

嫌気性処理に伴う揮発性脂肪酸の定量分析法

Quantitative Analysis of Volatile Fatty Acids in Anaerobic Reactors.



(環)技術部 試験課
中 町 眞 美
Mami Nakamachi
久 新 正 三 郎
Shozaburo Kyushin

This analysis was designed for the quick determination (in about ten minutes) of volatile fatty acids (VFA) which is one of the controlling factors to the mechanism of anaerobic bio-contact (ABC) system due to its adverse effect to methanoginus. The quantitative analysis by a gas chromatography proved to be effective when samples were acidified with 88 % formic acid before analysis.

ま え が き

有機性廃水処理において、嫌気性処理法は経済性、運転の安定性の点から有効な処理方法である。しかし、嫌気性処理装置の運転に際しては、処理状態を迅速に把握し常に良好な反応状態を維持することが望ましく、その一方法として、酸発酵で生成しメタン発酵で消費される揮発性脂肪酸（以下VFAと略す）濃度の測定が挙げられる。VFAが、嫌気反応槽に蓄積するとメタン菌の活動を阻害することは宝月ら¹⁾により報告されており、その簡便で精度のよい定量方法が要求されている。

通常、VFAの測定には、蒸留法・液体クロマトグラフ法・ガスクロマトグラフ法が用いられている。蒸留法は前処理が複雑であり、VFAの各組成の同定ができない。一方、液体クロマトグラフ法は、精度は良好であるがVFA分析所要時間が30分以上かかり、かつ測定前に精密ろ過を行わなくてはならない。そこで本研究では、分析方法の簡便さ、測定時間の短さ（10分前後）の点から、また、測定濃度領域が広範囲であるといわれることから、ガスクロマトグラフ法について、その前処理法・測定濃度領域・精度などについて検討を行った。

1. VFAの測定

1.1 装置

- 使用機器 : 柳本製ガスクロマトグラフ計 (G3800型),
同上用オートサンプラー
島津製作所製インテグレーター (C-R4A型)
検出器 : 水素炎イオン化検出器
使用カラム : ガラスカラム, $\phi 3.4 \text{ mm} \times 2 \text{ m}$;
酢酸のピークが分離しないように、インジェクト側に石英毛细管チップを充填した。
充填剤 : KOCL-FM 10 %, SUPPORT; Green Sorb. T, MESH; 60/80

1.2 測定条件

- 温度 : インジェクト 200 °C,
カラム 160 °C
キャリアーガス : Heガス 35 ml/min
注入量 : 2 μl

1.3 分析項目

VFA : 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 酪酸,

吉草酸, カプロン酸

1.4 前処理

使用充填剤のVFA検出域が酸性側にあることと、試料の経時変化を防ぐために、試料を低pHに保つことが有効であることから、前処理としてpH調整を行った。pH調整に使用した酸は、酸自体がカラム内に蓄積せず、かつ、荒又ら²⁾により報告されているように、カラム内のVFA残存防止の効果が高いことから蟻酸を用いた。

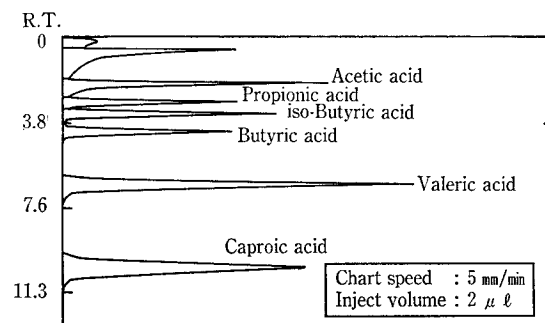
2. 結果および考察

2.1 VFA標準液の測定

標準液（酢酸, 500 mg/l; プロピオン酸, 200 mg/l; イソ酪酸, 200 mg/l; 酪酸, 200 mg/l; 吉草酸, 500 mg/l; カプロン酸, 500 mg/l）に、蟻酸を2.6 v/v%添加したクロマトグラムを第1図に示す。測定時間が、約12分で各組成のピークが得られた。しかし、蟻酸には酢酸を主体とした不純物が含まれており、その不純物が測定値に誤差を与えることが考えられる。そこで、蟻酸中不純物の影響および前処理法の検討を行い、VFAの検量線作成を行った。

