

(31) 下水試料中に含まれる 懸濁態ペルフルオロ化合物類の 簡便性・再現性の高い分析方法の提案

鈴木 裕識^{1*}・田中 周平¹・藤井 滋穂¹・Chinagarn Kunacheva¹

¹京都大学大学院地球環境学堂 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田本町)

* E-mail: suzuki@eden.env.kyoto-u.ac.jp

本研究では、下水試料中に懸濁態として存在するペルフルオロ化合物類 (PFCs) の簡便かつ再現性の高い分析方法の提案を主目的とした。活性汚泥および脱水ケーキ中に懸濁態として含まれるPFCs12種に対し、高速溶媒抽出法、溶媒振とう抽出法、超音波抽出法を比較し、前処理方法としてPFC-IIカートリッジによる固相抽出・溶出法とEnvi-Carbカートリッジによる固相抽出・クリーンアップ法を検討した。その結果、①活性汚泥の分析には、メタノールによる振とう抽出をした後、Envi-Carb処理を施す方法が最適であった。②先行研究と比較して、操作が簡便かつ回収率と再現性が良好な分析方法を確立できた。③この方法は下水流入水、生物反応槽流出水等の多様な懸濁態試料にも適用できる可能性が示された。

Key Words : perfluorinated Compounds (PFCs), wastewater treatment plants (WWTPs), particulated-phase, extraction methods, pretreatment methods, matrix effects

1. はじめに

人工有機フッ素化合物であるペルフルオロ化合物類 (PFCs) は撥水性、撥油性、耐熱性、電気絶縁性などの優れた化学的特性を持つことから、過去 50 年以上に渡り、撥水剤、表面コーティング剤、消火剤などに幅広く用いられてきた¹⁾。その一方で、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) が 1999 年に米国の有機フッ素化合物製造工場の従業員の血清から最高 128 µg/mL の高濃度で検出されて以来²⁾、PFCs の残留性や生物蓄積性が懸念され、ヒトや環境に対する悪影響が問題視され始めた。その後、PFOS は 2009 年に第 4 回ストックホルム条約締約国会議において製造・使用を制限する附属書 B に追加される³⁾など、PFCs による環境汚染が注目されている。

既往の研究により、下水処理施設が PFCs の公共用水域への負荷源の一つであるという指摘がされている^{4)~9)}。本研究グループでは、調査した 45 の下水処理施設のうち 84% の施設で放流水中の溶存態ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の濃度が流入時より高くなる傾向を示した⁹⁾。さらに、PFOA が生物反応槽において活性汚泥への吸着により高濃度で蓄積した後、溶存態として下流へ負

荷している可能性を示した¹⁰⁾。しかし、下水処理工程中の PFCs を形態別に研究した事例は未だ限られており^{7)~9)}、下水試料中の懸濁態 PFCs の分析方法は表-1 に示す検討事例がいくつかあるのみである^{10)~17)}。その中には複雑な手順が必要な方法が多く、各操作での損失やコンタミネーション、試料の状態変化などが懸念される。

本研究では、下水試料中の懸濁態 PFCs に対し、手順の簡便さ、回収率、抽出濃度、再現性の観点から最適な抽出方法と前処理方法を検討することを主目的とした。

2. 実験の方法

(1) 研究の構成

本研究の構成を図-1 に示す。活性汚泥と脱水ケーキを対象に、3種類の抽出方法の検討、3種類の前処理方法の検討を行い、見出した最適な分析方法を下水流入水、生物反応槽流出水等に適用し、回収率の確認を行った。

(2) 抽出試料の準備

2011 年 4 月 22 日に、ステップ流入式多段硝化脱窒法

表-1 先行研究が報告している下水汚泥中のPFCsの抽出方法および前処理方法

研究者	抽出方法	抽出前処理	標準添加量	抽出条件	使用溶媒	抽出後処理
Schröder, 2003 ¹¹⁾	ソックスレー	凍結乾燥	300 µg	溶媒の沸点	MeOH*-塩酸(99:1)	-
	ASE	凍結乾燥	300 µg	2000psi、 150 °C	EtOAc-DMF(8:2)* MeOH-リン酸(99:1)	-
野添, 2007 ¹⁰⁾	ASE	自然乾燥	10 ng	2000psi 100 °C×3回	MeOH	・SPE (Presep-C Agri)
Llorca <i>et al.</i> , 2011 ¹²⁾	ASE	凍結乾燥 均質化	25 ng	1500psi 70 °C×2回	MeOH	・SPE (Oasis-WAX)
Higgins <i>et al.</i> , 2005 ¹⁶⁾	超音波	空気乾燥 均質化	10-100 ng	装置温度: 60 °C	MeOH-酢酸 (1%)	・遠心分離 ・SPE (C-18)
Powley <i>et al.</i> , 2005 ¹³⁾	振とう	湿潤のまま アルカリ分解	10 ng	30分	MeOH	・Dispersive SPE (Envi-Carb)
Yoo <i>et al.</i> , 2009 ¹⁴⁾	振とう	アルカリ分解	-	60分×2回	ACN*-MeOH (50:50)	・遠心分離 ・SPE (Oasis-HLB)
Zhang <i>et al.</i> , 2010 ¹⁵⁾	イオン対 振とう	自然乾燥 粉碎	80-150 ng	20分×3回	TBA*	・遠心分離
					Na ₂ CO ₃ MTBE*	・Dispersive SPE ・(Envi-Carb)
Sun <i>et al.</i> , 2011 ¹⁷⁾	振とう + 超音波	自然乾燥 粉碎	2-50 ng	振とう:10分×3回 + 超音波:20分×3回 (40 °C)	MeOH	・遠心分離 ・Dispersive SPE (Envi-Carb) ・0.2 µm ろ紙

*MeOH: Methanol / ACN: Acetonitrile / MTBE: Methyl tertiary butyl ether / EtOAc-DMF: Ethyl acetate dimethylformamide / TBA: Tetra butyl ammonium

