〈論 文〉

フミン質構成因子としての芳香族ヒドロキシ化合物類および芳香族カルボン酸化合物類のメチル化方法に関する検討

松 原 英 隆* 中 山 真 治*

Study for the Methylation Methods of Hydroxyaromatic Acids and Aromatic Polycarboxylic Acids as the Constituents of Humic Substances

Hidetaka MATSUBARA*

Shinji NAKAYAMA*

* Fukuoka City Institute of Public Health, 8-1, Yoshizuka 1-chome, Hakata-ku, Fukuoka, 812 Japan

Abstract

The methylation method with diazomethane is often used for the derivatization of the constituents of humic materials but it has some problems. We used three methylation methods, Diazomethane, Phase-Transfer-Catalyzed and Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate methylation to obtain reaction ratios for 22 kinds of aromatic model compounds. These compounds had hydroxy and carboxy substituents. The Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate methylation method was found to be best.

KMnO₄ degradation products of humic acid were also methylated by the three methods. As in the case of the model compounds, Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate methylation was found Best. The decomposition compounds in most cases were benzene polycarboxylic acids.

Key words: Diazomethane methylation method, Phase-Transfer-Catalyzed methylation method, Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate methylation method, benzene polycarboxylic acids.

1. 緒 言

自然界で生成された有機物や家庭より排出された有機物は、化学的、生物学的酸分解を受け次第にフミン質とよばれる最終有機汚染物質へと変化するとされている。しかも水道水の塩素処理においては、フミン質はその発がん性が問題視されているトリハロメタン等、有機ハロゲン化合物の前駆体となるものと考えられている。このようにフミン質は非常に重要な有機物であり、その化学構造を正確に理解することは必要なことである。

フミン質はその構成因子として脂肪族、芳香族炭化水素類およびこれらのヒドロキシル基、カルボキシル

基置換体を有しており、それらが網の目状に結合しているものと考えられている^{1),2)}。ところがその分子量は数百ダルトン以上でしかも極性の大きな化合物であると予想され、ガスクロマトグラフ等でフミン質分子そのものを直接分析することは不可能と考えられる。したがって、熱分解—ガスクロマトグラフ法^{3),4)}、あるいは酸分解後誘導体化してガスクロマトグラフで分析する方法等^{5),6)}がとられてきた。

誘導体化で最も高い反応性を示すものはトリメチルシリル(以下TMSと略す)化とされている⁷⁾。とくにN, O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA)は高い反応性を示すと言われている。しかしTMS体をガスクロマトグラフィーマススペクトロ

* 福岡市衛生試験所 〒812 福岡市博多区吉塚1丁目8番1号

メトリー（以下 GC/MS と略す）で分析しようとする
と、TMS 体の EI スペクトルは分子イオンピークが出
現しにくく、TMS に関連して低分子側に偏ったスペ
クトルパターンを示すため解析、同定が困難である。
また、化合物の多くの部位が TMS 化されると分子量
の大きな化合物となり、ガスクロマトグラフでの分析
時間が長くなり、化合物によっては溶離が困難になる
ことも考えられる。さらに TMS 化した試料の保存は
難しい。これに比較して、メチル化誘導体は安定性が
よく分子量も小さいため GC/MS での分離およびス
ペクトルの解析が容易である。

一般に最もよく利用されるメチル化方法はジアゾメ
タンによる方法である。例えばフミン質の酸化分解生
成物の同定方法としてもジアゾメタンでメチル化後
GC/MS で分析する方法が採用されている⁵⁾。しかし、
ジアゾメタンによるメチル化方法では水酸基とカルボ
キシル基が隣接した芳香族化合物がメチル化されにく
いといった問題点も指摘されている⁸⁾。著者らは一連
の芳香族モデル化合物について、ジアゾメタンによる
メチル化方法 (Mlejnek らの方法⁹⁾) の他に、Phase
-Transfer-Catalyzed メチル化方法 (Ramaswamy ら
の方法¹⁰⁾) および Dimethyl Sulfate-Potassium Car
bonate メチル化方法 (田中らの方法¹¹⁾) を取り上げ、
それぞれの方法によるメチル化物の生成率を求め比較
検討を行った。また、フミン酸の過マンガン酸カリウ
ム (以下 KMnO_4 と略す) 分解生成物についても上述の
それぞれの方法でメチル化し、それぞれの試料のガス
クロマトグラフより得られたピークについて各メチル化
方法間の比較検討を行うと同時にピークの同定も試み
た。

