果より、海水や河川水等の弱アルカリ性条件下では液性による影響が少ないことが確認された。また、残存率が超純水<河川水<海水となったのは、比重による影響だと考えられる。溶媒の比重が大きいほど油と溶媒をより分離できるためである。したがって、残存率は、海水や河川水等の弱アルカリ性条件下では液性より比重に影響されると考えられる。硫酸処理は、不正軽油製造の際に A 重油に含まれるクマリンをスルホン化し油層から除去することができる<sup>4)</sup>。希硫酸を用いた場合の残存率は 6 mol/L では 36%, 9 mol/L では 9.3%と油層中からある程度除去されることが確認された。貯油施設等において、硫酸処理や強アルカリ処理によりクマリンが除去された場合では、クマ

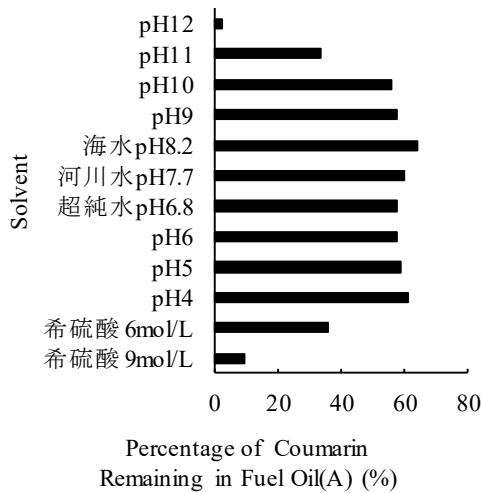


図 5. A 重油を種々の溶媒に 10%の体積割合で混合した試料の油層中クマリン残存率.

リンの有無による A 重油と軽油との判別は困難であると考えられる.

4. 蒸発・光酸化による影響

(1) 経時変化

A 重油および海水に A 重油を 5, 10%の体積割合で混合した試料について開放系と閉鎖系を各々用意した.各々を日光に暴露させた時の油層中クマリン残存率の経時変化を図 6 に示す.

A 重油試料 (開放系) の場合, 積算照度初期に残存率は増加し 2.3 Mlx・h (約 3 日経過後) には元の残存率である 100%を上回る 135%程度に達した. その後, 減少に転じ 23 Mlx・h (約 33 日経過後) には 16%となった. 次いで, A 重油試料 (閉鎖系) の場合, 残存率は増減を繰り返しながら徐々に減衰し 23 Mlx・h (約 33 日経過時) には 60%となった. 開放系の積算照度初期に残存率が増加したのは, 分子量の小さい n-アルカン類や揮発性芳香族化合物等の低沸点化合物 (沸点 350 °C以下) の蒸発による影響だと考えられる. これらの低沸点化合物 (沸点 350°C以下) は海上へ流出後 2-3 日で 30-50%蒸発するといわれている<sup>5)</sup>. また, 下尾<sup>6)</sup> による河川水に A 重油を添加し室外環境に 6 日間放置した実験では, C<sub>9</sub>-C<sub>14</sub> の炭化水素のピークはほとんど蒸発により消失したのに対し, C<sub>16</sub> (沸点 287 °C<sup>7)</sup>) では 1 割程度の減少, C<sub>17</sub> (沸点 301.8 °C<sup>7)</sup>) 以降の炭化水素のピークは増加していた. クマリンは沸点が 291 °C<sup>8)</sup> と C<sub>16</sub> (沸点 287 °C<sup>7)</sup>) と同程度であるため日光への暴露から 2-3 日経過時では, クマリン自体の蒸発によ

る影響は少ないと考えられる. よって, クマリンより沸点の低い低沸点化合物 (沸点 291 °C以下) の蒸発による影響のため, 重油に占めるクマリンの割合が多くなり残存率が増加したと考えられる.その後, 残存率が減少に転じたのは積算照度が増すにつれクマリン自体が蒸発・光酸化による影響を受けたためだと考えられる. 流出油の風化作用は蒸発の後に光酸化の影響が起こるとされている<sup>5)</sup>. 本実験による光酸化による影響は, 図 6 の A 重油試料の閉鎖系より積算照度 5.4 Mlx・h (約 8 日経過後) 以降だと推測される. また, クマリンは長波長紫外線照射 (波長: 310 nm 以上) によって二量化する<sup>9)</sup>. その影響により減衰している可能性もあると考えられる.