2.2 蟻酸中の不純物の検討

蟻酸は、関東化学製JIS特級試薬を用いた。（含有酢



** Calculation report **

| PK No. | Time(min) | PK area | PK height | ID No. | Name |
|--------|-----------|---------|-----------|--------|------------------|
| 1 | 0.171 | 4944 | 234 | | |
| 2 | 0.57 | 21516 | 1083 | | |
| 3 | 2.057 | 21048 | 1645 | 1 | Acetic acid |
| 4 | 2.871 | 13073 | 1088 | 2 | Propionic acid |
| 5 | 3.382 | 16913 | 1322 | 3 | iso-Butyric acid |
| 6 | 4.153 | 15841 | 1048 | 4 | Butyric acid |
| 7 | 5.158 | 314 | 12 | | |
| 8 | 6.485 | 46119 | 2171 | 5 | Valeric acid |
| 9 | 10.223 | 47559 | 1499 | 6 | Caproic acid |
| Total | | 187326 | 10102 | | |

第1図 標準液のクロマトグラム

Fig. 1 Chromatogram of standard solution

第1表 蟻酸試薬に含有される酢酸

Table 1 Acetic acid included in Formic acid (2.6 v/v% solution)

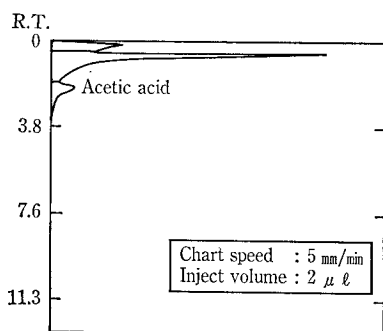
| Formic acid | A | B | C | D |
|------------------|------|------|------|------|
| \bar{x} [area] | 1978 | 2058 | 2066 | 2117 |
| s.d. | 114 | 47.1 | 41.0 | 84.5 |
| c.v.% | 5.8 | 2.3 | 2.0 | 4.0 |

Number of analysis: 5 times

\bar{x} : Average of peak area of Acetic acid

s.d.: Standard deviation

c.v.: Coefficient of variation



第2図 2.6 v/v% 蟻酸溶液のクロマトグラム

Fig. 2 Chromatogram of 2.6 v/v% Formic acid solution

** Calculation report **

| PK No. | Time(min) | PK area | PK height | ID No. | Name |
|--------|-----------|---------|-----------|--------|-------------|
| 1 | 0.171 | 9020 | 436 | 1 | Acetic acid |
| 2 | 0.557 | 30756 | 1665 | | |
| 3 | 2.062 | 4145 | 144 | | |
| Total | | 43921 | 2246 | | |

酸濃度は0.6%以下) 純水を用いて 2.6 v/v% 蟻酸溶液を調製し、測定したクロマトグラムを第2図に示す。第2図よりクロマトグラムには酢酸のピークだけが検出され、蟻酸に含まれる不純物でガスクロマトグラフに検出されるのは酢酸だけであることが判る。

次に、蟻酸試薬の個体間の酢酸含有量の差異を知るために、蟻酸試薬を無作為に4本(A~D)抽出した。純水で希釈して2.6 v/v%の蟻酸溶液を調製し、ガスクロマトグラフで測定したピーク面積値を第1表に示す。第1表よりA~Dの相互間で、平均値の差の検定を行い、いずれも危険率5%で有意差は認められなかった。

また、蟻酸濃度0~10 v/v%の範囲で調製した溶液について測定したピーク面積値を第2表に、蟻酸濃度と不純物として含まれる酢酸のピーク面積値および酢酸濃度概算値の関係を第3図に示す。第3図に示されるように蟻酸濃度が高くなるにつれピーク面積値が比例的に増加するため、