2. 実験方法

2.1 試薬

40% tetra-*n*-butylammonium hydroxide, 1-meth
yl-3-nitro-1-nitrosoguanidine は Aldrich Chemical
社から購入した。ジメチル硫酸は和光純薬工業株式
会社一級試薬を用いた。無水炭酸カリウムは和光純薬
工業株式会社特級試薬を用いた。フミン酸は和光純薬
工業株式会社から購入した。無水硫酸ナトリウムおよ
び各種有機溶媒は和光純薬残留農薬分析用試薬を用
いた。Table 1 に番号と共に示すモデル化合物は和光純
薬工業株式会社より購入した。モデル化合物のメチル
化物のうち No. 1 は和光純薬工業株式会社より、No.
2 ~ 7, 10, 12 ~ 16, 19, 20, 22 は東京化成工業株式
会社より、No. 8, 9, 11 は Aldrich Chemical 社より No. 17,
18, 21 は Janssen Chimica 社より購入した。その他の
試薬は和光純薬工業株式会社の特級試薬を用いた。精

Table 1 Methylation reaction percentages of model compounds

No. Compound	Methylation Diazomethane	PTC	of DS-PC
1	51	68	76
2	18	85	70
3	34	68	73
4	19	60	70
5	70	62	81
6	98	83	97
7	6	61	78
8	36	68	75
9	10	53	73
10	45	26	91
11	0	0	31
12	29	0	68
13	96	77	70
14	100	99	85
15	89	91	80
16	100	69	87
17	100	45	91
18	100	30	87
19	34	89	85
20	93	94	75
21	65	63	68
22	74	60	67

* PTC : Phase-Transfer-Catalyzed Methylation.
DS-PC: Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate Methylation.
Average of three replicate determinations.

製水は脱イオン蒸留水を用いた。

ジアゾメタンは McKay の方法¹²⁾に準拠して生成させた。すなわち、10g の 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine に水酸化カリウム水溶液を作用させ、生成したジアゾメタンをジエチルエーテルに溶かし込み 100ml のエーテル溶液とした。

2.2 モデル化合物のメチル化方法

2.2.1 ジアゾメタンによるメチル化方法 (ジアゾメタン法)

ガスクロマトグラフでのピークが重ならないようにグループ分け (グループ 1 : No. 1, 2, 5, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 22 ; グループ 2 : No. 3, 6, 8, 12, 16, 19 ; グループ 3 : No. 4, 7, 11, 21) した、各々 0.1mmol のモ

デル化合物の混合試料をメタノールに溶かして20mlとした後、その1 mlを10ml容量のメスフラスコに分取し前述の方法で調製したジアゾメタン溶液2 ml、ジエチルエーテル7 mlを添加後20°Cで2時間反応させた。ジエチルエーテルで正確に10mlにメスアップし試料溶液とした。

2.2.2 Phase-Transfer-Catalyzed メチル化方法 (PTC法)

2.2.1と同様の方法でグループ分けした各々0.1 mmolのモデル化合物の混合試料を計り取り、これにジクロルメタン20ml、ジメチル硫酸1.5ml、20%tetra-n-butylammonium hydroxide (TBAH) 20mlを加え20°Cでスターラーで激しく攪拌しながら18時間反応させた。さらに1 M アンモニア水溶液20mlを加えて1時間攪拌し未反応のジメチル硫酸を分解した。メチル化生成物を100mlの酢酸エチルで抽出し、抽出液は25mlの精製水で3回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後ワットマン GF/C ガラス繊維濾紙で濾過後酢酸エチルで200mlにメスアップし試料溶液とした。

2.2.3 Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate メチル化方法 (DS-PC法)