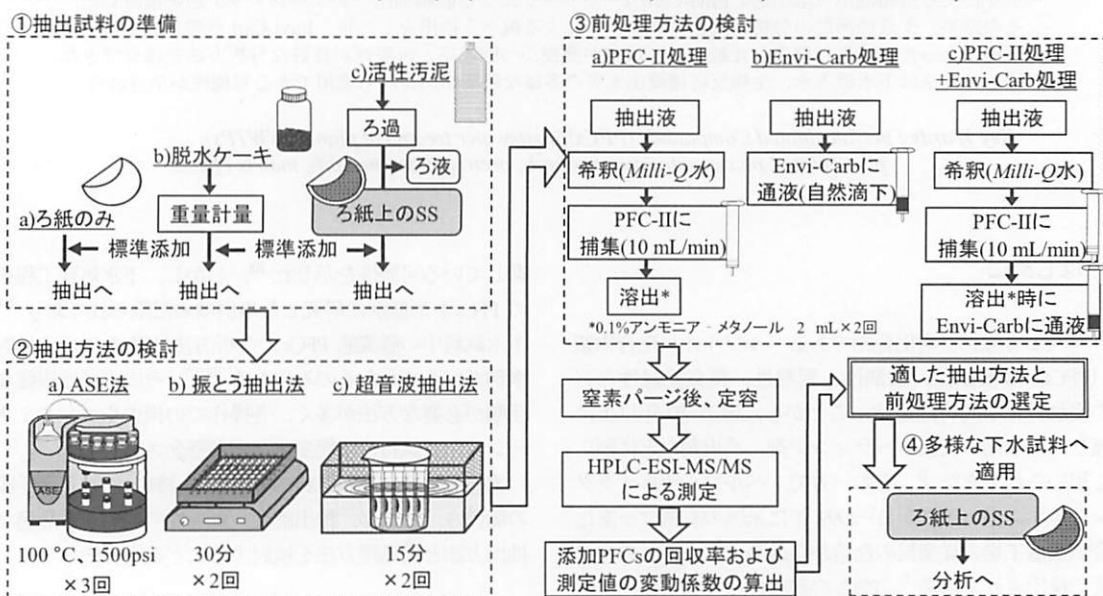


図-1 本研究の全体の流れ

の生物反応槽から活性汚泥混合液と、同処理系統から余剰汚泥として引き抜き・濃縮された後、スクリーンプレスにより処理された脱水ケーキを採取した。なお、活性汚泥混合液と脱水ケーキの含水率はそれぞれ 99.7%, 77.3% mg/L であった。採取した活性汚泥混合液は、ガラス繊維ろ紙 (GF/B, Whatman 製) により吸引ろ過後、ろ紙上の SS (1 試料: 100 mL ろ過量相当) を懸濁態試料 (以下、活性汚泥) とした。ろ過操作後のろ紙は抽出操作までに 48 時間以上風乾させた。脱水ケーキ試料 (以下、脱水ケーキ) は 1 試料につき 2 g (湿重量) を測定し、その後 48 時間以上風乾させた。操作中のコンタミ

ネーションや損失の確認および夾雑物の影響がない状況での抽出方法の比較には、メタノール洗浄・乾燥済みのろ紙 (以下、ろ紙のみ) を用いた。

(3) 抽出方法の検討

高速溶媒抽出法 (以下、ASE 法)、振とう抽出法 (以下、振とう法)、超音波抽出法 (以下、超音波法) の 3 方法を検討した。なお、抽出方法を比較する前に振とう法を用いて抽出溶媒 (メタノール、アセトニトリル) を検討した結果、PFBA、PFUnA、PFDoA を除くすべての PFCs でメタノールの方が抽出量が多かった。

表-2 高速溶媒抽出装置の抽出条件

Cell Size	34 mL
Oven Temperature	100 °C
Pressure	1500 psi
Heat Time	5 min
Static Time	10 min
Flush Volume	60% of cell volume
Purge Time	100 sec
Extraction Cycle	3

以下に、それぞれの抽出方法について示す。

a) ASE 法

高速溶媒抽出装置 ASE-350 (Dionex 製) を用いて、野添 (2006) の懸濁態 PFCs 分析方法を参考に実施した¹⁰⁾。活性汚泥は専用のろ紙を敷いたステンレススチール製のセルに挿入し、隙間をステンレスビーズで充填後、表-2 に示す条件でメタノールにより抽出した。ろ紙のみも同様に抽出した。脱水ケーキは、試料をろ紙で挟んだ後セルに挿入し、その後、活性汚泥と同様の操作を行った。

b) 振とう法

実試料の抽出の前に、ろ紙のみを用いて抽出時間および抽出回数の検討を行った結果、抽出時間 30 分、抽出回数 2 回が最適であった。抽出手順を示す。試料を 15 mL ポリプロピレン (以下、PP) 製の遠沈管に挿入し、メタノール 5 mL を加えて Vortex (VTX-3000L, LMX 製) にかけた後、30 分間振とうさせた (Multi Shaker MMS, EYELA 製)。その後、試料入り遠沈管を遠心分離機 (2410, KUBOTA 製) に 3,000 rpm の条件下で 5 分間かけた。次に、抽出液を元の試料と共に PP 製ディスクシリンジ (15 mL) に移し変え、シリンジフィルター (Whatman 製, 0.7 µm) に通し新たな遠沈管に移した。次に、元の試料をシリンジから取り出し、元の遠沈管に再度挿入し、新たなメタノール 5 mL を加え、同様の操作を繰り返した。最後に、試料の移動に用いたピンセット、元の試験管、シリンジに残った液をメタノール 1 mL で 2 回洗浄し、洗浄液を抽出液に加えた。

c) 超音波法

自励発振型 (38kHz, BLT) の超音波発生装置 (US-109, エスエヌディ製) を用いた。実試料の抽出前に、ろ紙のみを用いて抽出時間、抽出回数の比較検討を行った結果、抽出時間 15 分、抽出回数 2 回を用いることとした。なお、抽出以外の各操作は振とう法と同様とし、超音波発生装置の使用時には、水温の上昇を抑えるために適宜氷で冷やした。

