

ISSN 1884 - 1503

財団法人ひょうご環境創造協会  
**兵庫県環境研究センター紀要**  
**第3号**

BULLETIN  
OF  
THE HYOGO PREFECTURAL INSTITUTE  
OF  
ENVIRONMENTAL SCIENCES

No.3 2011

兵庫県環境研究センター紀要第3号  
2012.3



財団法人ひょうご環境創造協会  
兵庫県環境研究センター紀要

第3号 目次

ノート

Development and Application of Simultaneous Analytical Method for Perfluorinated Compounds in Waste Samples by LC/MS/MS (LC/MS/MSを用いた廃棄物中における有機フッ素化合物(PFCs)の 一斉分析法の開発及び適用)	Mihoko YOSHIDA, Shusuke TAKEMINE and Chisato MATSUMURA.....	1
加古川流域陸域起源有機物との比較における播磨灘海域の難分解性有機物に 関する特性評価	仲川直子, 吉田光方子, 金澤良昭, 前川真徳 .....	9
兵庫県姫路市における大気中粒子状物質及びガス状物質の並行測定(1) - 成分濃度の季節変動 -	常友大資, 中坪良平, 平木隆年, 島 正之, 余田佳子, 齊藤勝美 .....	16
兵庫県姫路市における大気中粒子状物質及びガス状物質の並行測定(2) - PM <sub>2.5</sub> の発生源解析 -	中坪良平, 常友大資, 平木隆年, 島 正之, 余田佳子, 齊藤勝美 .....	21
最終処分場における有機フッ素化合物の同族体毎の挙動	山本勝也, 竹峰秀祐, 松村千里, 英保次郎 .....	26
資 料		
平成22年度の兵庫県における微小粒子状物質(PM <sub>2.5</sub> )に係る 常時監視測定結果の考察	常友大資, 中坪良平, 平木隆年 .....	32



BULLETIN OF THE HYOGO PREFECTURAL INSTITUTE OF  
ENVIRONMENTAL SCIENCES

No.3 CONTENTS

**Notes**

- Development and Application of Simultaneous Analytical Method  
for Perfluorinated Compounds in Waste Samples by LC/MS/MS  
Mihoko YOSHIDA, Shusuke TAKEMINE and Chisato MATSUMURA..... 1
- Characteristics of Refractory Organic Matters in Surface Water at the Sea of Harima  
in Comparison with Organic Matters from the Kako River Watershed  
Naoko NAKAGAWA, Mihoko YOSHIDA, Yoshiaki KANAZAWA  
and Masanori MAEKAWA ..... 9
- Parallel measurement of atmospheric particulate and gases in Himeji, Hyogo (1)  
– Season variation of components –  
Daisuke TSUNETOMO, Ryouhei NAKATSUBO, Takatoshi HIRAKI, Masayuki SHIMA,  
Yoshiko YODA and Katsumi SAITOH ..... 16
- Parallel measurement of atmospheric particulate and gases in Himeji, Hyogo (2)  
– Source characterization of PM<sub>2.5</sub> –  
Ryouhei NAKATSUBO, Daisuke TSUNETOMO, Takatoshi HIRAKI, Masayuki SHIMA,  
Yoshiko YODA and Katsumi SAITOH ..... 21
- Behavior of Perfluorinated Organic Compounds in Final Landfill Site  
Katsuya YAMAMOTO, Shusuke TAKEMINE<sup>1</sup>, Chisato MATSUMURA  
and Jiro EIHO ..... 26
- Report**
- A study on measurement result by air pollution monitoring stations  
for PM<sub>2.5</sub> concentration in Hyogo Prefecture in 2010  
Daisuke TSUNETOMO, Ryouhei NAKATSUBO and Takatoshi HIRAKI..... 32



[Note]

## Development and Application of Simultaneous Analytical Method for Perfluorinated Compounds in Waste Samples by LC/MS/MS

Mihoko YOSHIDA<sup>1</sup>, Shusuke TAKEMINE<sup>2</sup> and Chisato MATSUMURA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan, <sup>2</sup> Environmental Safety Division,

### LC/MS/MS を用いた廃棄物中における有機フッ素化合物 (PFCs) の

#### 一斉分析法の開発及び適用

吉田 光方子<sup>1</sup> 竹峰 秀祐<sup>2</sup> 松村 千里<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 兵庫県環境研究センター 水質環境科 (〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27), <sup>2</sup> 安全科学科

The investigation was carried out to establish the simultaneous and high sensitive analysis for the perfluorinated compounds (PFCs) in waste sample.

In pretreatment of the waste, the extraction efficiency of three techniques; accelerated solvent extractor (ASE), soxhlet extraction and ultrasonic extraction were compared and examined.

Operation blank test, recovery test spiked with mass labeled PFCs (MPFCs) and content examination in waste sample were experimented for 14 kinds PFCs.

As for the pretreatment method, the ultrasonic extraction method which had shown good results both in the operation blank and isotope spiked recovery tests were adopted. The PFCs in waste were extracted with methanol and separated as well as concentrated with nitrogen-gas and analyzed by LC/MS/MS determination. And the waste was used in solid form. PFCs were detected at retention time between 3.75~7.15 min by the technique which was established in this study. In addition, the chromatogram of waste sample shows that PFCs and isomer were detected at almost the same time without interference. Since the existence ratios of PFCs in various wastes are different, by establishing profile of each waste at different sources, this study will contribute to developing countermeasures that would prevent environmental contamination of PFCs at global level.

#### INTRODUCTION

The fluorochemical compounds such as perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) are stain and water repellent. It is these superior properties that are widely applied to various fields in the modern society for pursuing comfortable and convenient life styles.

On the other hand, negative properties of PFCs such

as hazardous, persistent and bioaccumulative properties have been concerned<sup>1)</sup>. Thus, in May 9<sup>th</sup>, 2009, the 4<sup>th</sup> Conference of the Parties (COP4) for the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants adopted perfluorooctane sulfonate and perfluorooctane sulfonyl fluoride (PFOS and PFOSF) in Annex B. In addition, these PFOS and PFOSF were designated as a class I specified chemical substances under the Law Concerning the Examination and

Regulation of Manufacture, etc., of Chemical Substances in Japan, and were subject to global regulation. Since the further production and use of these compounds will be strictly controlled, the widespread of the compounds into the environment would be reduced. However, PFCs products have still been widely stocked and used as well as disposed and discharged into our living environment. It is highly likely that the compounds will continue to present ubiquitously in whole society through the various environmental routes and media.

In recent years, many surveys and risk assessment have been carried out with regard to environmental contamination of PFCs in various media including atmosphere and water<sup>2) -9)</sup>. However, little information has been available with regard to the waste generated as a result of anthropogenic activities and transported to waste treatment facilities. PFCs are detected in high concentrations from leachate at some final disposal sites<sup>10) 11)</sup>. Thus, the investigation of PFCs in waste will be an important information source to develop countermeasures for PFCs pollution. In this study, sensitive method by using LC/MS/MS for the determination of PFCs in waste samples was developed and presented.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Target PFCs, Reagents and Reagent preparation

The target substances of the development of our analytical method are 14 compounds. The target PFCs and octanol-water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ ) are shown in Table 1. The target PFCs in this study were perfluorocarboxylic acids (PFCAs):10, perfluoro alkyl sulfonates (PFASs): 4 substances and mass-labeled PFCs (MPFCs) were mass-labeled PFCAs (MPFCAs):7, mass-labeled PFASs (MPFASs):2 for surrogate compounds. The former target PFCs used PFAC-MXB as standard substances, and the latter MPFCs used MPFAC-MXA as internal standard substances, these were all commercially available products. The both mixture solutions were manufactured by Wellington Laboratories Inc. The PFOA-<sup>13</sup>C<sub>8</sub> used as internal standard was the product of Cambridge Isotope Laboratories. All compounds were linear chains. Methanol was originally for residual agrochemical analysis use obtained from Wako Junyaku Kogyo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). No interference of the reagents with the measurement of substances was confirmed. The 100ug/L-standard solution for the calibration curve was prepared with 2000ug/L-PFAC-MXB in methanol.