2.2.1と同様の方法でグループ分けした各々0.1 mmolのモデル化合物を100mlの共栓付三角フラスコに秤量し、これにジメチル硫酸1.5ml、無水炭酸カリウム2 g、アセトン30mlを加え70°Cのシリコンバス中で還流しながら18時間反応させた。反応液はワットマン GF/C ガラス繊維濾紙で濾過後濃縮し、ジクロルメタン20ml、1 M アンモニア水溶液20mlを加えて1時間攪拌し未反応のジメチル硫酸を分解した。この溶液に酢酸エチル100mlを加えてメチル化物を抽出し、抽出液は25mlの精製水で3回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後ワットマン GF/C ガラス繊維濾紙で濾過し、濾液を酢酸エチルで200mlにメスアップし試料溶液とした。

2.3 メチル化反応率の決定

2.2の方法でメチル化した試料の2 μ lをFID検出器付ガスクロマトグラフに注入した。別にモデル化合物のメチル化物スタンダードをジクロルメタンに溶かして標準溶液を調製し、その2 μ lをガスクロマトグラフに注入した。得られた試料溶液と標準溶液のクロマトグラムピーク高さの比よりメチル化反応率を求めた。

FID-GC 分析条件を次に示す。

(FID-GC 条件)

機種：島津 GC-14A

カラム：HT-5 (ガスコロ工業)

0.53mm×25m 膜厚 0.15 μ m

カラム温度：初期温度 80°C(4分保持), 10°C $\cdot$ min⁻¹で300°Cまで昇温

検出器：水素炎イオン検出器

キャリアガス：ヘリウム 10ml $\cdot$ min⁻¹

注入方法：スプリットレス注入

2.4 フミン酸のKMnO₄による分解方法

フミン酸2 gに水100mlを加え1 N水酸化ナトリウムでpHを9~10とした。これにKMnO₄10gを添加しスターラーで攪拌しながら60°Cで18時間分解した(反応後過剰のKMnO₄は存在しない)。ガラス繊維濾紙で濾過後1 N硫酸でpHを5とし精製水で150 mlにメスアップした。この25mlずつを100ml容量の共栓付三角フラスコに分取し真空凍結乾燥処理を行いKMnO₄分解試料とした。

2.5 フミン酸のKMnO₄分解生成物のメチル化方法

2.5.1 ジアゾメタンによるメチル化方法(ジアゾメタン法)

2.4で得た真空凍結乾燥試料にメタノール10mlを加えスターラーで1時間攪拌した。これにジアゾメタン溶液5 ml、ジエチルエーテル85mlを添加後20°Cで2時間反応させた。無水硫酸ナトリウムで脱水した後ワットマン GF/C ガラス繊維濾紙で濾過しロータリーエバポレーターで乾固寸前まで濃縮した。ジクロルメタンで5 mlにメスアップしたものを試料溶液とした。

2.5.2 Phase-Transfer-Catalyzed メチル化方法 (PTC法)

2.4で得た真空凍結乾燥試料にジクロルメタン20ml、ジメチル硫酸1.5ml、20%TBAH20mlを加え20°Cでスターラーで激しく攪拌しながら18時間反応させた。さらに1 M アンモニア水溶液20mlを加えて1時間攪拌し未反応のジメチル硫酸を分解した。メチル化生成物を100mlの酢酸エチルで抽出し、抽出液は25mlの精製水で3回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後ワットマン GF/C ガラス繊維濾紙で濾過後ロータリーエバポレーターで乾固寸前まで濃縮し、ジクロルメタンで50mlにメスアップしたものを試料溶液とした。

2.5.3 Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate メチル化方法 (DS-PC法)

2.4で得た真空凍結乾燥試料にジメチル硫酸1.5 ml、無水炭酸カリウム2 g、アセトン30mlを加え70°Cのシリコンバス中で還流しながら18時間反応させた。反応溶液は濾過後濃縮しジクロルメタン20ml、1 M アンモニア水溶液20mlを加えて1時間攪拌し未反応のジメチル硫酸を分解した。この溶液に酢酸エチル

100mlを加えてメチル化物を抽出し、抽出液は25mlの精製水で3回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後ワットマンガラス繊維濾紙で濾過しロータリーエバポレーターで乾固寸前まで濃縮した。濃縮液をジクロロメタンで20mlにメスアップし試料溶液とした。