(4) 前処理方法の検討

Powley ら (2005) は、活性汚泥の PFCs 分析方法にグラファイトカーボンである Envi-Carb (Supelco 製) を使用する例を報告している¹⁹⁾。本研究では、Wako 製の Presep-C PFC-II カートリッジ (以下、PFC-II) による固相

抽出-溶出法 (PFC-II 処理)、Envi-Carb カートリッジ (以下、Envi-Carb) による固相抽出-クリーンアップ法 (Envi-Carb 処理)、さらに PFC-II 処理と Envi-Carb 処理を組み合わせた方法の 3 つの方法を比較検討した。

以下にそれぞれの前処理方法について示す。

a) PFC-II 処理

ASE 法によりガラス製の容器に得られた抽出液 (約 25 mL) を、抽出後速やかに PP 容器に移し、超純水製造装置 (Advantage A10, Millipore 製) により得た超純水 (以下、Milli-Q 水) で 1 L に希釈した。一方、振とう法および超音波法による抽出液は約 12 mL と ASE 法に比べ約半分であったことから、希釈量を 500 mL とした。なお、抽出液を移し変える際には、元の容器の壁面をメタノール 2 mL で洗浄後、洗浄液を試料に加える操作を 2 回繰り返した。希釈した試料は Kumacheva (2009) の溶存態 PFCs の分析方法を参考に一部改良を加えて行った⁸⁾。0.1% アンモニア-メタノール 10 mL、メタノール 10 mL、次いで超純水 20 mL でコンディショニングした PFC-II をコンセントレーター (SPC10, Waters 製) に設置し、試料を流速 10 mL/min で通水させた。通水後、PFC-II をマニホールド (Waters 製) と真空ポンプ (ULVAC 製) で吸引脱水し、0.1% アンモニア-メタノールで PP 製の試験管に目的成分を溶出させた。なお、溶出時にはシリンジフィルター (Whatman 製, 0.2 µm) を通して、夾雑物の除去を行った。次に、溶出液を窒素パージにより 1 mL 程度まで濃縮させた後、超純水 1 mL を添加し、その後メタノール成分がほぼなくなるまで濃縮し、40% アセトニトリル 2 mL に定容させ、測定用試料とした。

b) Envi-Carb 処理

抽出液をシリンジフィルター (0.2 µm) に通した後、10 mL のメタノールでコンディショニングした Envi-Carb に通液し、PP 試験管に自然滴下させた。元の容器はメタノール 1 mL で 2 回洗浄し、洗浄液は Envi-Carb に通過させ、試料に加えた。窒素パージおよび定容方法は PFC-II 処理と同様である。

c) PFC-II 処理と Envi-Carb 処理の併用

PFC-II 処理により溶出させた試料を Envi-Carb に通液し、PP 試験管に自然滴下させた。窒素パージおよび定容方法は PFC-II 処理と同様である。

(5) 多様な下水試料への適用

活性汚泥に対し最適であると判断した分析方法を、6 つの異なる下水試料の分析に用いて適用可能性を検討した。試料は、2011 年 3 月 8 日に中華人民共和国の 2 箇所の下水処理施設 (WWTP 1 および WWTP 2) で採取した。試料の概要を図-2 に示す。下水流入水、生物反応槽流出水等の SS 濃度は 477~4,252 mg/L であった。

3. 測定の方法

(1) 試薬等

対象試薬と測定パラメーターの詳細を表-3 に示す。標準試薬として 3 種のペルフルオロアルキルスルホン酸 (PFASs) と 9 種のペルフルオロアルキルカルボン酸 (PFCAs), サロゲート試薬として 4 種の安定同位体標識 PFCs (以下, MPFCs) (Wellington Laboratories, 純度 99%以上) を使用した。なお, 標準およびサロゲート試薬は測定時に 40%アセトニトリルで調整した。その他の試薬はすべて和光純薬製であり, メタノール, アセトニトリル, 超純水は LCMS 用を, 酢酸アンモニウムは HPLC 用, アンモニウム水は精密分析用をそれぞれ用いた。実験器具は Milli-Q 水で洗浄後, メタノールで洗浄してから使用した。

(2) 測定条件

測定は HPLC-ESI-MS/MS で行った。HPLC に 1200SL (Agilent 製), MS / MS に 6410 Triple Quadrupole (Agilent 製) を用いた。HPLC では, カラムに Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent 製, 2.1 mm ϕ $\times$ 100 mm) を用い, 移動相には 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (移動相 A) と 100%アセトニトリル (移動相 B) のグラジエントをかけた。流速は 0.25 mL/min, インジェクションボリュームは 10 μ L とした。MS 部では, イオン化はネガティブイオンモード ESI 法, 検出は MRM モードで行った。定量は絶対検量線法により行い, 検量線は 0.05~40 ng/mL に調整した標準溶液 7 点で作成した。それぞれの PFC の R^2 値は 0.995 以上であった。本装置の検出下限値 (Instrument Detection

Limit IDL) および定量下限値 (Instrument Quantification Limit IQL) を表 3 に示す。IDL は装置が検出できる最小値を, IQL は装置が定量できる最小濃度を示す。シグナル/ノイズ (SN) 比が 10 程度であった標準液 (0.05 ng/mL) を繰り返して測定し ($n=5$), 得られた測定値から標準偏差を求め, その 3 倍を IDL, 10 倍を IQL とした。IQL は 0.01~0.05 ng/mL であり, 測定値の変動係数は 1.8% (PFDoA) ~18.4% (PFBS) と良好であった。