Table 1 Target compounds (PFCs) and octanol-water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ )

	compound	abbreviation	carbon number	structural formula	molecular weight	$\log K_{ow}$
PFCAs	Perfluoropentanoic acid	PFPeA	5	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	264.0	n.a.
	Perfluorohexanoic acid	PFHxA	6	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	314.1	3.26
	Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	7	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH	364.1	3.82
	Perfluorooctanoic acid	PFOA	8	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	414.1	4.30
	Perfluorononanoic acid	PFNA	9	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	464.1	4.84
	Perfluorodecanoic acid	PFDA	10	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	514.1	5.30
	Perfluoroundecanoic acid	PFUnDA	11	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	564.1	5.76
	Perfluorododecanoic acid	PFDoDA	12	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	614.1	6.41
	Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	13	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	664.1	n.a.
	Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA	14	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	714.1	n.a.
PFASs	Perfluorobutane sulfonate	PFBS	4	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	300.1	n.a.
	Perfluorohexane sulfonate	PFHxS	6	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> H	400.1	n.a.
	Perfluorooctane sulfonate	PFOS	8	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> SO <sub>3</sub> H	500.1	5.25
	Perfluorodecane sulfonate	PFDS	10	CF <sub>3</sub> (CF <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> SO <sub>3</sub> H	600.1	n.a.

\*n.a.: not available

Table 2 Characterization of waste samples

Sample No.	1	2	3	4	5	6
water content ratio (%)	37.0	11.1	34.4	0.9	52.3	57.7
pH	6.8	8.0	7.6	7.9	7.4	6.8
appearance	dewatered sludge	sludge	automobile shredder residue	shredded solid residue	sludge	sludge
color	black	white	black	gray	brown	white

## 2. Waste samples

The details of the characteristics of the waste samples such as water content, pH, and appearance are shown in Table 2. The waste samples are dewatered sludge, automobile shredded residues (ASR), incombustible general solid wastes generated from effluent treatment facilities and incinerating process.

## 3. Equipment and instrumentation, LC/MS/MS analytical condition

The solid phase extract cartridge adopted Precep-C agri (short) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). The target measurement substances were passed through the cartridge and adsorbed to the cartridge using a Sep-Pak Concentrator System Controller Plus (Waters) by 10 mL/min. The extraction solution was concentrated in TurboVap LV (Zymark) with nitrogen. Analytical conditions of LC/MS/MS are shown in Table 3. As for the ultrasonic generator, ULTRASONIC AUTOMATIC WASHER (AS ONE Corporation) was used. A model 05PR-22 (Hitachi) was used as the centrifugal separator. DIONEX ASE-200 (DIONEX) was selected for the Accelerated Solvent Extractor (ASE). The pulverized wastes were prepared by vibrating sample mill (TI-100, HEIKO Co.), and sieved with 0.5mm-mesh after drying overnight at 50 degrees Celsius.

## 4. Development of PFCs analysis technique in waste and Examination of the preprocessing method

The following three extraction methods were compared and discussed for sample pretreatment: ASE, soxhlet extraction in Methanol for 12hours and ultrasonic extraction with Methanol. In each

procedure, the operation blank test without interference from the waste and recovery test using real waste samples spiked with 1ng MPFCs were carried out at the same time. In preparing samples, 1ng of MPFCs was spiked to the waste sample as surrogate.

The sample solutions extracted by ASE or soxhlet extraction were concentrated to about 1ml with nitrogen injection. The PFCs adsorbed on the cartridge were then eluted with 2mL methanol. The eluent was concentrated to about 1mL using the TurboVap LV. The pretreated solution extracted by ultrasonic extraction was measured up to 10ml and TurboVap LV. The pretreated solution extracted by ultrasonic extraction was measured up to 10ml and 1mL aliquot of the 10ml extract was taken for determination. Then 1ng of PFOA-<sup>13</sup>C<sub>8</sub> standard solution was spiked as internal standard to the obtained extract, as described above. And 5μL was injected into the LC/MS/MS for determination.

For the measurement of minimum detection limit (MDL), sample 6 which contains little or no PFCs was taken. The waste was spiked with standard mixture methanol solution and adjusted to the final concentration of 2ng/g. The recovery test was repeated for 7 times and the results were used for calculating MDL by using the following equation.

$$MDL = 2 \times s \times t(n-1,0.05)$$

s : standard deviation

t(n-1,0.05) : t value of n-1 degree of freedom, level of significance 5%

Table 3 Analytical condition for PFCs with LC/MS/MS

LC condition								
Instrument	ACQUITY UPLC		(waters)					
Column	UPLC BEH C18		2.1×50mm					
Retention gap Column	UPLC BEH C18		2.1×100mm					
Mobile Phase	A : 10mM Ammonium		Acetate aq B : Acetonitrile					
Gradient	0.0	8.0 min	B: 1 95%					
	8.0	8.1 min	B: 95 1%					
Flow rate	0.3 mL / min							
Column temp.	50							
Injection volume	5µL							
MSMS condition								
Instrument	ACQUITY TQD		(waters)					
Ionization Mode	ESI (-)		Source temp.	120				
Desolvation temp	300		Cappillary voltage	2kV				
Cone gas flow	20 L / hr		Desolvation gas flow	800 L / hr				
Collision gas flow	0.1 mL / min							
		Precursor io	Product ion			Cone	Collision	
Compound name			Qnt.	Idt. 1	Idt. 2	Voltage	Energy	
PFCAs	PFPeA	263.00	219.00			18	9	
	PFHxA	313.00	269.00	118.90		18	9	
	PFHpA	363.00	318.90	169.00		18	11	
	PFOA	413.00	368.90	169.00		18	11	
	PFNA	463.00	418.90	169.00		18	13	
	PFDA	513.00	468.90	219.00		21	13	
	PFUdDA	563.00	518.80	269.00		18	15	
	PFDoDA	613.00	568.90	168.90		24	15	
	PFTTrDA	663.00	618.80	169.00		24	17	
	PFTeDA	713.00	668.70	169.00		24	15	
MPFCAs	PFBA	- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	217.00	172.00			15	13
	PFHxA	- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	315.00	270.00			15	11
	PFOA	- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	417.00	371.90			27	11
	PFNA	- <sup>13</sup> C <sub>5</sub>	467.00	422.90			24	15
	PFDA	- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	515.00	469.80	219.00		21	14
	PFUdDA	- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	565.00	519.80	269.60		21	17
	PFDoDA	- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	615.00	569.90	269.50		24	14
PFASs	PFBS		299.00	79.90	98.90		51	37
	PFHxS		399.00	79.90	98.90	130.00	57	46
	PFOS		499.00	79.90	98.90	130.00	69	55
	PFDS		599.00	79.90	98.90	79.90	80	67
MPFASs	PFHxS	- <sup>18</sup> O <sub>2</sub>	403.00	83.90	103.00		55	47
	PFOS	- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	503.00	79.90	99.00		65	56

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Result of the pretreatment procedure

The results of operation blank by using the 3 methods are shown in Fig.1. High concentrations of PFHxA and PFHpA in PFCAs that exceeded 7ng/g-wet were detected by the ASE and soxhlet extraction. The result confirmed cross contamination in the operation process. The concentrations of the other PFCs and those of the PFCs extracted by ultrasonic extraction method were under 1ng/g-wet. The contamination level of PFCs was not as significant as to affect the analysis seriously. The result of the recovery test of the samples from 1 to 4 spiked with 1ng MPFCs is shown in Fig.2. The 3 color bar charts show the average recovery rate. The recovery rate of the MPFHxA and MPFDoA by the ASE, soxhlet extraction, as well as MPFHxS by the ASE were under 60%, while the rest of the recovery rates show no significant differences among the extraction methods. Despite the use of wastes in various forms and properties as target samples, the recovery rates of the samples from 1 to 4 were not significantly affected by the extraction methods used in the study. It is, therefore, concluded that extraction can be performed by either technique without a problem.