2.6 フミン酸の KMnO_4 分解生成物のメチル化物の分析方法

2.5.1, 2.5.2および2.5.3の試料について、2.3のFID-GC分析条件および次に示すGC/MS分析条件で測定した。

(GC/MS 条件)

機種：島津 GCMS-QP1000

カラム：HT-5 (ガスクロ工業)

0.53mm×25m 膜厚 0.15 μ m

カラム温度：初期温度 80°C (4分保持)

10°C·min⁻¹で350°Cまで昇温

イオン源温度：250°C

イオン化エネルギー：70eV

キャリアガス：ヘリウム 10ml·min⁻¹

注入方法：スプリットレス注入

3. 結果および考察

3.1 モデル化合物のメチル化

水中フミン質はその顕著な水溶性からも予想されるように、その骨格はヒドロキシル基あるいはカルボキシル基で置換された脂肪族炭化水素および芳香族炭化水素から構成されていると考えられている^{1),2)}。本研究では芳香族モデル化合物として、ベンゼンのヒドロキシル基、ジヒドロキシル基、トリヒドロキシル基置換体あるいはカルボキシル基、ジカルボキシル基、トリカルボキシル基置換体およびヒドロキシル基とカルボキシル基の混合置換体を含む22種の化合物をとりあげ、前述の3種類のメチル化方法でメチル化しその反応率を求めた。その結果をTable 1に示す。

ジアゾメタンによる芳香族カルボン酸類あるいはフェノール類のメチル化反応率については篠原ら⁹⁾の報告の中にいくつかの例が認められる。それによるとベンゼンにカルボキシル基のみが置換した化合物のメチル化反応率は高いが、ヒドロキシル基が置換すると反応率が極端に低下することが伺われる。著者らがジアゾメタン法について検討した結果では、ヒドロキシル基置換体 (No. 1~No. 12) のメチル化反応率は一般に低く、反応率50%以上のものはフェノール (No. 1) の51%、カテコール (No. 5) の70%、レゾルシノール (No. 6) の98%のみであった。これに比較してカルボキシル基置換体 (No. 13~No. 18) の反応率はいずれも非

常に高かった。ヒドロキシル基とカルボキシル基の混合置換体のうちではサリチル酸 (No. 19) の反応率のみが34%と低かったが、これはサリチル酸のヒドロキシル基とカルボキシル基の間で分子内水素結合が生じたためだと推察される。

Ramaswamy ら¹⁰⁾は、PTC法は多くのカルボキシル基あるいはヒドロキシル基置換ベンゼン類において高いメチル化反応収率が得られることを報告している。また、論文の中で2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸についてのみDS-PC法によるメチル化反応率も示されているが、その反応率はPTC法より優れている。著者らがこれらの方法について一連のモデル化合物を用いて行った実験結果では、PTC法は50%以上の反応率を示すものが17種ありジアゾメタン法 (50%以上の反応率を示すものは12種) より安定したメチル化方法であった。ただしNo. 10, 11, 12のようなトリヒドロキシル基置換体あるいはNo. 17, 18のようなトリカルボキシル基置換体の反応率が低いのが欠点であった。一方、DS-PC法はほとんどの反応率が65%以上で今回の3種のメチル化方法のなかでは最も安定した方法であった。また、ジアゾメタン法やPTC法ではほとんど反応しなかった1,2,4-ベンゼントリオール (No. 11) も31%の反応率が認められた。そのほか、Mlejnek ら⁹⁾やRamaswamy ら¹⁰⁾の報告からも予想されたように、ジアゾメタン法やPTC法では若干の副反応生成物が認められる化合物もあったがDS-PC法では副反応物は生成しなかった。この点からも最も優れたメチル化方法であった。

3.2 フミン酸の KMnO_4 分解生成物のメチル化

フミン酸の KMnO_4 分解においては水酸化ナトリウムでpHを10とした後分解したが、これは低pH域では KMnO_4 の酸化力が強すぎる可能性があること並びに水溶液中に塩素イオンが存在した場合に塩素化反応が生じる可能性があることを考慮したためである。