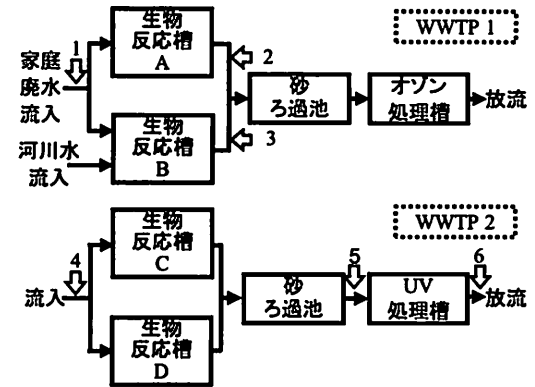


図-2 WWTP1およびWWTP2で採取した試料の概要

表-3 分析対象のPFCsとその測定パラメーター

分類	物質名	略号	Precursor ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Collision Energy (eV)	Retention time (min)	IDL (ng/mL)	IQL (ng/mL)	製造元
ペルフルオロアルキルスルホン酸	ペルフルオロブタンスルホン酸	PFBS	299	80	55	2.6	0.01	0.05	Wellington Laboratories Inc.
	ペルフルオロヘキサンスルホン酸	PFHxS	399	80	55	7.9	0.01	0.04	
	ペルフルオロオクタンスルホン酸	PFOS	499	80	55	13.8	0.01	0.04	
ペルフルオロアルキルカルボン酸	ペルフルオロブタン酸	PFBA	213	169	5	1.5	0.01	0.03	Wellington Laboratories Inc.
	ペルフルオロペンタン酸	PFPeA	263	219	5	1.9	0.01	0.03	
	ペルフルオロヘキサ酸	PFHxA	313	269	5	2.8	0.02	0.05	
	ペルフルオロヘプタン酸	PFHpA	363	319	5	4.7	0.01	0.02	
	ペルフルオロオクタン酸	PFOA	413	369	5	7.2	0.01	0.02	
	ペルフルオロノナン酸	PFNA	463	419	5	9.9	0.01	0.03	
	ペルフルオロデカン酸	PFDA	513	469	5	12.7	0.01	0.02	
	ペルフルオロウンデカン酸	PFUnA	563	519	5	15.4	0.01	0.03	
	ペルフルオロドデカン酸	PFDoA	613	569	5	18.0	0.01	0.01	
サロゲート物質	Perfluoro-n-[1,2- 13 C ₂] hexanoic acid	MPFHxA	315	271	5	2.8	0.02	0.04	Wellington Laboratories Inc.
	Perfluoro-n-[1,2,3,4- 13 C ₄] octanoic acid	MPFOA	417	373	5	7.2	0.02	0.06	
	Perfluoro-n-[1,2,3- 13 C ₃] octanoic acid	MPFDA	515	471	5	12.7	0.02	0.06	
	Perfluoro-1-[1,2,3,4- 13 C ₄] octanesulfonate	MPFOS	503	80	55	13.8	0.02	0.08	

IDL: Instrument Detection Limits IQL: Instrument Quantification Limits

(3) 回収率の算出

抽出方法と前処理方法を評価するために、分析過程における回収率を算出した。算出方法を以下に示す。野添(2006)が報告している下水試料の定量方法を参考に¹⁰⁾、1水準の標準添加を行い、抽出前に標準溶液を添加した試料と添加していない試料の測定濃度差を添加濃度で除することで回収率とした。各PFCの添加量は測定前試料で20 ng/mLとした。

(4) MPFCsを用いた前処理の有効性の確認

Envi-Carb処理前と処理後の活性汚泥抽出液(溶媒はメタノール)にMPFCs4種を3水準(2.5 ng/L, 5.0 ng/L, 10.0 ng/L)で添加し、検量線を作成した。同様に、定量時の溶媒として使用している40%アセトニトリルを用いて検量線を作成し、上記の検量線と比較した。なお、測定機器へのコンタミネーションを防ぐため、活性汚泥抽出液にはPFC-II処理後のものを用いた。

4. 結果および考察

(1) 操作によるコンタミネーションおよび損失の確認

ASE法、振とう法、超音波法による操作ブランク(標準無添加ろ紙のみの抽出)を確認した結果、ASE法では、PFBAが1.0 ng/mL、PFOAが0.69 ng/mL、PFNAが0.20 ng/mL検出され、これらの濃度は他の2方法と比較して5%有意に高かった(WelchのT検定, $n=5$)。よって、ASE法では、抽出操作時にコンタミネーションが起こる恐れが示唆された。標準添加したMilli-Q水1 LをPFC-IIに通水した際のPFCsの回収率を図-3に示す。回収率は、PFUnAとPFDoAの長鎖PFCs以外では76%~111%と良好であり、変動係数もPFDoAとPFOSの11%以外はすべてのPFCsで10%以下であり、分析は安定していた。よって、夾雑物のない試料へのPFC-II処理の有効性が示された。

Envi-Carb処理により各PFCが約10%~20%損失すること

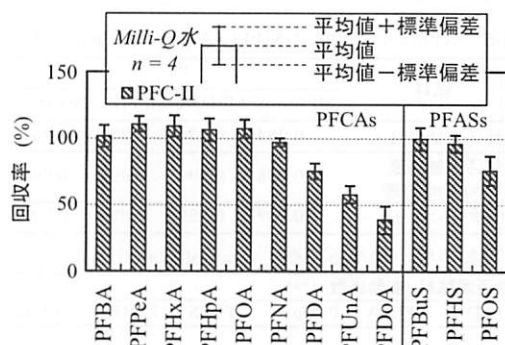


図-3 Milli-Q水にPFC-II処理をした時の回収率
(標準添加濃度 10 ng, $n=4$)

が分かった。しかし、その偏差は大きくなかったことから、Envi-Carb処理はPFCsの分析前処理として適用可能であると判断した。また、抽出時や前処理時に使用したシリジフィルターによる損失はほぼ見られなかった。

(2) 夾雑物がない試料に対する抽出方法の比較

ASE法、振とう法、超音波法で標準添加ろ紙のみを抽出した回収率を図-4に示す。3つの抽出方法のうち、PFCAsに対し高い回収率を示したのは振とう法であり、PFBAで50%、PFDAで84%であった。一方、PFASsが高い回収率を示したのは超音波法であり、PFOSで75%、PFBSで93%であった。ASE法はPFOSで72%、PFHxSで80%と良好な回収率を示したが、PFBAで17%、PFNAで40%と他の方法と比較して低かった。また、変動係数は、3つの方法のうち振とう法が最も小さかった。