5%試料 (開放系) の場合, 積算照度初期に残存率は増加し 0.64 Mlx・h (約 12 時間経過後) には元の残存率である 43%を上回る 102%に達した. その後, 減少に転じ 23 Mlx・h (約 33 日経過後) には 4%となった. 次いで, 10%試料 (開放系) の場合も同様に, 積算照度初期に残存率は増加し 1.0 Mlx・h (約 1 日半経過後) には元の残存率である 64%を上回る 115%に達した. その後, 減少に転じ 20 Mlx・h (約 28 日経過後) には 5%となった. いずれも A 重油試料 (開放系) と同様に積算照度初期に残存率が増加しその後, 減少する挙動が確認された.

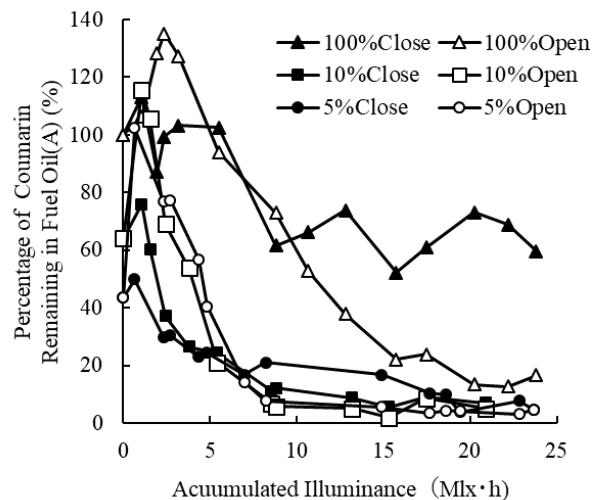


図 6. A 重油試料(100%)および海水に A 重油を 5, 10%の体積割合で混合した試料について開放系(Open)と閉鎖系(Close)を各々用意し, 日光に暴露させた場合の油層中クマリン残存率の経時変化.