フミン酸の KMnO_4 分解生成物を前述の3通りの方法でメチル化した試料をFID-GCに注入しクロマトグラムを得た。その結果をFig. 1~Fig. 3に示す。メチル化前の試料は各メチル化方法とも同量使用した。メチル化後は、ジアゾメタン法の場合はジクロロメタンで5 mlにメスアップし、PTC法の場合は50ml、DS-PC法では20mlにメスアップした。Fig. 1~Fig. 3においてFID-GCへの注入量は同容量 (2 μ l) とし、FID-GCの検出感度は同感度としたため、ピークの高さおよび最終試料容量からそれぞれのピークに相当する化合物のメチル化反応率の優劣を判断することが可能である。ここで各メチル化方法間の比較を行うには各々のメチル化方法によって得られた試料のクロマト

Fig. 1 FID chromatogram of humic acid/ KMnO_4 degradation products methylated with Diazomethane method.

Fig. 3 FID chromatogram of humic acid/ KMnO_4 degradation products methylated with Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate method.

Fig. 2 FID chromatogram of humic acid/ KMnO_4 degradation products methylated with Phase-Transfer-Catalyzed method.

グラムピークの同定を行う必要があるため、GC/MSにより各々のピークの確認を行った。その結果各々のクロマトグラムに見られるピークの多くは、ベンゼン

ジカルボン酸ジメチルエステル類(BDMs)、ベンゼントリカルボン酸トリメチルエステル類(BTrMs)、ベンゼンテトラカルボン酸テトラメチルエステル類(BTeMs)、ベンゼンペンタカルボン酸ペンタメチルエステル(BPM)、ベンゼンヘキサカルボン酸ヘキサメチルエステル(BHM)であることが明らかとなった。

Fig. 1～Fig. 3の結果から見ると、ジアゾメタン法は、ピーク高さおよび最終試料容量(5 ml)から判断して3種のメチル化方法の中で最も反応収率が悪いことが明らかとなった。また、カルボキシル基置換基の数が増える程反応しにくくなることもわかった。ただし、モノ置換体は生成しなかった。

PTC法はベンゼンのジカルボキシル基置換体、トリカルボキシル基置換体、テトラカルボキシル基置換体については最も高い反応率を示した。しかしペンタカルボキシル基置換体の反応率は低くヘキサカルボキシル基置換体はほとんど反応しなかった。カルボキシル基の数が増える程メチル化反応が進みにくくなる傾向は3.1のモデル化合物のメチル化実験の場合と同様であった。

置換したカルボキシル基の数が少ない化合物について、PTC法の反応率が最も高い理由としては次の理由によるものだと考えられる。即ち、 KMnO_4 分解生成物はメチル化する前に真空凍結乾燥処理を行うが、この試料は無機塩を多く含む有機物がその中に取り込まれ

た形となるはずである。ここで、ジアゾメタン法あるいはDS-PC法は無水状態でメチル化するため無機塩中に取り込まれた有機酸類は反応しにくいものと思われる。ところがPTC法は水溶液状態でTBAHを添加して有機酸との間にイオンペアを生成させ、ジクロルメタン層に抽出しジメチル硫酸でメチル化するため反応の際に塩の妨害を受けにくいためだと思われる。

DS-PC法は、ベンゼンのジカルボキシル基置換体、トリカルボキシル基置換体およびテトラカルボキシル基置換体の反応率についてはPTC法より低かったが、ペンタカルボキシル基置換体およびヘキサカルボキシル基置換体についてはこの方法が最も高い反応率を示した。とくにヘキサカルボキシル基置換体はこの方法でのみ反応した。従ってフミン酸の KMnO_4 分解生成物の場合もこの方法が最も優れたメチル化法であることが明らかとなった。また、各カルボキシル基置換体とも同じ条件で反応したと仮定すると、 KMnO_4 分解によってモノ置換体を除く他の5種の置換体はほぼ同量生成したことが推測された。

Fig. 4にDS-PC法によって得られた試料のGC/MS-TICクロマトグラムを示す。これらのピークのうち番号を付したピークについては解析可能であった。そのマススペクトルおよび構造式の一部をFig. 5に示す。ピーク No. 1は1,2-ベンゼンジカルボン酸ジメチルエステルで親イオン (M^+) ピークが M/Z : 194に認められる。 M/Z : 163のメインピークは親分子からメトキシ基 (M/Z : 31) がとれたフラグメントイオンピークである。ピーク No. 2は前者の1,4異性体、ピー