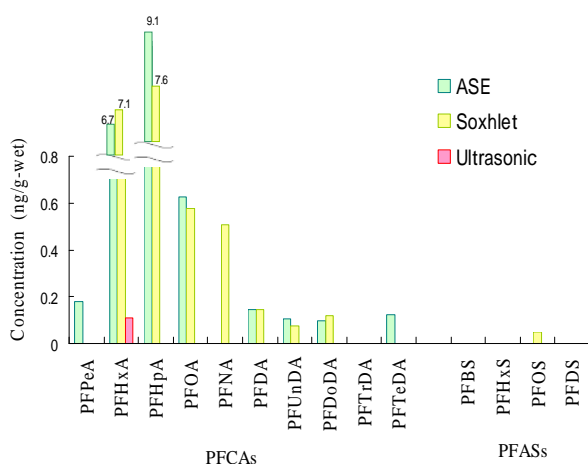


Fig.1 PFCs concentration of operational blank

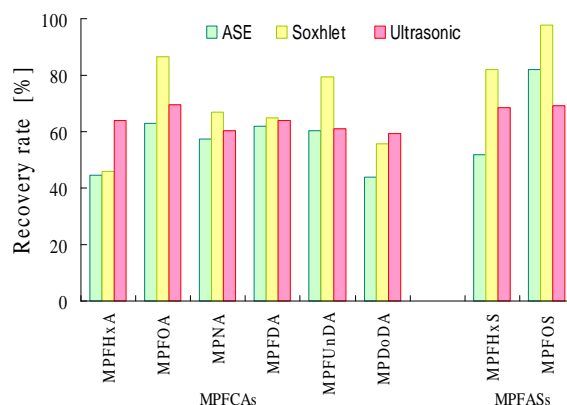


Fig.2 Recovery rate with MPFCs

### 2. Content examination in the waste sample

The results of content in waste sample1-4 with every method to compare extraction efficiency show in Fig.3.

The PFCs content were indicated to be deducted with the content obtained by the operation blank. In ultrasonic extraction method, each sample were analyzed repeatedly 3 times and showed the range of concentration (black bar line), the average (red bar charts). PFCs were detected from all waste samples.

As an example of PFCs analysis, the PFCAs chromatograms of the standard solution (20ng/L) and the sample1 are shown in Fig.4, and the PFASs chromatograms are shown in Fig.5, respectively. In the chromatogram of standard solution (left), PFCAs was detected between 3.75~7.15 min. The chromatograms of waste sample (right) show that PFCAs and isomer were detected almost at the same time without interferences. And the minimum detection limit values of PFCs obtained by ultrasonic extraction method were 1.4 - 3.9ng/g.



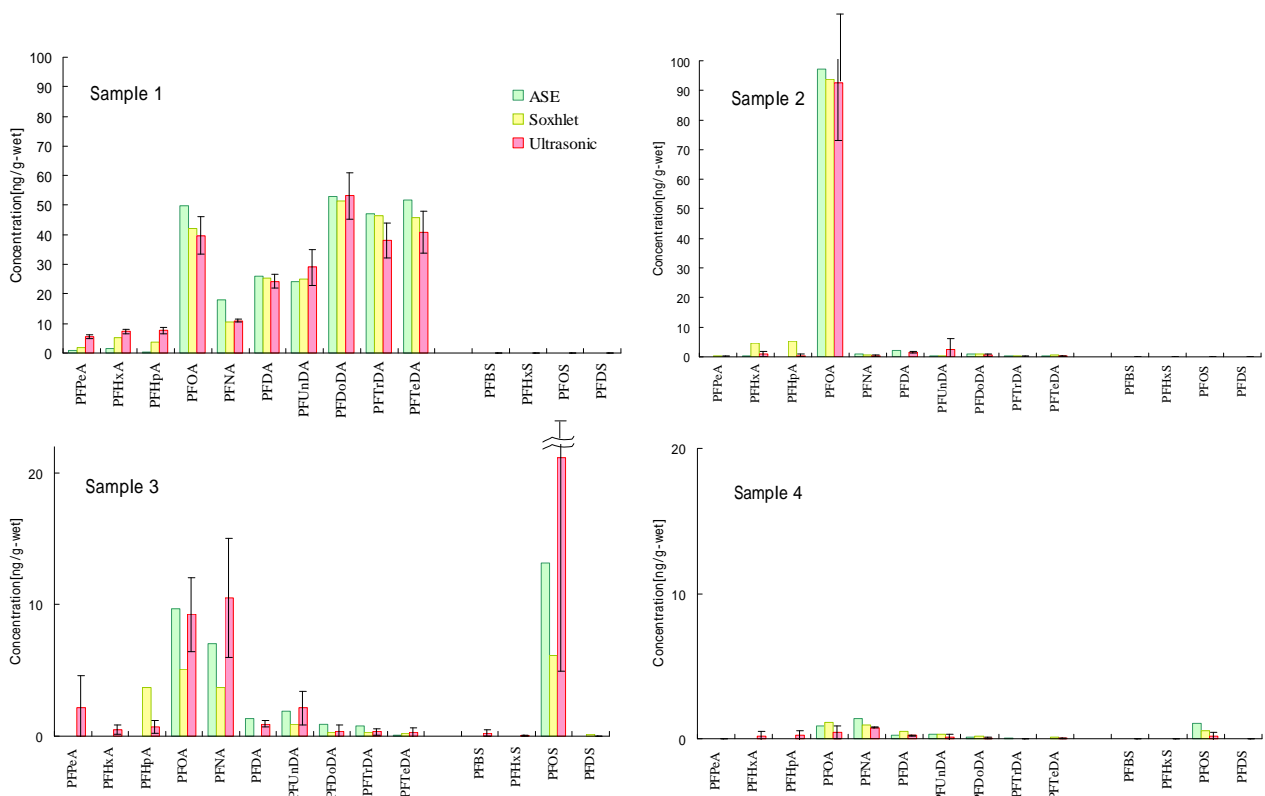


Fig.3 PFCs concentration in waste sample comparing extraction between different 3 methods