よって、コンタミネーションが少なく、回収率と再現性の良好な超音波法と振とう法を用いて、活性汚泥と脱水ケーキの分析方法を検討した。

(3) 活性汚泥の分析方法の検討

a) PFC-II処理をした場合

振とうおよび超音波法により活性汚泥から抽出した試料にPFC-II処理を加えた時の添加PFCsの回収率を図-5に示す。なお、PFBAおよびPFPeAはほとんどの試料から検出されなかった。活性汚泥の抽出では振とう法と超音波法のいずれを用いてもすべてのPFCsの回収率が20%未満であった。この要因には、活性汚泥中の夾雑物による抽出の妨害、PFC-IIへの捕集の競合、MSMSでの検出

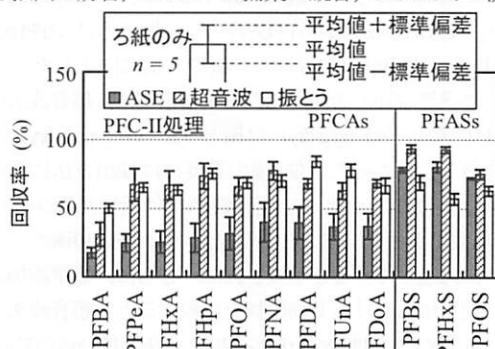


図-4 ろ紙のみに3種の抽出法を行った時の回収率
(PFC-II処理, $n=5$)

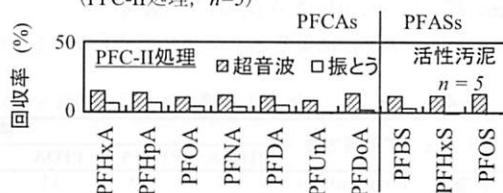


図-5 PFC-II処理を行った時の回収率比較
(活性汚泥, $n=5$)

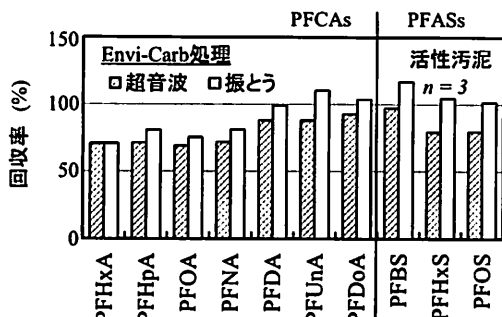


図-6 Envi-Carb処理を行った時の回収率
(活性汚泥, $n=3$)

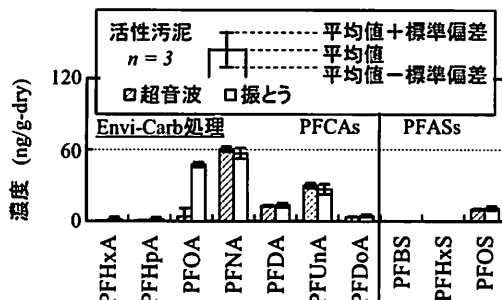


図-7 Envi-Carb処理を行った時の抽出濃度
(活性汚泥, $n=3$)

時にイオン化の障害が生じたことなどが考えられる。よって、PFC-II処理のみでは活性汚泥から抽出した懸濁態PFCsの分析前処理には不十分であると示された。

b) Envi-Carb処理をした場合

振とうおよび超音波法による抽出液に対し、Envi-Carb処理を検討した結果を図-6、図-7に示す。回収率は超音波法でPFOAの69%からPFBSの97%、振とう法でPFHxAの71%からPFBSの117%と両方法で大幅に向上した。また、標準無添加の活性汚泥の測定結果では、超音波法のPFOAの濃度 (4.1 ng/g-dry) は振とう法 (47.5 ng/g-dry) と比べ著しく低かった。他9種の濃度には抽出方法による大きな差はなかったが、超音波法では活性汚泥からのPFOA抽出が不十分であり、振とう法がPFCs10種の一斉分析には適していると示唆された。さらに、標準添加試料の測定値における変動係数を比較すると、超音波法でPFUnAの3%からPFHxSの15%、振とう法でPFUnAの3%からPFHxAの16%とすべてのPFCsで20%以下であり、Envi-Carb処理の良好な再現性が示された (表-4)。

Powleyら (2005) によると、グラファイトカーボンは

表-4 それぞれの分析方法で標準添加活性汚泥を測定した時の変動係数 (標準添加濃度 20 ng/mL, $n=3$)

抽出方法	前処理方法	標準添加活性汚泥試料 変動係数 (%)							
		PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFBS
超音波	Envi-Carbのみ	7	13	11	5	4	3	5	9
振とう	Envi-Carbのみ	16	13	8	5	5	3	7	6
振とう	Envi-Carb + PFC-II	14	21	20	25	23	24	23	21

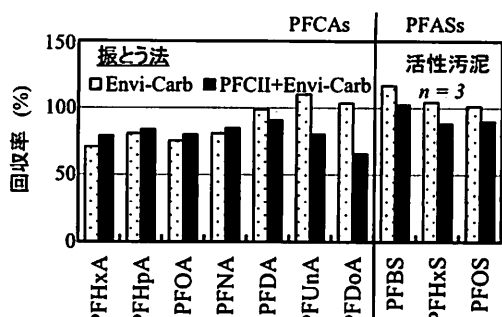


図-8 振とう抽出後、2種の前処理を行った時の回収率
(活性汚泥, $n=3$)