ク No. 3は1,3異性体であった。これらの親イオンピーク、メインピークに関するパターンはピーク No. 1とほぼ同じであった。ピーク No. 4は1,3,5-ベンゼントリカルボン酸トリメチルエステルでありピーク No. 5はその1,2,4異性体であった。これらの親イオンピークは M/Z : 252、メインピークはジカルボキシル基置換体同様に M^+-31 (M/Z : 221) に認められた。ピーク No. 6, 7, 8はマスマスペクトルの結果からいずれもベンゼントリカルボン酸テトラメチルエステルと考えら

Fig. 4 Total ion chromatogram of humic acid/ KMnO_4 degradation products methylated with Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonate method.

Fig. 5 Examples of EI mass spectra of humic acid/ KMnO_4 degradation products.

れたが同定できたのはピーク No. 7の1,2,4,5異性体のみであった。他の異性体についてはスタンダードが入手できず同定できなかった。ピーク No. 9はベンゼンペンタカルボン酸ペンタメチルエステル、ピーク No. 10はベンゼンヘキサカルボン酸ヘキサメチルエステルであった。4個以上の置換基(-COOCH₃基)を有する化合物のマスキングマトグラムは、メインピークはM⁺-31であったが親イオンピークは認められなかった。

フミン酸のKMnO₄分解生成物のクロマトグラムでは、芳香族炭化水素骨格の存在を示すピークのみが大きなピークとして現れるが、これは芳香族化合物はベンゼンカルボン酸類まで分解されると安定になるためだと考えられる。一方、Liaoら⁵⁾の報告では認められた脂肪族炭化水素のメチルエステルが、本研究において認められなかった理由としては本研究の分解条件の方が強く、KMnO₄分解を受けやすい脂肪族炭化水素骨格のほとんどは、低分子カルボン酸あるいは炭酸ガスまで分解されたためか、あるいは試料として用いたフミン質の構造の違いによるものと考えられる。

4. 結 論

フミン質骨格を構成している芳香族モデル化合物としてベンゼンのヒドロキシル基、ジヒドロキシル基、トリヒドロキシル基置換体あるいはカルボキシル基、ジカルボキシル基、トリカルボキシル基置換体およびヒドロキシル基とカルボキシル基の混合置換体を含む22種の化合物を選び、3種のメチル化方法(ジアゾメタンによるメチル化方法、Phase-Transfer-Catalyzedメチル化方法およびDimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法)について検討した。その結果Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法が最も良好でしかもメチル化反応率も安定した方法であることが明かとなった。

フミン酸のKMnO₄分解生成物について前述の3種の方法でメチル化したところ、ガスクロマトグラフのピークとして出現したものの大部分はベンゼンのカルボキシル基置換体のメチルエステルであった。ジアゾメタンによるメチル化方法はいずれの置換体についても最も低い反応率を示した。ジカルボキシル基置換体、トリカルボキシル基置換体、テトラカルボキシル基置換体についてはPhase-Transfer-Catalyzedメチル化方法が最も高い反応率を示したが、ペンタカルボキシル

基置換体、ヘキサカルボキシル基置換体についてはDimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法の方が高い反応率を示した。とくにヘキサカルボキシル基置換体はこの方法でのみ反応した。従って全体としては後者の方が安定したメチル化方法であると判断された。

(原稿受理 1990年8月31日)