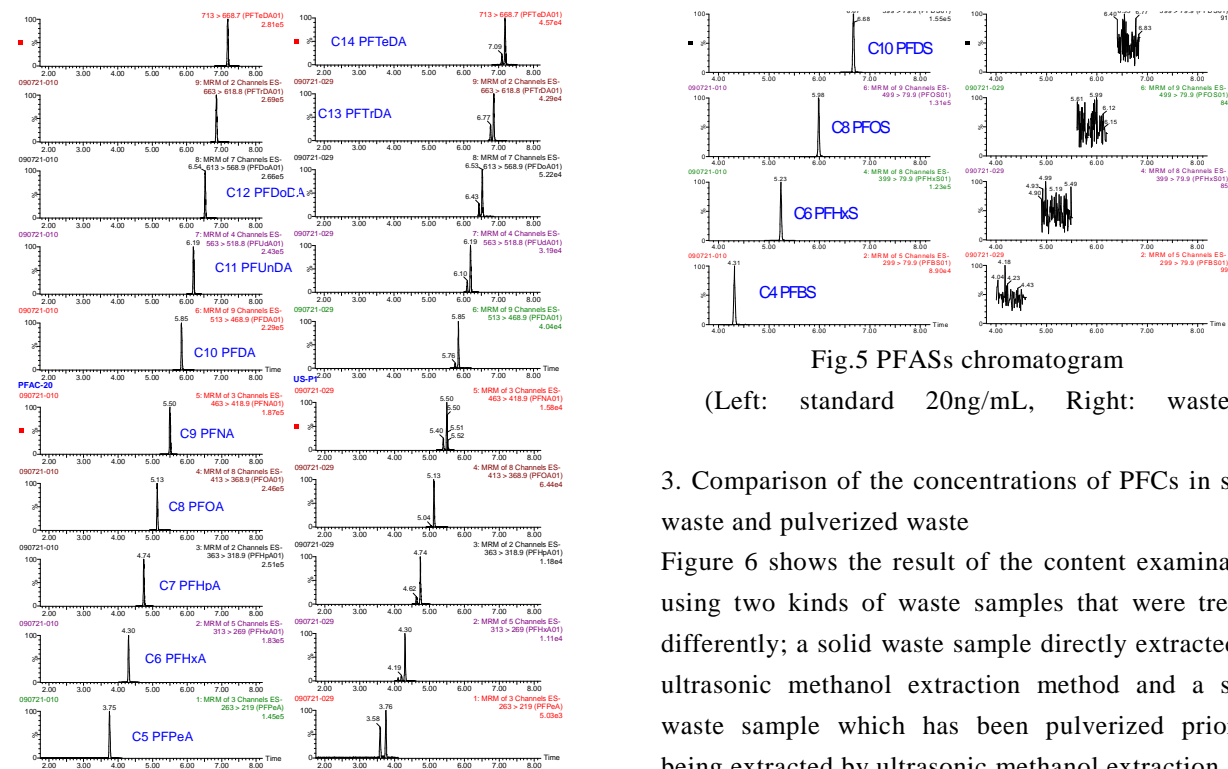


Fig.4 PFCAs chromatogram (Left: standard 20ng/mL, Right: waste sample 1)

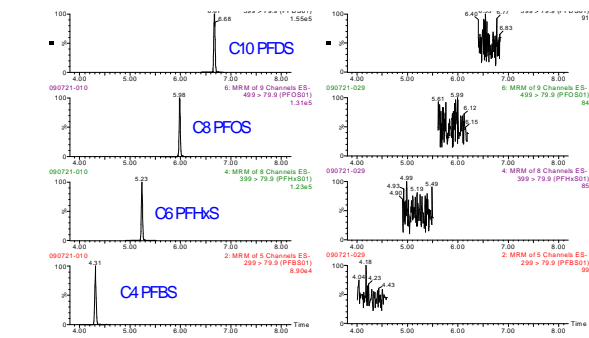


Fig.5 PFASs chromatogram (Left: standard 20ng/mL, Right: waste)

### 3. Comparison of the concentrations of PFCs in solid waste and pulverized waste

Figure 6 shows the result of the content examination using two kinds of waste samples that were treated differently; a solid waste sample directly extracted by ultrasonic methanol extraction method and a solid waste sample which has been pulverized prior to being extracted by ultrasonic methanol extraction method, as an example, sample1 and sample3. The concentrations of PFCs in the solid sample and the pulverized sample were nearly the same for waste sample1 (dewatered sludge). On the other hand, the waste sample3 (ASR) shows higher concentrations of PFCs in the solid state than the pulverized one.

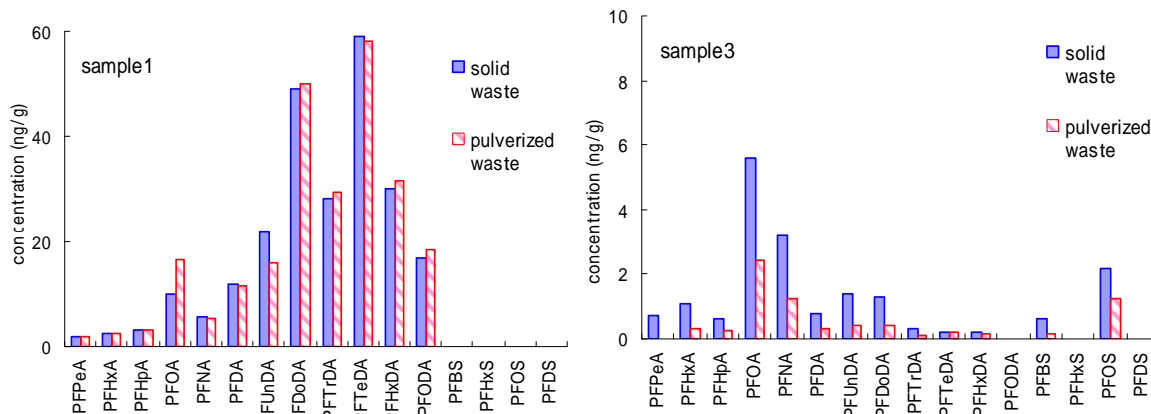


Fig.6 Comparison solid waste with pulverized waste

## CONCLUSIONS

The analysis method for PFCs in waste samples was established.

Ultrasonic extraction method was employed, which gave good results as a pretreatment method, for both operation blank and isotope recovery tests. These analytical procedures are composed by methanol extraction, centrifugation, concentration with nitrogen-gas and determination by LC/MS/MS. And the waste was used in solid form.

PFCs were detected at retention time between 3.75~7.15 min without interferences.

MDL was 1.4 - 3.9ng/g. It was confirmed that this method was applicable for PFCs analysis in waste samples. As the result, the difference existence ratios of PFCs in various wastes was shown, establishing profile of each waste at different sources became possible.

The result indicates that the existence ratios of PFCs in various wastes are different, which leads to the possible establishment of a profile of each waste generated from different sources.

## REFERENCES

1)Kannan K., Corsolini S., Falandysz J., Fillmann G., Kumar KS., Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, Van Wouwe N., Ho Yang J.,Aldous K.M. : Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 4489-4495(2004)

2)Murakami M., Takizawa S. : Current Status and Future Prospects of Pollution in Water Environments by perfluorinated surfactants, *Journal of Japan Society on Water Environment*, **33(8)**, 103-114 (2010)

3)Harada K., Saito N.,Inoue K., Yoshinaga T., Watanabe T., Sasaki S., Kamiyama S., Koizumi A. : The Influence of Time, Sex and Geographic Factors on Levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the Last 25 years, *J. of Occupational Health*, **46**, 141-147(2004)

4)Lien N.P.H., Fujii S., Tanaka S. : PFOS and PFOA contamination in Surface Water and Drinking Water in Kinki Area, The 41<sup>st</sup> Annual Conference of Japan Society on Water Environmental, 497(2007)

5)Sasaki K., Yaegashi K., Saito N. : Perfluorooctane sulfonate(PFOS) and perfluorooctanoate(PFOA), Environmental Monitoring Report 2004: 37-59(2004)

6)Yoshida M., Kobuke Y., Nakano T. : Contamination of PFOA and PFOS in the rivers of Hyogo pref. Japan, *Organohalogen Compounds*,**69**, 2881-2884(2007)

7)Matsumura C., Takemine S., Yoshida M., Nakano T. : Contamination of perfluorinated compounds in water environment of Hyogo prefecture, *18<sup>th</sup> Symposium on Environmental Chemistry Programs and Abstracts*, 592-593 (2009)

8)Matsumura C., Takemine S., Yoshida M., Suzuki M., Yamamoto A., Tsurukawa M., Nakano T. : Contamination of perfluorinated compounds in the river water of Hyogo pref. Japan, *Organohalogen Compounds*,**71**, 2315-2319(2009)