π 電子同士の相互作用により π 電子を多く含む芳香族化合物を強く保持するが、PFCsに存在する π 電子は電気陰性度の強いフッ素に強力に結びついているため、PFCsを保持する効能が低い¹³⁾。つまり、Envi-CarbはPFCsを捕集しにくく、芳香族の夾雑有機物質を試料中から除去できると考えられる。実際に、Envi-Carb処理をすることで試料の着色がほぼなくなった。これは、試料中のフミン質などがEnvi-Carbに捕集されたためであると推察される。

c) PFC-II処理とEnvi-Carb処理を併用した場合

振とう法による抽出液に対し、Envi-Carb処理のみの場合と、PFC-II処理とEnvi-Carb処理を組み合わせた処理を検討した結果を図-8に示す。PFC-II処理とEnvi-Carb処理を組み合わせた方法では、PFDoAの66%からPFBSの103%と、Envi-Carb処理のみの場合と比べてやや回収率が低かったことに加え、標準添加試料の測定値における変動係数はPFHxAで14%、PFOAで20%、PFOSで16%であった以外は20%を超えていた (表-4)。よって、操作が単純なEnvi-Carb処理のみの方が同等以上の結果を示した。

d) MPFCsを用いたEnvi-Carb処理の有効性の確認

MPFCs4種 (MPFHxA, MPFOA, MPFDA, MPFOS) を用いて検量線を作成した結果を表-5に示す。Envi-Carb処理をしない活性汚泥抽出液を用いた検量線では R^2 値が0.99に及ばなかったが、Envi-Carb処理を施すことで、高い R^2 値を得ることができた (MPFHxAのみ R^2 値0.988)。

表-5 活性汚泥に添加したMPFCsを用いた検量線の R^2 値

試料	R^2			
	MPFHxA	MPFOA	MPFDA	MPFOS
活性汚泥抽出液	0.984	0.956	0.939	0.961
活性汚泥抽出液 + Envi-Carb処理	0.988	0.999	0.998	0.998
40%アセトニトリル	0.999	0.999	0.999	0.999

つまり、Envi-Carb処理によってイオン化阻害を起こす夾雑物が除去できることが示された。

以上の結果から、活性汚泥中の PFCs の抽出には振とう法が 3 方法のうち最も有効であり、抽出液の前処理には Envi-Carb 処理の有効性が示され、PFCs を捕集する固相抽出 - 溶出法を施さなくても高い回収率、良好な抽出濃度そして分析の再現性が得られることが分かった。

(4) 脱水ケーキの分析方法の検討

a) PFC-II 処理をした場合

振とうおよび超音波法により得た抽出液に PFC-II 処理を加えた時の添加 PFCs の回収率を図-9 に示す。なお、PFBA および PFPeA はほとんど検出されなかった。振とう法では、いずれの PFCs も回収率が 10% 以下であったが、超音波法では PFHxS の 21% から PFDA の 56% の回収率を得た。次に、標準無添加の脱水ケーキを測定した結果を図-10 に示す。振とう法では PFNA の濃度が 23 ng/g-dry で PFCs 10 種のうち最高であったことにに対し、超音波法では PFNA を 13.7 ng/g-dry、PFUnA を 15.2 ng/g-dry 分析できた。さらに、超音波法では標準添加試料の測定値の変動係数 ($n=5$) がすべての PFCs で 20% 以下であった。この要因には、振とう法では固形の脱水ケーキからは PFCs を効果的に抽出できなかったことや、夾雑物により抽出の妨害を受けたことが考えられる。一方、超音波法では夾雑物が破壊され、PFCs の抽出や測定の妨害が低減されたことなどが考えられる。よって脱水ケーキからの抽出方法には超音波法が適していることが分かった。

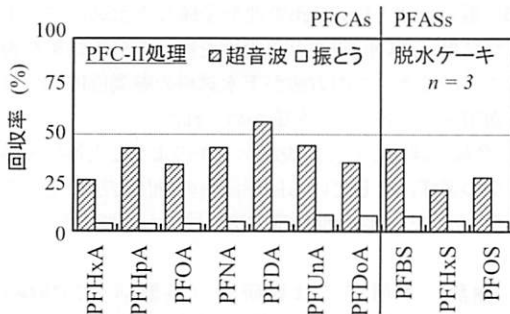


図-9 PFC-II 処理を行った時の回収率
(脱水ケーキ, $n=3$)

表-6 6つの異なる下水処理水への適用結果

ID	試料名	回収率 (%)										標準無添加試料の測定値 (ng/mL)	
		PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFBS	PFHxS	PFOS		
1	流入水①	90 0.3	101 0.2	85 4.3	82 0.6	103 0.3	113 0.3	50 0.1	103 0.2	99 0.1	105 1.7		
2	生物反応槽流出水①	84 0.2	85 0.2	72 3.3	95 0.3	89 0.2	94 0.2	91 0.1	88 0.1	94 0.1	104 0.9		
3	生物反応槽流出水②	92 0.3	96 0.2	66 5.9	96 0.4	85 0.3	94 0.3	88 0.2	95 0.2	94 0.1	111 0.9		
4	流入水②	82 0.2	101 0.2	82 4.6	108 0.4	100 0.2	108 0.2	108 0.1	110 0.1	116 0.1	126 1.1		
5	砂ろ過池流出水	90 0.2	96 0.1	78 3.5	101 0.3	96 0.2	98 0.2	96 0.1	97 0.1	99 0.1	110 0.6		
6	UV処理槽流出水	92 0.2	94 0.2	76 3.8	97 0.4	92 0.3	93 0.3	90 0.2	96 0.1	98 0.1	115 0.6		
平均		88	96	77	96	94	100	87	98	100	112		
標準偏差		4.4	6.0	6.9	8.5	6.8	8.6	19.5	7.5	8.1	7.8		
変動係数 (%)		5.0	6.3	9.0	8.8	7.3	8.6	22.3	7.7	8.2	7.0		

b) Envi-Carb 処理をした場合

超音波法を用いて得た抽出液に Envi-Carb 処理を施して得た回収率の結果を図-11 に示す。脱水ケーキでは、PFNA (78.4%)、PFHxS (71.9%)、PFOS (80.5%) を除く PFCs 7 種の回収率にあまり変化がなかった。