第2表 0~10 v/v% 蟻酸溶液に含有される酢酸

Table 2 Acetic acid included in 0~10 v/v% Formic acid solution

| Concentration of Formic acid | 0.9 v/v% | 2.6 v/v% | 4.4 v/v% | 8.8 v/v% |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| \bar{x} [area] | 615 | 2066 | 3389 | 6441 |
| c.v.% | 8.4 | 2.0 | 0.7 | 0.7 |

Number of analysis: 5 times

第3表 蟻酸添加濃度の検討

Table 3 Effect of Formic acid concentrations

| | Formic acid conc. | pH | | Acetic acid | Propionic acid | iso-Butyric acid | Butyric acid | Valeric acid |
|-------------------------|-------------------|-----|------------------|-------------|----------------|------------------|--------------|--------------|
| Standard Solution | 0.9 v/v% | 2.4 | \bar{x} [area] | 7118 | 6370 | 8974 | 8296 | — |
| | | | c.v.% | 12.5 | 1.5 | 2.8 | 3.7 | — |
| | 2.6 v/v% | 2.2 | \bar{x} [area] | 9264 | 7162 | 9338 | 8669 | — |
| | | | c.v.% | 0.5 | 0.2 | 1.0 | 1.6 | — |
| Anaerobic treated water | 4.4 v/v% | 2.0 | \bar{x} [area] | 9296 | 7355 | 9312 | 8837 | — |
| | | | c.v.% | 3.9 | 1.7 | 1.1 | 0.9 | — |
| | 0.9 v/v% | 2.9 | \bar{x} [area] | 8338 | 18264 | 3737 | 11221 | 2389 |
| | | | c.v.% | 4.9 | 5.8 | 9.7 | 2.8 | 9.5 |
| | 2.6 v/v% | 2.4 | \bar{x} [area] | 11866 | 21313 | 2868 | 12004 | 2690 |
| | | | c.v.% | 1.4 | 2.7 | 5.5 | 0.4 | 2.5 |
| | 4.4 v/v% | 2.3 | \bar{x} [area] | 11152 | 21770 | 2826 | 12005 | 2509 |
| | | | c.v.% | 1.9 | 1.0 | 1.2 | 1.2 | 6.3 |

Concentration of Standard solution: Acetic acid, 250 mg/l

Propionic acid, 100 mg/l

iso-Butyric acid, 100 mg/l

Butyric acid, 100 mg/l

Number of Analysis: 5 times

\bar{x} : Average of VFA peak area

Acetic acid area was compensated with acetic acid contained in the additive formic acid.

$\bar{x} = (\bar{x} - \bar{X})$ (\bar{X} : Average of peak area caused by Formic acid)

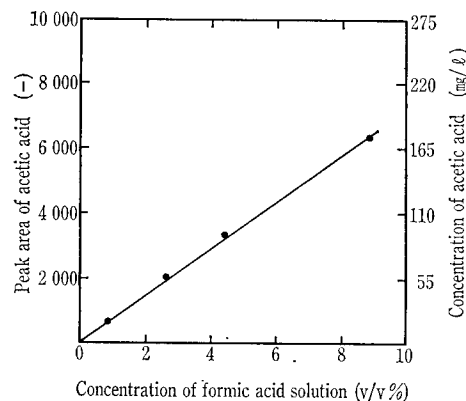
蟻酸中に含有される酢酸の定量が可能であり、本実験での酢酸濃度は約15~180 mg/lとなった。

2.3 蟻酸添加量

VFAを有効に分離し同定するに当り、充填剤のpH調整を満足させ、かつ、試料の微生物による分解を抑制するために必要な蟻酸濃度の検討を行った。

第3表に示すように標準液と実際の工場廃水の嫌気性処理水に対して蟻酸をそれぞれ0~5 v/v%添加し、検出される各VFAのピーク面積値に及ぼす蟻酸の影響を検討した。