9)Yoshida M., Matsumura C., Takemine S., Okuno T., Nakano T., Yamamoto A., Tokai A., Morioka T. : Risk assessment of PFOA, PFOS and determination of perfluorinated compounds in blood, *Organohalogen Compounds*, **71**, 2605-2608(2009)

10)Yagi M., Yamaji A., Shibutani I. : Tendency of fluorinated organic compounds in the process of leachate disposal of final landfill site, 18<sup>th</sup> *Symposium on Environmental Chemistry Programs and Abstracts*, 558-559 (2009)

11)Kurihara M., Yoshizawa T., Oishi O., Fujimura Y., Kojima H. : Study of PFCs in water treatment of disposal site, 19<sup>th</sup> *Symposium on Environmental Chemistry Programs and Abstracts*, 508-509(2010)

## 要 約

本研究は、廃棄物中において、高感度な PFCs 一斉分析手法を確立するために実施した。廃棄物の前処理法には、ASE、ソックスレー、超音波抽出法の3手法を比較検討した。14種のPFCsについて、操作ブランク試験、同位体を用いた添加回収試験、固形及び粉碎廃棄物を用いた含有量試験などを実施した。

その結果、前処理法としては、操作ブランク、同位体回収試験で良好な結果であった超音波抽出法を採用した。即ち、廃棄物中PFCsは、メタノール抽出、遠心分離、窒素ガスでの濃縮、LC/MS/MSで分析した。また、廃棄物の形状は、固形状のまま用いることとした。本研究で確立した手法で廃棄物の含有量を測定したところ、妨害もなく、保持時間3.75分~7.15分間に検出できることを確認した。様々な廃棄物中のPFCsの存在割合は異なり、排出源の異なる廃棄物ごとのプロファイルを確立することで汚染防止対策に寄与できると期待される。

## [ノート]

# 加古川流域陸域起源有機物との比較における 播磨灘海域の難分解性有機物に関する特性評価

仲川 直子<sup>1</sup> 吉田 光方子<sup>1</sup> 金澤 良昭<sup>1</sup> 前川 真徳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>兵庫県環境研究センター 水質環境科 (〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27)

## Characteristics of Refractory Organic Matters in Surface Water at the Sea of Harima in Comparison with Organic Matters from the Kako River Watershed

Naoko NAKAGAWA<sup>1</sup>, Mihoko YOSHIDA<sup>1</sup>,  
Yoshiaki KANAZAWA<sup>1</sup> and Masanori MAEKAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Environmental Sciences,  
3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan

近年、瀬戸内海では化学的酸素要求量 (COD) の発生負荷量が減少したにもかかわらず、COD に係る環境基準達成率の改善が進まない状況にあり、その原因の一つとして難分解性有機物の存在が懸念されている。

そこで、これまで行ってきた大阪湾における難分解性有機物の特性評価に加え、播磨灘における難分解性有機物の特性を流入する陸域起源有機物との比較において評価するため、播磨灘海域の海面表層水中有機物及び難分解性有機物、さらには、加古川流域の陸域起源有機物を対象として、COD、全有機炭素 (TOC) 及び紫外線吸光度の測定を行うとともに、ゲルクロマトグラフィーを実施し、有機物の構造特性、分子サイズ特性を比較検討した。

### はじめに

瀬戸内海は、高度経済成長による産業活動の拡大に伴い、産業排水や生活排水の負荷による水質汚濁が進行していった。そのため、瀬戸内海の水質改善を目指した総量規制が始まり、有機汚濁負荷量は大幅に減少し、水質汚濁状況や赤潮の発生件数等で改善がみられるようになった。

しかし、瀬戸内海では、未だ有機汚濁の指標である COD に係る環境基準未達成の海域は存在しており、近年では COD の改善が進まない状況にある。

そこで、本研究では、閉鎖性海域の COD の改善が進まない原因の一つとして考えられる難分解性有機物<sup>1)</sup>の実態解明を目的に、これまで行ってきた大阪湾における難分解性有機物の特性評価<sup>1)2)</sup>に

加え、播磨灘海域を対象とした難分解性有機物の特性を把握するために、播磨灘海域の表層水について生分解試験を行い、生分解前後における有機物量や分子サイズ特性の変化について解析するとともに、加古川流域の陸域起源有機物の特性との比較を行うことにより、難分解性有機物の生成メカニズムの解明に繋がる知見を得た。

### 方法

#### 1. 試料採取及び試料調製方法

2011 年夏季に Fig.1 に示す播磨灘海域 5 地点 (S1 ~ S5) の海面表層水を採取するとともに、加古川水系 4 地点 (R1 ~ R4) の河川表層水、ダム湖 (Q2) 及びため池 (Q3) の表層水、水田 (Q1) が

らの放流水, 下水処理場 (P1) 及び 2 工場 (P2, P3) の排水水採取した。採取した試料は, 保冷した状態で実験室に持ち帰り, 未処理の生試料とガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/C) によりろ過し, 得られたろ過試料とに分けた。

また, 海面表層水である 5 地点 (S1~S5) の生試料については, 暗所,  $20 \pm 1$  の条件下で通気性を保ち毎分 100 回転の振とう状態で, 100 日間の生分解試験を行った。この生分解試験後の試料は, 採取直後と同様にろ過し, 生試料とろ過試料に分けた。

なお, 100 日間生分解試験を行った後残存する有機物は, 今井らの報告<sup>3)4)</sup>に従い, 難分解性有機物とみなし, ろ過試料中に残存する有機物を難分解性溶存有機物とみなした。

## 2. 態別有機物濃度の分析

1 において採取及び調製した生試料及びろ過試料について, 化学的酸素要求量 COD 及び全有機炭素濃度 TOC を分析した。

ただし, COD については, JIS K0102 17<sup>5)</sup>に定める 100 過マンガン酸カリウムによる酸素消費量により求め, TOC については, 島津製全有機体炭素計 TOC-5000A を用いた JIS K0102 22.2<sup>6)</sup>に定める燃焼酸化 - 赤外線式 TOC 自動計測法により求めた。

なお, ろ過試料から得られた結果は溶存態とし, 生試料から得られた結果から溶存態を差し引いた値を懸濁態とした。

## 3. 紫外線吸光度 (UV260) の分析

芳香族化合物や不飽和二重結合を持つ化合物が紫外外部波長 250~280nm に大きな吸収を示す<sup>7)</sup>ことから, 日立製分光光度計 U-2001 により, 光路長 5cm の石英セルを用いて, 1 において採取及び調製したろ過試料の紫外外部波長 260nm における吸光度 (UV260) について測定した。

ただし, 単位はセル長当たりのミリ吸光度とし, mABS/cm で表現した。

## 4. ゲルクロマトグラフィー

1 において採取及び調製したろ過試料の内 P3 を除くろ過試料についてロータリーエバポレーターを用いて 5 倍濃縮になるように減圧濃縮を行った。得られた濃縮試料と P3 のろ過試料はシリンジフィルター (Whatman GD/X) でろ過処理をし, ゲル

クロマトグラフィー測定用試料とした。

ゲルろ過は, 内径 2.5cm のカラムを用いて, 担体として Sephadex G-15 を 90cm の高さになるように充填し, 亀井らの報告<sup>8)9)</sup>に準拠した方法で実施した。

なお, ゲルクロマトグラフィー測定用試料の添加量は 5mL とし, 溶離液は蒸留水を用いて, 自然流下速度で溶出させ, 得られた溶出液を 5mL ごとに試験管に分取した。分取した溶出液については, それぞれ溶存態有機炭素濃度 DOC を測定し, ゲルクロマトグラムを作成した。