よって、脱水ケーキには Envi-Carb 処理では除去できない夾雑物が存在している可能性が考えられた。

(5) 見出した活性汚泥分析方法の多様な下水試料への適用

振とう法と Envi-Carb 処理による活性汚泥中の PFCs 分析方法を、6 つの下水試料に適用した結果を表-6 に示す。標準添加濃度は 20 ng/mL とした。すべての試料で PFCs 10 種のうち最高濃度だった PFOA は、測定値の平均が 4.2 ng/mL であり、標準添加量は適切な範囲内であった。回収率は PFOA の 77% から PFOS の 112% と良好であり、変動係数は PFDoA を除けば、すべて 10% 以下であった。SS 濃度が高い流入水① (4,252 mg/L) と流入水② (3,166

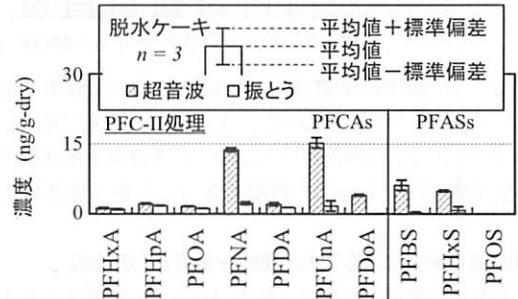


図-10 PFC-II 処理を行った時の抽出濃度
(脱水ケーキ, $n=3$)

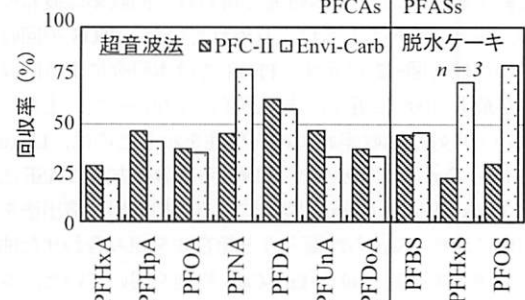


図-11 超音波抽出後、2 種の前処理を行った時の回収率
(脱水ケーキ, $n=3$)

表-7 本研究で見出した方法と先行研究の方法による回収率の比較

研究者	回収率 (%)									
	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFBS	PFHxS	PFOS
Schröder, 2003 ¹¹⁾	-	-	48	-	-	-	-	-	48	48
野添, 2007 ¹⁰⁾	-	-	119	-	-	-	-	-	119	119
Llorca <i>et al.</i> , 2011 ¹²⁾	108	102	96	99	103	99	105	65	93	98
Higgins <i>et al.</i> , 2005 ¹⁶⁾	-	-	68-74	94-102	86-90	81-91	51-55	-	32-42	77-81
Powley <i>et al.</i> , 2005 ¹³⁾	91-102	92-100	86-93	92-103	91-106	90-109	86-105	-	-	-
Yoo <i>et al.</i> , 2009 ¹⁴⁾	101-133	81-113	78-104	71-99	98-112	99-111	88-106	-	-	95-125
Zhang <i>et al.</i> , 2010 ¹⁵⁾	83-105	84-106	78-108	68-104	-	-	45-83	70-110	92-114	69-95
Sun <i>et al.</i> , 2011 ¹⁷⁾	60-90	67-85	100-116	65-75	84-96	96-108	81-97	88-104	91-97	103-111
本研究	59-83	69-92	68-82	74-87	93-105	108-112	96-111	110-123	96-112	93-109

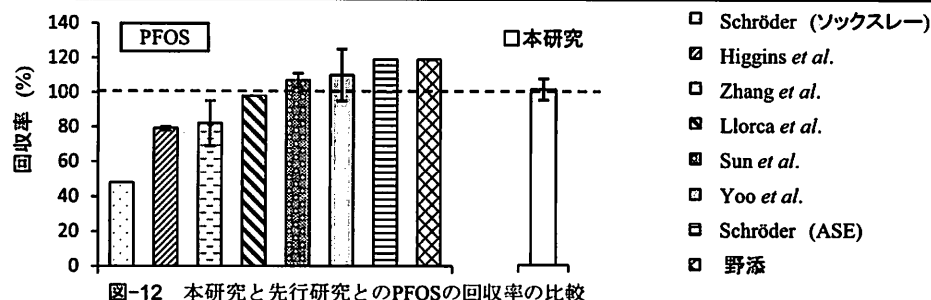


図-12 本研究と先行研究とのPFOSの回収率の比較

mg/L)の回収率はSS濃度の低い他の試料の回収率と比較しても大きな差はなかった。よって、本研究で見出した分析方法は活性汚泥だけではなく、多様な下水試料中の懸濁態PFCsの分析にも適用できることが示唆された。

(6) 既往研究による下水汚泥の分析方法との比較

本研究で選定した振とう法と Envi-Carb 処理による活性汚泥の分析方法と、既往研究の下水汚泥の分析方法の比較を表-7 に示す。本研究で得られた回収率は概ね他の方法と同等かもしくはより優れていた。PFOS の回収率の比較を図-12 に示す。PFOS では本研究による回収率が最も 100%に近く、また誤差が少なかった。また、次いで良好な回収率および再現性を示したのは、Llorca ら¹²⁾と Sun ら¹⁷⁾であった。Llorca らは分析方法に ASE 法と Oasis - WAX (Waters 製) による固相抽出 - 溶出法を用いており、Sun らは振とうと超音波を組み合わせた抽出方法と本研究と同じ Envi-Carb 処理を用いていた。本研究は、これら二つの方法よりも操作が少なく、短時間で分析を行えるという点で優れていると言える。

5. 結論

本研究では、活性汚泥と脱水ケーキを対象に、3種類の抽出方法の検討、3種類の前処理方法の検討を行い、見出した抽出・前処理方法を下水流入水、生物反応槽流出水等に適用し、回収率、変動係数、抽出濃度の確認を行った。得られた主な成果を以下に示す。

1) 振とう法により得た抽出液に Envi-Carb 処理を施すことで、活性汚泥中の PFCs の回収率が 59~123%に向上し、回収率の変動係数も 20%以内に収まった。複雑な操作および試薬を必要としないメタノール振とう法と、時間がかからず簡便な Envi-Carb 処理を用いる本方法により、良好な精度と確度をもった分析ができることが示された。