その結果、蟻酸濃度が高くなるにつれて、各VFAのピ



第3図 蟻酸濃度と不純物として含有される酢酸のピーク面積値・酢酸濃度(概算値)の関係

Fig. 3 Dependency of peak area and concentration of Acetic acid on concentration of Formic acid solution

第4表 蟻酸添加濃度の差異によるカラム中のVFA残存率(%)

Table 4 Residual rate (%) in column
—different concentrations of Formic acid—

| Concentration of Formic acid | Acetic acid 250 mg/ℓ | Propionic acid 100 mg/ℓ | iso-Butyric acid 100 mg/ℓ | Butyric acid 100 mg/ℓ |
|------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 0.9 v/v% | 19.4 | 14.9 | 6.7 | 7.4 |
| 2.6 v/v% | 6.7 | 8.9 | 4.4 | 4.0 |
| 4.4 v/v% | 1.2 | 6.9 | 2.6 | 2.5 |

Concentration of Formic acid solution for rinse column: 2.6 v/v%

ーク面積値は大きくなる傾向が認められる。そこで、標準液と嫌気性処理水の各々に対する蟻酸添加量 (v/v%) 0.9 と 2.6 および 2.6 と 4.4 の間におけるピーク面積値の平均値の差の検定を行った。標準液の酢酸とプロピオン酸および、実廃水の酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸と酪酸が、蟻酸添加量 0.9 と 2.6 v/v% 間において危険率 5% で有意差が認められた。また、蟻酸添加濃度が 0.9 v/v% では c.v. 値が大きくデータのばらつきも大きい結果となった。

以上より、充填剤の pH 調整を満足させ安定したピーク面積値を検出するためには、蟻酸を 2.6 v/v% 以上添加する必要があることがわかった。

また、Graef ら³⁾ は有機物が微生物により VFA まで分解される pH は 4.0 以上と報告しているが、第3表に示したように、本実験の pH はいずれも 3 以下であり、試料を採取してから測定するまでの間に、微生物による分解は起こらないものと推定できる。

2.4 カラム内のVFAの残存性

荒又らは、Unisole F-200 の充填剤を用いて、試料に蟻酸を 1.0% 添加することで、カラム内の VFA の残存を防ぐことができると報告している。しかし、本実験では、充填剤は KOCL-FM 10% を使用したので、残存防止に必要な蟻酸添加量の検討を行った。

蟻酸を 0~5 v/v% 添加した標準液を注入した後、残存している VFA を溶出させるために、2.6 v/v% 蟻酸溶液を注入した。標準液を注入して得られたピーク面積値(a)、蟻酸溶液を注入して得られたピーク面積値(b)において、(b/a)×100を VFA 残存率(%)とし、第4表に示す。

蟻酸添加量が高くなるにつれ、残存率は低下している。しかし、荒又らのように残存をほぼ完全に防ぐことはできず、蟻酸添加量を 4.4 v/v% としても、カラム内での VFA の残存が数パーセント認められた。しかし、JIS Z8402-1974 では分析精度を c.v. 値で 10% 程度以下と規定していることを考慮すると、蟻酸添加量は 2.6 v/v% 以上であればよいといえる。

そこで、蟻酸添加量 2.6 v/v% の標準液 (100~2500 mg/ℓ) の VFA の残存率を第5表に示す。その結果、いずれの VFA もカラム内の残存が認められ、残存濃度 (mg/ℓ) としては、標準液の濃度が高濃度になるほど高くなっている。

そこで、測定に際しては、この残存性を考慮し測定値に

第5表 標準液の濃度の差異によるカラム中のVFA残存率(%)