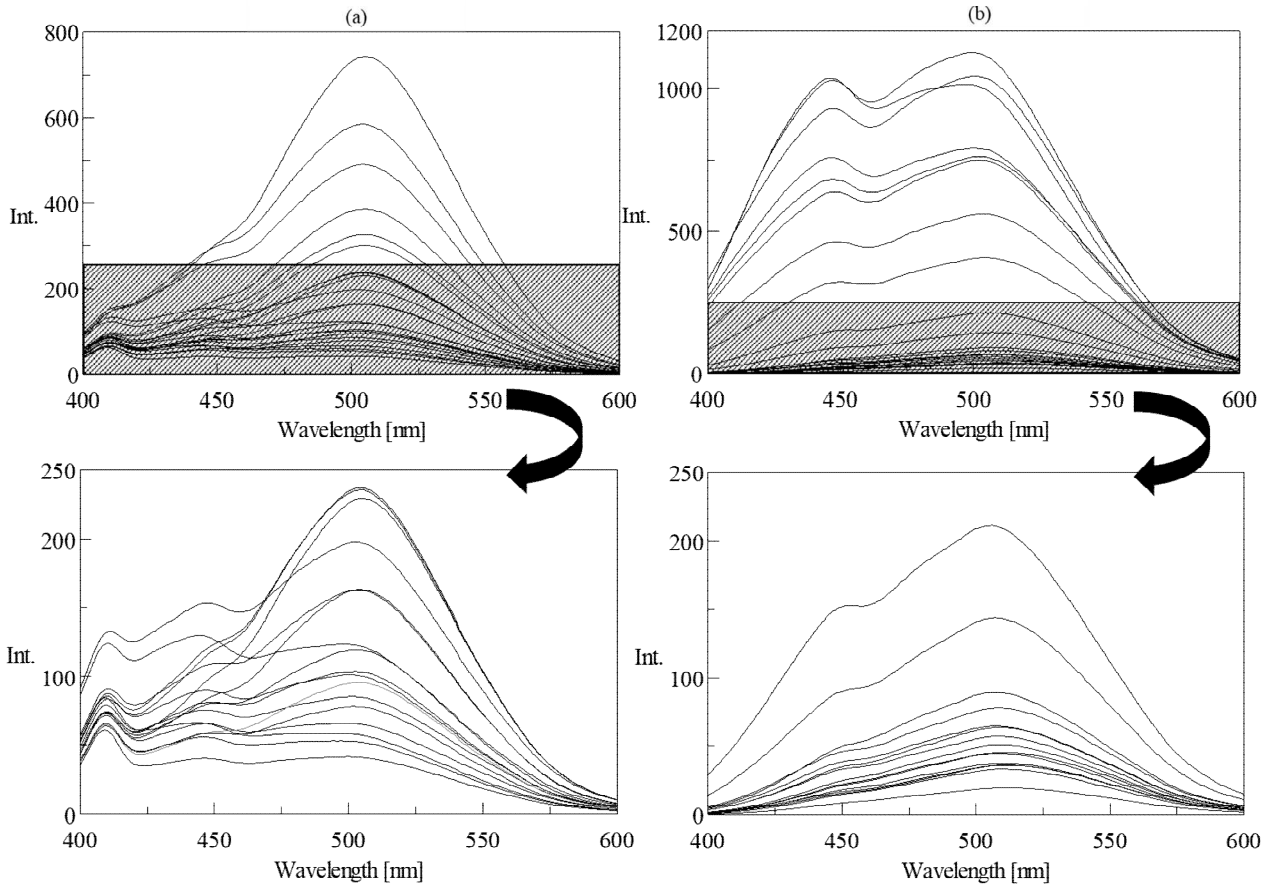


図7. A重油を海水に5, 10%の体積割合で混合した試料について (a)閉鎖系, (b)開放系を各々用意し, 日光に暴露させた場合の油層中クマリンの蛍光スペクトル. 上図は全体図. 下図は0-250 nmの拡大図. 蛍光スペクトルは積算照度 (Mlx・h) が大きくなるほど, 蛍光強度(Int.)が小さくなる傾向にある.

5%試料 (閉鎖系) の場合, 積算照度初期に残存率は増加し 0.64 Mlx・h (約 12 時間経過後) には元の残存率である 43%を上回る 49%に達した. その後, 減少に転じ 23 Mlx・h (約 33 日経過後) には 4%となった. 次いで, 10%試料 (閉鎖系) の場合も同様に, 積算照度初期に残存率は増加し 1.0 Mlx・h (約 1 日半経過後) には元の残存率である 64%を上回る 76%に達した. その後, 減少に転じ 20 Mlx・h (約 28 日経過後) には 6%となった. いずれも A 重油試料 (閉鎖系) と同様に積算照度初期に残存率が増加し, 増加幅は 5, 10%試料 (開放系) と比べ小さかった. また, いずれも A 重油試料 (閉鎖系) ほどの増減の繰り返しはなかった. 以上より, クマリンは溶解による影響だけでなく, 蒸発や光酸化によっても減少するためできるだけ速やかに流出油試料を回収することが重要であると考え.

(2) 蛍光スペクトルの変化

海水に A 重油を 5, 10%の体積割合で混合した試料について閉鎖系と開放系を用意し, 各々を日光に暴露させた場合の油層中クマリンの蛍光スペクトルを図

7に示す. 蛍光強度が大きい場合 (積算照度初期時), 閉鎖系では蛍光極大ピーク波長が 500 nm 付近に現れ, 図 1 の A 重油と類似した蛍光スペクトルが得られた. 一方で, 開放系では 450 nm 付近にも蛍光極大ピーク波長を持つ蛍光スペクトルが得られた. 次いで, 蛍光強度が小さくなるほど (積算照度が増すほど), 閉鎖系では 450 nm 付近の蛍光極大ピークが現れたのに対し, 開放系では 450 nm 付近の蛍光極大ピークが消えていった. このことから, 開放系と閉鎖系は互いに逆の挙動を示していることが確認された. 実際に近い環境を再現した今実験の A 重油の蛍光スペクトル (図 7(b)) は, 教科書的な蛍光スペクトル (図 1(a)) と異なり, 450 nm 付近にも蛍光極大ピーク波長を持つ. そのため, 油流出事故の際は油種の判別に注意する必要がある. また, 蛍光強度が小さくなるほど (積算照度が増すほど), 蛍光極大ピーク波長が開放系では長波長側へシフト (レッドシフト) し, 閉鎖系では短波長側へシフト (ブルーシフト) する傾向が確認された.