ただし, DOC については, 2 に示す TOC と同様の方法により求めた。

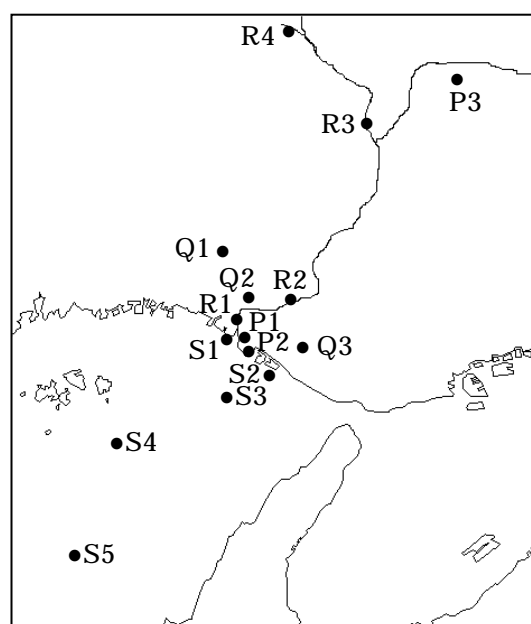


Fig.1 Location of sampling sites

## 結果および考察

### 1. COD 及び TOC を指標とした態別有機物量

陸域地点採取試料, 海域地点の生分解前試料 (0d) 及び 100 日生分解後試料 (100d) の COD 及び TOC の結果を溶存態と懸濁態に区分して, Fig.2 に, TOC に対する COD の割合を Fig.3 に示すとともに, 海域 5 地点における生分解試験前の 0 日目の有機物濃度に対する 100 日生分解試験後の有機物濃度の割合を COD 及び TOC 別に Table 1 に示す。

なお, COD の単位は TOC と同じとするため, 酸素濃度を炭素濃度に換算 [COD(mgC/L) = (12/32) × COD(mgO<sub>2</sub>/L)] して表記している。

Fig.2 より, ダム湖 (Q2) を除く陸域試料に比

べて、生分解前の海域試料 S1(0d) ~ S5(0d)は、懸濁態の占める割合が高いことが分かった。一方、100 日生分解後の海域試料 S1(100d) ~ S5(100d)は溶存態の占める割合が高く、いずれも 80%以上が溶存態であることが分かった。そのため、海面表層水中には、生分解を受けやすい懸濁態の有機物が存在していると考えられ、比較的生分解を受けやすいと考えられる植物プランクトンが懸濁態有機物として多く含まれていたと推察された。

また、この 100 日間の生分解後に残存する有機物である難分解性有機物の 80%以上が溶存態であるという結果は大阪湾における難分解性有機物の特性<sup>1)</sup>と一致した。

次に、Fig.3 より、COD/TOC の値を比較すると、ため池(Q3)において最も高い値を示し、次いで、ダム湖(Q2)、下水処理場(P1)、河口域(R1)、工場(P2)が高く、海域試料 S1(0d) ~ S5(0d)はいずれも陸域試料より低い値となった。そのため、海面表層水は陸水に比べ、酸化を受け COD 値として評価される有機物の全有機物に占める存比率が低いことが示された。また、100 日生分解後の海域試料 S1(100d) ~ S5(100d)では、いずれも生分解前の海域試料 S1(0d) ~ S5(0d)に比べて COD/TOC の値が低くなっており、生分解前の有機物に比べて生分解後に残存する難分解性有機物は、酸化を受け COD 値として評価される有機物の含まれる割合が小さいことが分かった。

さらに、Table 1 に示される 100 日生分解後に残存する有機物の割合を TOC, COD 別に見ると、COD を指標とした場合の方が TOC を指標とした場合に比べて低い値となった。これらのことより、有機物量を COD 値で評価した場合、有機物量を TOC 値で評価した場合に比べて生分解を受けて減少する有機物の割合を大きく表してしまうことが示唆された。

一方、TOC を指標とした場合のみで 100 日生分解後の残存率をみると、いずれの地点においても残存率は 50%以上であることが分かった。そのため、播磨灘海域では、海面表層水中の有機物は炭

Table 1 Ratio of COD and TOC after a 100 - day incubation to COD and TOC before incubation

Sample No.	S1	S2	S3	S4	S5
TOC (100d)/TOC(0d)	0.55	0.62	0.64	0.58	0.76
COD (100d)/COD(0d)	0.44	0.48	0.56	0.35	0.48

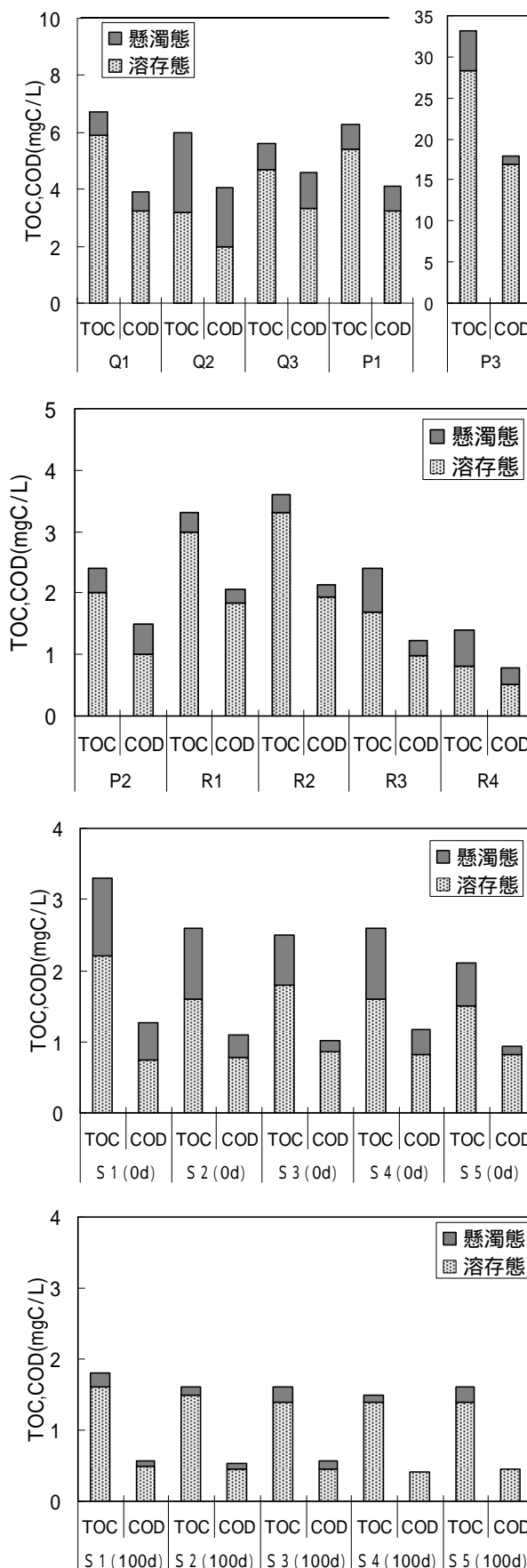


Fig.2 Suspended and Dissolved COD and TOC

素換算で50%以上が難分解性有機物であることが示され、100日生分解試験後に残存する難分解性有機物の割合が炭素換算で50%以上であった大阪湾<sup>1)</sup>と同様の結果が得られた。

次に、これらのTOCにおける残存率を地点毎に比較すると、Fig.2に示される生分解前の海域試料S1(0d)～S5(0d)におけるTOC値から、TOC値が低い地点ほど残存率は高くなるのが分かり、播磨灘海域では、有機物濃度の低い地点ほど有機物中に含まれる難分解性有機物の割合が高くなる傾向が認められた。