Table 5 Residual rate (%) in column
—different concentrations of standard solution—

| Concentration of standard solution | Acetic acid | Propionic acid | iso-Butyric acid | Butyric acid | Valeric acid | Caproic acid |
|------------------------------------|-------------|----------------|------------------|--------------|--------------|--------------|
| 100 mg/ℓ | — | 8.9(8.9) | 4.4(4.4) | 4.0(4.0) | — | — |
| 200 mg/ℓ | — | 7.6(15) | 3.9(7.8) | 4.0(8.0) | — | — |
| 250 mg/ℓ | 6.7(17) | — | — | — | 4.3(11) | 5.6(14) |
| 400 mg/ℓ | — | 7.4(30) | 3.9(16) | 4.1(16) | — | — |
| 500 mg/ℓ | 8.6(43) | — | — | — | 4.4(22) | 5.4(27) |
| 1000 mg/ℓ | 11.4(114) | 5.5(55) | 3.2(32) | 3.7(37) | 4.6(46) | 5.5(55) |
| 2500 mg/ℓ | 12.0(300) | — | — | — | — | — |

(): Residual concentration (mg/ℓ)

Concentration of Formic acid solution for rinse column: 2.6 v/v%

第6表 標準液調製濃度

Table 6 Concentration of standard solution

| | Acetic acid mg/ℓ | Propionic acid mg/ℓ | iso-Butyric acid mg/ℓ | Butyric acid mg/ℓ | Valeric acid mg/ℓ | Caproic acid mg/ℓ |
|-------|---------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| std-1 | 50 | 20 | 20 | 20 | 50 | 50 |
| std-2 | 100 | 40 | 40 | 40 | 100 | 100 |
| std-3 | 250 | 100 | 100 | 100 | 250 | 250 |
| std-4 | 500 | 200 | 200 | 200 | 500 | 500 |
| std-5 | 1000 | 400 | 400 | 400 | 1000 | 1000 |
| std-6 | 2500 | 1000 | 1000 | 1000 | — | — |

影響を及ぼさない方法をとらなければならず、測定方法としては次の二方法が考えられる。

(1) 試料測定後、残存 VFA を溶出させるために 2.6 v/v% 以上の蟻酸溶液を注入する。

(2) VFA が低濃度のものから試料を測定し、残存による影響を少なくする。

VFA 測定は、装置運転管理のための定期分析が主であり、濃度の概略推定ができることと、(1)の方法では一試料を測定するのに(2)の2倍の時間が必要となることから、(2)の方法で測定を行うことが望ましい。

2.5 検量線の作成

2.5.1 標準液の調製

第6表に示すように純水を用いて標準液を調製した。蟻酸添加方法は、試料採取時に操作を簡便にするために試料 100 ml に対して蟻酸試薬 (JIS 特級) 3 ml を添加することにし、標準液についても VFA 濃度調製後、同様の割合の蟻酸を添加した。

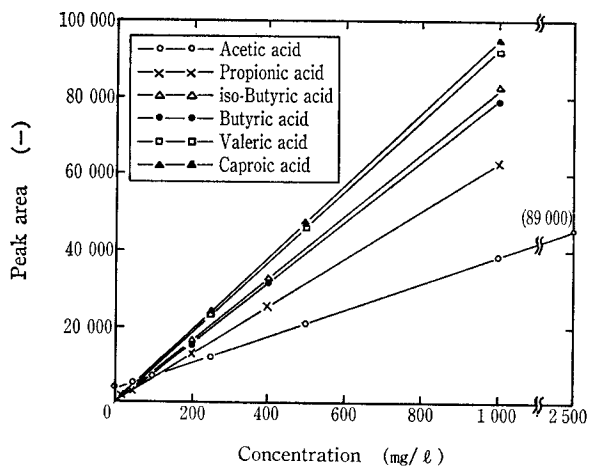
また、酢酸の検量線の補正を行うために、純水に同様の割合で蟻酸を添加し蟻酸溶液を作成した。