引 用 文 献

- 1) Hatcher, G. P., Schnitzer, M., Dennis, L.W. and Maciel, G. E. (1981) Aromaticity of humic substances in soils, *Soil Sci. Soc. AM. J.*, **45**, 1089-1094.
- 2) Malcolm, R.L. and McCarthy, P. (1986) Limitation in the use of commercial humic acids in water and soil research, *Environmental Science and Technology*, **20**, 904-911.
- 3) Saiz-Jimenez, C. and De Leuw, J.W. (1986) Chemical characterization of soil organic matter fractions by Analytical Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. of Analytical and Applied Pyrolysis*, **9**, 99-119.
- 4) Martin, F. and Gonzalez-Vila, F.J. (1983) Pyrolysis of soil humic acid and their hydrolyzed and methylated products, *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde*, **146**, 653-659.
- 5) Liao, W., Christman, F., Jonson, J.D., Milington, D.S. and Hass, J.R. (1982) Structural characterization of aquatic humic material, *Environmental Science and Technology*, **16**, 403-410.
- 6) Martin, F., Saiz-Jimenez, C. and Gonzalez-Vila, F.J. (1981) The persulfate oxidation of a soil humic acid, *Soil Science*, **132**, 200-203.
- 7) Blau, K. and King, G.S. (1977) Handbook of Derivatives for Chromatography, 153-200, Heyden.
- 8) 篠原亮太 (1984) 誘導体化を用いた水溶性有機物のGC/MS分析, 水質汚濁研究, **17**, 549-552.
- 9) Mlejnek, O. (1972) Methylation of dibasic acids with diazomethane in gas chromatography, *Journal of Chromatography*, **70**, 59-65.
- 10) Ramaswamy, S., Malalyandl, M. and Buchanan, G.W. (1985) Phase-Transfer-Catalyzed Methylation of hydroxyaromatic acids, hydroxyaromatic aldehydes, and aromatic polycarboxylic acids, *Environmental Science and Technology*, **19**, 507-512.
- 11) Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka I. (1986) Tannins and related compounds. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavins A and B, tergalagin and tercatatin from the leaves of terminalia catappa L., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1039-1049.
- 12) McKay, A.F. (1948) New method of preparation of diazomethane, *Journal of American Chemical Society*, **70**, 1974-1975.

フミン質構成因子としての芳香族ヒドロキシ化合物類および芳香族カルボン酸化合物類のメチル化方法に関する検討

松原 英隆* 中山 真治*

* 福岡市衛生試験所

〈水質汚濁研究 Vol. 13 No. 12 (1990) pp.827~833〉

フミン質構成化合物の同定方法として、フミン質を分解後ジアゾメタンでメチル化しガスクロマトグラフで分析する方法がしばしば報告されている。しかし、ジアゾメタンによるメチル化方法については問題点が指摘されている。著者らはモデル化合物として、ヒドロキシル基あるいはカルボキシル基で置換された22種のベンゼン類を選び、これらを3種のメチル化方法（ジアゾメタンによるメチル化方法、Phase-Transfer-Catalyzedメチル化方法、Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法）でメチル化し反応率を求めた。その結果、Dimethyl Sulfate-Potassium Carbonateメチル化方法が最も安定したメチル化方法であった。フミン酸の過マンガン酸カリウム分解生成物についても3種の方法でメチル化したが、結果はモデル化合物の場合と同様であった。また、反応生成物の大部分はベンゼンのカルボキシル基置換体（モノ置換体を除く）のメチルエステルであった。

パックブンペルオキシダーゼによるフェノール系化合物の処理

古川 憲治* 多田 桂子* 藤田 正憲*

* 大阪大学工学部環境工学科

〈水質汚濁研究 Vol. 13 No. 12 (1990) pp.834~842〉

「水耕栽培型水処理法」で連続収穫できるパックブンの有効利用法として、パックブンに含まれるペルオキシダーゼ(PO)を活用したフェノール系化合物の除去につき検討した。パックブンには、葉、茎、根部でそれぞれ26.9, 28.1, 44.6 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ・湿重の活性でPOが含有され、簡単な水道水による抽出で約6 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ の活性のPO粗酵素抽出液を調製できた。このPO粗酵素抽出液は -80°C で長期保存可能であった。このPO粗酵素抽出液で100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ のフェノール溶液を処理する際の最適値は、初発pH5.0、添加 H_2O_2 濃度2.5mM、添加PO活性0.3 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、反応時間5時間であった。フェノール以外にPO粗酵素抽出液によって1-ナフトール、8-ヒドロキシキノリンを95%以上の効率で沈殿除去できた。さらに、PO粗酵素抽出液により、フェノール濃度を1,000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 程度に希釈すればフェノール含有工場排水中のフェノールを85%程度の効率で除去できることを明らかにした。