## 2. 溶存態有機炭素濃度 DOC に対する UV260 の比 (UV260/DOC) による溶存有機物の構造特性

陸域地点のろ過試料、海域地点の生分解前のろ過試料(0d)及び100日生分解後のろ過試料(100d)におけるDOC、UV260及びUV260/DOCをTable 2に示す。

Table 2より、河川R1～R4におけるUV260/DOCは、22～25(mABS/cm/(mg/L))という結果になり、UV260/DOCの値が20～30(mABS/cm/(mg/L))の範囲に入る河川の割合が高いという報告<sup>10)</sup>と一致した。また、最も上流に位置するR4と水田(Q1)においてUV260/DOCは高い値を示しており、土壤腐植物質を多く含む森林流出水のUV260/DOCが30(mABS/cm/(mg/L))前後と高くなるという知見<sup>10)</sup>から、河川上流域において森林等から流出する土壤腐植物質が多く含まれていることと水田に土壤腐植物質由来の有機物が多く含まれていることが伺えた。

さらに、工場(P2)の試料は、他の陸域試料よりUV260/DOCの値が低く、海域試料S1(0d)～S5(0d)の試料と同程度となっていたが、これは、外来性由来の有機物に比べて内部生産由来の有機物の方がDOCに対するUV260の比が低いという報告<sup>10)</sup>があることから、陸域からの影響より海水中に含まれる植物プランクトンの影響が大きかったためと考えられた。

次に、生分解前の海域試料S1(0d)～S5(0d)のと100日生分解後の海域試料S1(100d)～S5(100d)を比較すると、比較的DOCの値が高いS1は、生分解を受けることによりUV260/DOCの値が高くなったが、その他の地点では逆にUV260/DOCの値が低くなるのが分かった。このことより、DOC値の高い沿岸域では、芳香族や不飽和二重結合等の官能基を持っていない溶存有機物で比較的分解を受けや

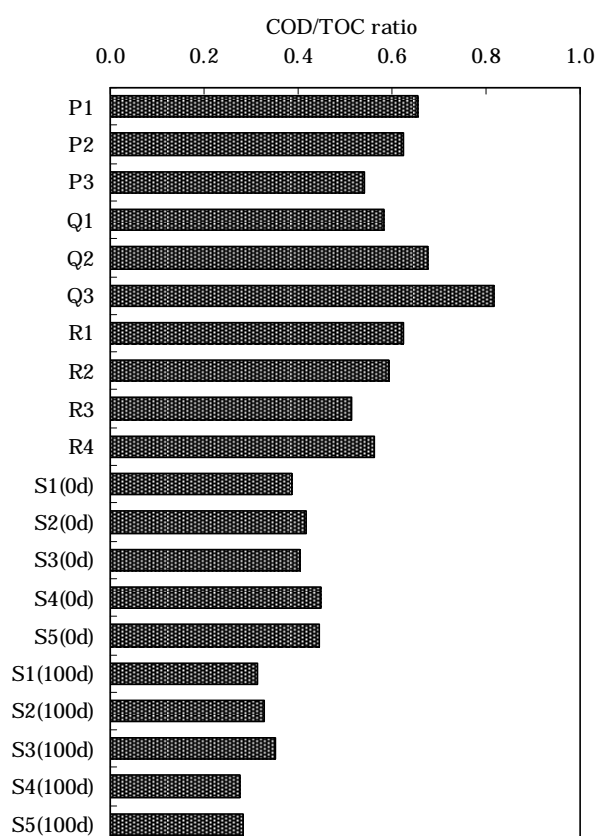


Fig.3 COD ratio for TOC

Table 2 DOC, UV absorbance at 260nm and ratio of UV absorbance at 260nm to DOC

Sample No	DOC (mg/L)	UV260 (mABS/cm)	UV260/DOC (mABS/cm/(mg/L))
P1	5.4	104	19.3
P2	2.0	32	16.2
P3	28.3	606	21.4
Q1	5.9	153	25.9
Q2	3.2	56	17.6
Q3	4.7	98	20.8
R1	3.0	66	22.1
R2	3.3	76	22.9
R3	1.7	37	21.9
R4	0.8	20	25.0
S1(0d)	2.2	39	17.8
S2(0d)	1.6	24	14.8
S3(0d)	1.8	27	14.9
S4(0d)	1.6	28	17.4
S5(0d)	1.5	28	18.4
S1(100d)	1.6	29	18.1
S2(100d)	1.5	18	12.3
S3(100d)	1.4	20	14.4
S4(100d)	1.4	18	13.1
S5(100d)	1.4	17	12.4

すい有機物が多く存在するが、他の地点では、溶存有機物中に含まれる芳香族や不飽和二重結合等の官能基の部分の方が生分解を受けやすいことが推察された。

### 3. ゲルクロマトグラフィーによる溶存有機物の分子量分布特性

陸域地点のろ過試料、海域地点の生分解前のろ過試料(0d)及び100日生分解後のろ過試料(100d)を用いて実施したゲルクロマトグラフィーにより得られたゲルクロマトグラムをFig.4に示す。

なお、本研究に使用したSephadex G-15は分画可能範囲が分子量1,500以下である<sup>11)</sup>ため、分子量20,000,000のBlue Dextranの溶出位置であったFraction No.34をみかけの分子量1500以上の位置とし、分子量1,355のVitamin B12の溶出位置であったFraction No.55をみかけの分子量1,355とした。

Fig.4より、みかけの分子量1500以上の高分子量域に最大値を示すピークが認められたのは水田(Q1)、河川上流側(R3, R4)であり、これらはTable 2においてUV260/DOCの値も高かったことから、河川上流域と水田には土壤腐植物質を多く含んでいるために高分子量域に最大値を示すピークが現れたと考えられた。また、河口域に位置するR1を除いた陸域試料は、その大部分がみかけの分子量1355以上の範囲にピークが現れており、陸域起源の溶存有機物は低分子量域にはほとんど分布しないことが分かった。さらに、河川R1~R4を比較すると、上流から下流にいくに従い、ピークの位置が高分子量側から低分子量側へと変化することが分かった。このことから、河川水に含まれる溶存有機物は上流から下流に向かって、分子量が小さくなっていくことが示唆された。

一方、海域試料S1(0d)~S5(0d)では、みかけの分子量1500以上の高分子量域に小さなピークが認められたものの、最大を示すピークはみかけの分子量1355~1500の間とみかけの分子量1355以下の低分子量域であったため、高分子量域に分布する陸域起源の溶存有機物は海面表層水中にはほとんど存在しないことが分かった。また、みかけの分子量1355~1500の間に示されるピークの位置はダム湖(Q2)とため池(Q3)において示されるピークの位置と類似していたため、海水、淡水にかかわらず閉鎖性水域では、この位置にピークを示す溶存有機物が存在すると推察された。

次に、生分解前の海域試料S1(0d)~S5(0d)と100日生分解後の海域試料S1(100d)~S5(100d)を比較すると、みかけの分子量1355以上の位置に認められるピークは100日生分解後に大きな減少は認められず、みかけの分子量1355以下の低分子量域の位置に認められるピークは100日生分解後に大きく減少することが分かった。一方、大阪湾海面表層水では、100日間の生分解による低分子量域のピークの減少がほとんど認められず<sup>2)</sup>、植物プランクトン由来の溶存有機物では、低分子量域のピークが100日生分解後に減少していた<sup>12)</sup>ことから、播磨灘海域において低分子量域に分布する溶存有機物は植物プランクトン由来の有機物である可能性が高いと考えられた。