2) 脱水ケーキ中の PFCs の抽出では、超音波法が最も再現性が高かった。

3) 振とう法と Envi-Carb 処理を多様な下水試料に適用した結果、高い回収率と再現性を持った分析結果を得ることができ、この方法が下水試料の懸濁態 PFCs 分析に適用可能であることが確かめられた。

今後の課題として、脱水ケーキのような夾雑物を多量かつ多様に有している固形試料の抽出方法の更なる改善と、より適切な前処理方法の検討が必要である。

謝辞：本研究では科研費（基盤研究 20246086，22360214）ならびに関係機関の多くの方々の援助を受けた。試料の採取にあたり、京都大学大学院工学研究科の中田典秀先生、八十島誠先生、王超先生のご協力を受けたことを記し、ここに感謝の意を示します。

参考文献

- 1) Key B. D., Howell R. D. and Criddle C. S.: Fluorinated Organics in the Biosphere, *Environmental Science and Technology*, vol.31, pp.2445-2454, 1997
- 2) Olsen G. W., Burris J. M., Mandel J. H. and Zobel L. R.: Serum Perfluorooctane Sulfonate and Hepatic and Lipid Clinical Chemistry Tests in

- Fluorochemical Production Employees, *Journal of Occupational Environmental Medicine*, vol.41, pp.799-806, 1999
- 3) UNEP, United Nations Environmental Programme 2009. Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the Work of Its Fourth Meeting, UNEP, Geneva, May 4-8, 2009. (<http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/COP4/UNEP-POPS-COP4-38.English.pdf>).
 - 4) Higgins C.P., Field J.A., Criddle C.S., Luthy R.G.: Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge, *Environmental Science & Technology*, vol.39, pp.3946-3956, 2005.
 - 5) Schultz M. M., Barofsky D., Field J.: Quantitative determination of fluorinated alkyl substances in municipal wastewater by large-volume-injection LC/MS/MS, *Environmental Science & Technology*, vol.40, pp.289-295, 2006a.
 - 6) Shivakoti B.R., Tanaka S., Fujii S., Kunacheva C., Boontanon S.K., Musirat C., Seneviratne S.T. & Tanaka H.: Occurences and behavior of perfluorinated compounds (PFCs) in several wastewater treatment plants (WWTPs) in Japan and Thailand, *Environmental Monitoring*, vol.12, pp.1255-1264, 2010.
 - 7) Schultz M.M., Higgins C.P., Huset C.A., Luthy R.G., Barofsky D.F., Field J.A.: Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility, *Environmental Science & Technology*, vol.40, pp.7350-7357, 2006b.
 - 8) Kunacheva C., Tanaka S., Fujii S., Boontanon S.K., Musirat C., Wongwattana T., Shivakoti B.R.: Mass flows of perfluorinated compounds (PFCs) in central wastewater treatment plants of industrial zones in Thailand, *Chemosphere*, vol.83, pp.737-744, 2011.
 - 9) 田中周平, 藤井 滋穂, LIEN Nguyen Pham Hong, 野添 宗裕, KUNACHEVA Chinagam, 木村 功二, SHIVAKOTI Binaya : 世界 10 カ国 21 都市の水環境における PFOS・PFOA 汚染の現況, 水環境学会誌, vol.31, No.11, pp. 665-670, 2008.
 - 10) 野添宗裕: 水環境中におけるペルフルオロ化合物類の分析手法と存在実態に関する研究, 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻修士論文, 2007
 - 11) Schröder H.F., Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurized liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents, *Journal of Chromatography A*, vol.1020, pp.131-151, 2003.
 - 12) Llorca M., Farré M., Picó Y., Barceló D.: Analysis of perfluorinated compounds in sewage sludge by pressurized solvent extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, (in press), 2011
 - 13) Powley C.R., George S.W., Ryan T.W., Buck R.C.: Matrix effect-free analytical methods for determination of perfluorinated carboxylic acids in environmental matrices, *Analytical Chemistry*, vol.77, pp.6353-6358, 2005.
 - 14) Yoo H., Washington J.W., Jenkins T.M., Libelo E.L.: Analysis of perfluorinated chemicals in sludge: method development and initial results, *Journal of Chromatography A*, vol.1216, pp.7831-7839, 2009.
 - 15) Zhang, T., Sun, H.W., Gerecke, A.C., Kannan, K., Müller, C.E., Alder, A.C.: Comparison of two extraction methods for the analysis of per- and polyfluorinated chemicals in digested sewage sludge, *Journal of Chromatography A*, vol.1217, pp.5026-5034, 2010.
 - 16) Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G.: Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge, *Environmental Science & Technology*, vol.39, pp.3946-3956, 2005.
 - 17) Sun, H., Gerecke, A.C., Giger, W., Alder A.C.: Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland, *Environmental Pollution*, vol.159, pp.654-662, 2011.

(2011.5.30 受付)

Development of Simple Extraction and Pre-treatment Methods for Particulate-Phase Perfluorinated Compounds in Wastewater Samples

Yuji SUZUKI¹, Shuhei TANAKA¹, Shigeo FUJII¹ and Chinagam KUNACHEVA¹

¹Graduate School of Global Environmental Studies, Kyoto University

Main objective of this study was to examine a simple and effective analytical method for particulate-phase perfluorinated compounds (PFCs) in wastewater samples. Activated sludge and dehydrated cake samples were used for evaluating the effectiveness of accelerated solvent extraction, solvent-shake extraction, and sonication extraction for analysis of twelve PFCs. In addition, PFC-II cartridge and Envi-Carb cartridge were tested to avoid matrix effects. As a result; 1) Methanol-shaking followed by Envi-Carb treatment provided the best recovery (59-123%) and relative standard deviation (less than 20%). 2) In comparison with previous studies, the developed method was simple and time-saving as well as showing high accuracy and precision. 3) Six wastewater samples analyzed by this method showed high recovery (77-112%) indicating that this method can be applied to various type of wastewater samples.