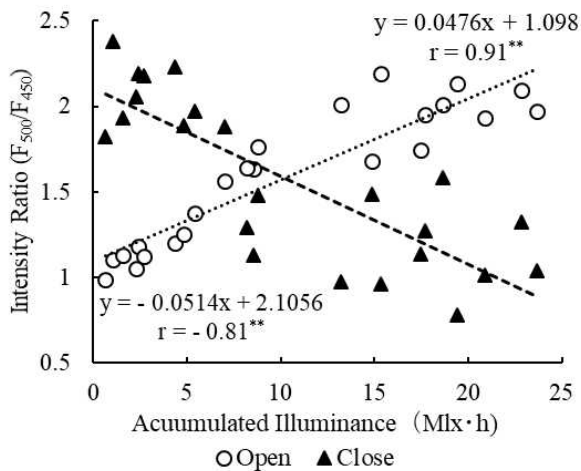


図 8. 海水に A 重油を 5, 10% の体積割合で混合した試料について開放系および閉鎖系を各々用意し, 日光に暴露させた場合の蛍光強度比 vs. 積算照度 (\*\*:  $p < 0.01$ ).

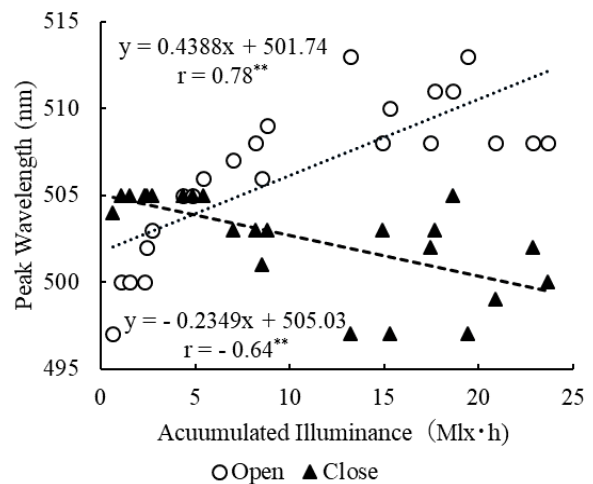


図 9. 海水に A 重油を 5, 10% の体積割合で混合した試料について開放系および閉鎖系を各々用意し, 日光に暴露させた場合の蛍光極大波長 vs. 積算照度 (\*\*:  $p < 0.01$ ).

(3) 蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) vs. 積算照度 ( $Mlx \cdot h$ )

図 7 より, 日光への暴露に伴い閉鎖系と開放系のスペクトルが変化し, また互いに逆の挙動を示していることが確認された. そのため, 蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) と積算照度 ( $Mlx \cdot h$ ) で相関をとった. その結果, 開放系では有意な正の相関  $r = 0.91$  ( $p < 0.01$ ,  $y = 0.0476x + 1.098$ ), 閉鎖系では有意な負の相関  $r = -0.81$  ( $p < 0.01$ ,  $y = -0.0514x + 2.1056$ ) が認められた (図 8). よって, 蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) から漏洩後の時間的経過を推測することも可能であると示唆された.

(4) 蛍光極大波長 (nm) vs. 積算照度 ( $Mlx \cdot h$ )

図 7 より, 500 nm 付近の蛍光極大ピーク波長は, 蛍光強度が小さくなるほど (積算照度が増すほど) 開放系では長波長側へシフト (レッドシフト) し, 閉鎖系では短波長側へシフト (ブルーシフト) する傾向が確認された. そのため, 蛍光極大ピーク波長 (nm) と積算照度 ( $Mlx \cdot h$ ) で相関をとった. その結果, 開放系では有意な正の相関  $r = 0.78$  ( $p < 0.01$ ,  $y = 0.4388x + 501.74$ ), 閉鎖系では有意な負の相関  $r = -0.64$  ( $p < 0.01$ ,  $y = -0.2349x + 505.03$ ) が認められた (図 9). よって, 500 nm の蛍光極大ピーク波長のずれから漏洩後の大まかな時間的経過を推測することも可能であると示唆された. ただし, 蛍光極大ピーク波長は様々な条件下で変化し固有ではないことに留意する必要がある.