さらに、100日生分解後の海域試料S1(100d)~S5(100d)に共通して認められるピークの位置は、みかけの分子量1355~1500の間と低分子量域であり、これは大阪湾における難分解性溶存有機物が示すピークの位置<sup>2)</sup>と一致していたため、海域に係わらず、海面表層水中に存在する難分解性溶存有機物はみかけの分子量1355~1500の間と低分子量域に分布すると考えられた。

## 結 論

本研究では、播磨灘の海面表層水中難分解性有機物の特性を把握するため、生分解特性、構造特性及び分子サイズ特性について、加古川流域の陸域起源有機物との比較をしながら解析を行い、さらに、大阪湾における難分解性有機物の特性との相違について検討した。

その結果、播磨灘海域における難分解性有機物の特性の一部が大阪湾海域における難分解性有機物の特性と一致していることが認められた他、陸域起源有機物と海域中有機物では多くの点で特性が異なること等が示された。本研究からは、陸域起源有機物を与える海域有機物への影響を明確に示すことができなかったが、今後は、陸域起源有機物が海域中で生分解を受ける過程についての分析を加え、陸域起源有機物が海域中難分解性有機物の生成に及ぼす影響についてさらに検討していくこととする。



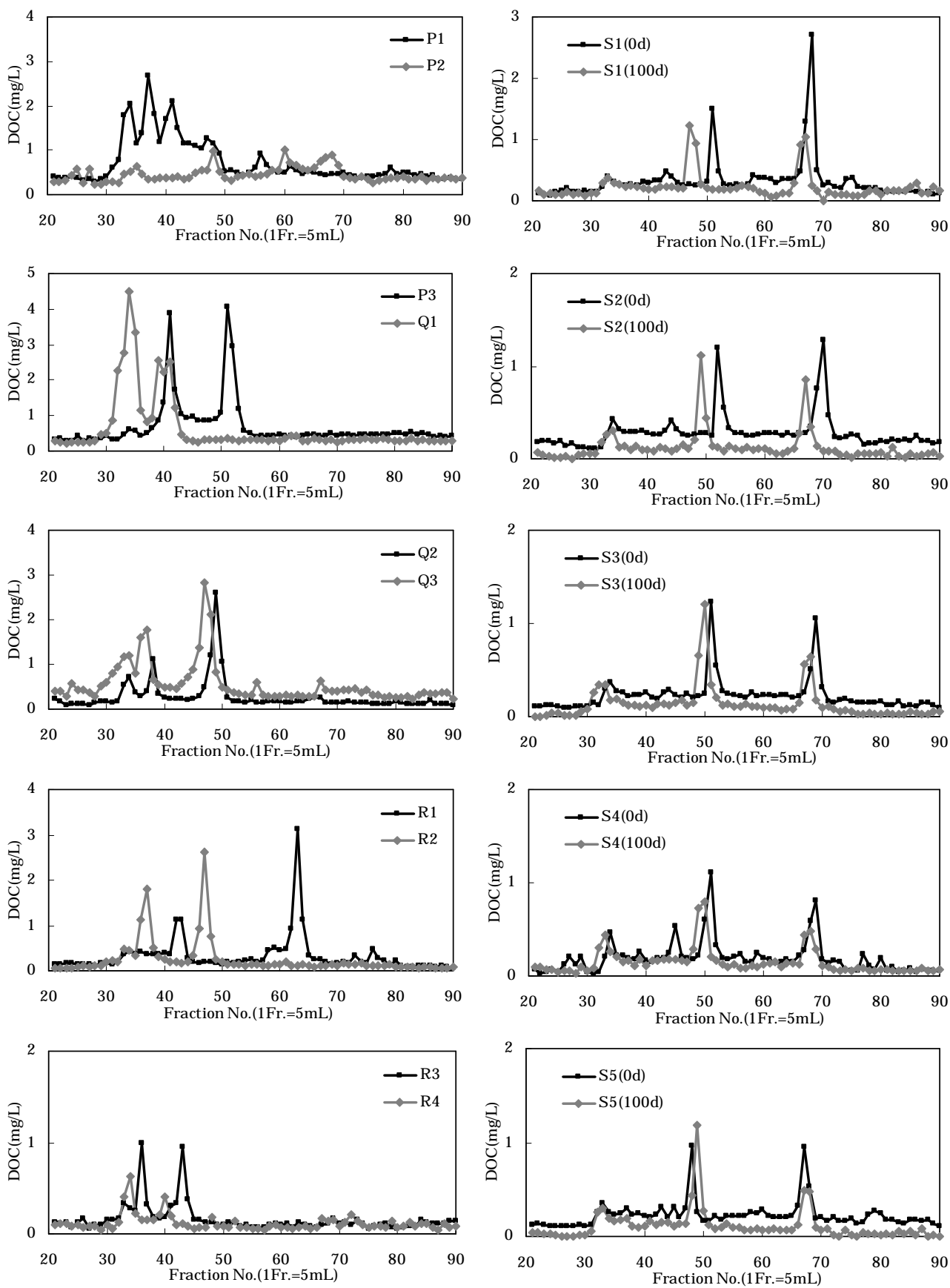


Fig.4 Gel chromatograms with Sephadex G-15

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料採取にご協力を頂きました関係機関、関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

また、本研究は大阪湾広域臨海環境整備センターによる「大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する研究助成制度」の助成を受けました。

ここに記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) 仲川直子, 金澤良昭, 梅本諭, 上村育代: 大阪湾表層水中有機物の生分解前後における特性変化について. 兵庫県環境研究センター紀要, 1, 25-30(2010)
- 2) 仲川直子, 金澤良昭, 梅本諭, 上村育代: 陸域溶存有機物との比較における大阪湾域難分解性溶存有機物の構造特性及び分子量分布特性について. 兵庫県環境研究センター紀要, 1, 31-36(2010)
- 3) 今井章雄: 難分解性溶存有機物. 環境儀, (13), 4-5, 独立行政法人国立環境研究所発行, 茨城県(2004)
- 4) 今井章雄: 湖沼トレンドモニタリングでみる難分解性有機物の特性と動態. 地球環境研究センターニュース, 14(7), 11-14(2003)
- 5) 日本規格協会: 工場排水試験方法JIS K 0102, 42-44, 日本規格協会発行, 東京(1998)
- 6) 日本規格協会: 工場排水試験方法JIS K 0102, 57, 日本規格協会発行, 東京(1998)
- 7) 矢部禎昭: COD 及び排出量の測定技術. 用水と廃水, 22(10), 11-19(1980)
- 8) 亀井翼, 丹保憲仁: 水質のマトリックス的評価のためのゲルクロマトグラフィー. 水道協会雑誌, (519), 24-41(1977)
- 9) 丹保憲仁, 亀井翼: マトリックスによる都市水代謝の水質評価. 水道協会雑誌(502), 2-24(1976)
- 10) 福島武彦, 今井章雄, 松重一夫, 井上隆信, 小澤秀明: 湖水溶存有機物の紫外線吸光度:DOC 比の特性とそれの水質管理への利用. 水環境学会誌, 20(6), 397-403(1997)
- 11) Sephadex: gel filtration in theory and practice, Pharmacia Fine Chemicals, 8
- 12) 仲川直子, 金澤良昭, 宮原一隆, 上村育代, 梅本諭: 珪藻類を対象とした植物プランクトン由来の難分解性溶存有機物に関する特性評価. 兵庫

## Abstract

The existence of the refractory organic matters (ROM) have been pointed out as reason that the Seto Inland Sea has the problem that the chemical oxygen demand (COD) values have remained at the same level.

In comparison with the organic matters from the Kako River watershed, the ROM in surface water at the Sea of Harima were examined by total organic carbon, COD, UV absorbance, and analysis of molecular weight by gel chromatography.

These results suggested that COD was not suitable as the index for evaluation of the ROM, and the ROM in sea area had the same molecular weights.