2.5.2 測定方法

VFA 残存の影響を防ぐため、低濃度の標準液から測定した。

2.5.3 結果

各 VFA の検量線を第4図に示す。ただし酢酸については、蟻酸中に不純物として含まれるので、蟻酸溶液を注入して得られたピーク面積値を酢酸: 0 mg/ℓ として検量線を作成した。酢酸については 0~2500 mg/ℓ の範囲で、他の VFA については 0~1000 mg/ℓ の範囲で良好な直線関



第4図 検量線
Fig. 4 Calibration curve

係を示した。ピーク面積値の再現性は第7表に示すように、分析精度はc.v.値で5%以下であり、良好な再現性を示した。

このようにVFAの低濃度域から測定すれば、カラム内のVFA残存性による影響を無視できる程度の測定が可能であるといえる。したがって、標準液および試料に蟻酸を同様の割合で添加することにより、蟻酸中に含有される不純物に関係なくVFAの定量ができる。

むすび

以上、ガスクロマトグラフ法によるVFAの測定は十分可能で有効な方法であるという結果が得られた。しかし、測定に際して、次の点に留意しなければならない。

- (1) 標準液は、100 mlに対して、88%蟻酸試薬(JIS特級)を3 ml添加する。
- (2) 蟻酸中に含有される不純物を考慮し、多点検量線を作成する。
- (3) 実試料にも、同様の蟻酸を同量添加する。
- (4) 緩衝作用が強く、上記添加量でpH 3以下にならない試料には、酸性になるまで蟻酸を添加しなければならないが、測定に際しては添加量に対する補正を行う。

第7表 標準液の分析精度

Table 7 Coefficient of variation of standard solutions

| Acetic acid | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|
| conc. | 2.6 v/v% Formic acid solution | 50 mg/l | 100 mg/l | 250 mg/l | 500 mg/l | 1 000 mg/l | 2 500 mg/l |
| c.v.% | 5.1 | 0.8 | 1.2 | 1.5 | 1.6 | 0.8 | 1.9 |
| Propionic acid | | | | | | | |
| conc. | 20 mg/l | 40 mg/l | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l | 1 000 mg/l | |
| c.v.% | 3.8 | 1.1 | 2.2 | 0.8 | 1.7 | 1.2 | |
| iso-Butyric acid | | | | | | | |
| conc. | 20 mg/l | 40 mg/l | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l | 1 000 mg/l | |
| c.v.% | 4.0 | 1.8 | 2.0 | 1.0 | 1.5 | 0.9 | |
| Butyric acid | | | | | | | |
| conc. | 20 mg/l | 40 mg/l | 100 mg/l | 200 mg/l | 400 mg/l | 1 000 mg/l | |
| c.v.% | 5.4 | 0.7 | 2.8 | 0.6 | 1.5 | 1.0 | |
| Valeric acid | | | | | | | |
| conc. | 50 mg/l | 100 mg/l | 250 mg/l | 500 mg/l | 1 000 mg/l | | |
| c.v.% | 3.3 | 1.0 | 1.2 | 0.5 | 1.6 | | |
| Caproic acid | | | | | | | |
| conc. | 50 mg/l | 100 mg/l | 250 mg/l | 500 mg/l | 1 000 mg/l | | |
| c.v.% | 3.3 | 1.3 | 1.8 | 0.5 | 1.6 | | |

Number of analysis: 5 times.

- (5) カラム内のVFA残存性のため、低濃度試料から測定する。

〔参考文献〕

- 1) 宝月章彦, 東野宏昭, 野中信一, 前田嘉道: 嫌気処理における発酵温度と処理性能に関する研究, 水処理技術, vol. 30, No. 1, (1989), p. 37
- 2) 荒又健夫他: 第20回水道研究発表会講演集, (1983), 日本下水道協会, p. 528
- 3) Geaf S. P. and Andrews J. F.: Mathematical modeling control of anaerobic digestion, AlchE Symp. Ser., 136, 70, (1974), p. 101
- 4) 東野宏昭: 神鋼フアウドラー技報, vol. 32, No. 1, (1988), p. 22
- 5) 武内次夫他: 入門ガスクロマトグラフィー, (1971), 南江堂