5. 流出事例

流出油試料および対照試料を 500 倍濃縮した場合の蛍光スペクトルを図 10 に示す. ヤード内汚染水と下流汚染水 (当日および 4 日後) のいずれの試料から 500 nm 付近にクマリンの異性化による蛍光極大ピーク波長が確認された. この結果より, 流出油試料の油種を A 重油と判別した. ヤード内汚染水試料の蛍光スペクトルは, 図 7 (b) の蛍光スペクトルと同様に 450 nm 付近に蛍光極大ピーク波長を持ち, その蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) は 1.1 であった. 図 8 の開放系の 1 次式に当てはめると積算照度は 0.61  $Mlx \cdot h$ , 日数換算して漏洩から約 12 時間過後と推測した. 保健所職員が漏洩の通報を受け, 数時間後に

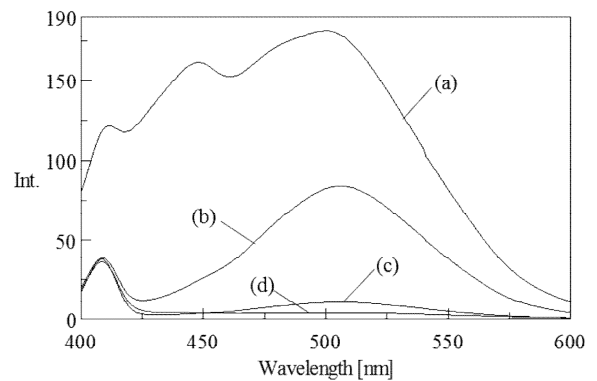


図 10. (a)ヤード内汚染水, (b)当日の下流汚染水, (c)4 日後の下流汚染水および (d)対照試料の蛍光スペクトル

試料を採取したことと概ね一致していたといえる。また、蛍光極大ピーク波長が 501 nm であったことから漏洩後の時間的経過が少ないと推測した。下流汚染水試料の蛍光スペクトルは、当日に比べて 4 日後は蛍光極大強度が小さくなり時間経過に伴いクマリンが減少する傾向が確認された。以上より、蛍光光度法によるクマリンの分析は、実際の油流出事故においても油種の判別に有用であることが確認された。

#### IV まとめ

油流出事故を想定して A 重油を海水および河川水に混合し日光に暴露させた条件下で蛍光光度法によりクマリンを分析した。その結果、クマリンは風化作用により油層中から減少するものの、蛍光光度法により測定可能であった。また、A 重油は日光への暴露に伴い蛍光スペクトルが変化し、蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) と積算照度 ( $Mlx \cdot h$ ) の間には、開放系では有意な正の相関  $r = 0.91$  ( $p < 0.01$ )、閉鎖系では有意な負の相関  $r = -0.81$  ( $p < 0.01$ ) が認められた。したがって、流出油 (A 重油) の蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) から漏洩後の時間的経過を推測することも可能であると示唆された。併せて、今年度の油流出事例についても蛍光光度法により分析した。その結果、試料から想定試験と類似な蛍光スペクトルが得られたことから油種を A 重油と判別した。また、試料の蛍光強度比 ( $F_{500}/F_{450}$ ) より漏洩から約 12 時間経過後と推測した。以上より、蛍光光度法による環境水中のクマリンの分析は油種の判別に有用であった。

#### <謝辞>

油流出事故調査にご協力頂きました中部保健所の島村修司主任に感謝の意を表します。

#### V 参考文献

- 1) 小川直・森尻宏・佐藤篤 (1998) 軽油識別剤の検出方法を利用した石油類の判別. 消防科学研究所報, 35 : 48-54.
- 2) 滝優人・大友直子・大谷久子・富谷新吾・宇野俊昭・永井正敏 (2011) 海域に排出された油の迅速な油種分析. Journal of the Japan Petroleum Institute, 54 (2) : 103-107.
- 3) 軽油識別剤分析方法標準委員会 (1994) 軽油識別剤標準分析法作業マニュアル. 全国石油協会, 東京, p.60-65
- 4) 倉田正治・相澤直之・平野治夫・高島千尋・永井正敏 (2004) A 重油を硫酸と混合処理した不正軽油の識別分析. Journal of the Japan Petroleum Institute, 47 (1) : 44-53.
- 5) 森英利・外山茂樹 (1994) 流出油による海洋の汚染機構. 日本海水学会誌, 48 (2) : 77-84.
- 6) 下尾和歌子・田中克正・下濃義弘 (2010) GC/MS データベースを用いた鉱物油の油種判別方法の検討. 山口県環境保健センター所報, 53 : 61-64.
- 7) 野依良治 (2004) ボルハルト・ショアー 現代有機化学上第 1 巻. 化学同人, 東京, pp.768
- 8) 吉村壽次 (2012) 化学辞典 (第 2 版) 小型版. 森北出版, 東京, pp.1744
- 9) 北川進 (2004) 新時代の多孔性材料とその応用— ナノサイエンスが作る新材料—. シーエムシー出版, 東京, pp.249