

の場合、ピレンは塩素処理中、次亜塩素酸/次亜塩素酸イオン以外の物質によっても分解していること、この物質との反応に対してピレンとピレン分解生成物とは競合関係にあること、ピレンの分解反応はラジカル種が関与している可能性があることが示された。

2) ピレンの塩素反応生成物について

ピレンの塩素処理 48 時間後の LC/MS の TIC クロマトグラムを図 5 に示す。48 時間後において、ピレンはほとんどが分解しており、一方で、ピレンの分解生成物のピークが認められた。そのうちピーク面積が比較的大きかった 2 つのピーク A および B のマススペクトルをそれぞれ図 6 および 7 に示す。ピーク A についてみると、フラグメンター電圧 180 V で m/z 233 のピークが認められる。フラグメンター電圧が低い場合、目的物質の分子量あるいはそれプラス 1 の質量数が認められること、および Oyrer らの報告¹⁾を考慮すると、ピーク A はピレンジオンであると推測された。同様にピーク

B は、フラグメンター電圧 180 V で m/z 237 が見られたことからクロロピレンであると推測された。また、図 8 にピレンおよびピーク A、B の経時変化を示す (ピーク A、B については内部標準とのエリア比)。ピーク A および B は経時的に増加していることがわかる。以上の結果より、塩素処理によるピレンの分解は塩素化と酸化の両面から進み、クロロピレンとピレンジオンが主な反応生成物であることが明らかとなった。

E. 結論

本研究により、ピレンの塩素反応性は、塩素に対する反応次数が 1 次であることがわかった。また、塩素濃度が同じ場合、ピレン初期濃度が低い場合により速やかに分解するが、一方、ある初期濃度の場合、分解速度はピレンの分解に伴って低下することが明らかとなった。ピレンは、塩素処理において塩素化と酸化の両方から反応が進み、その主な反応生成物はクロロピレンとピレンジオンであることが示された。

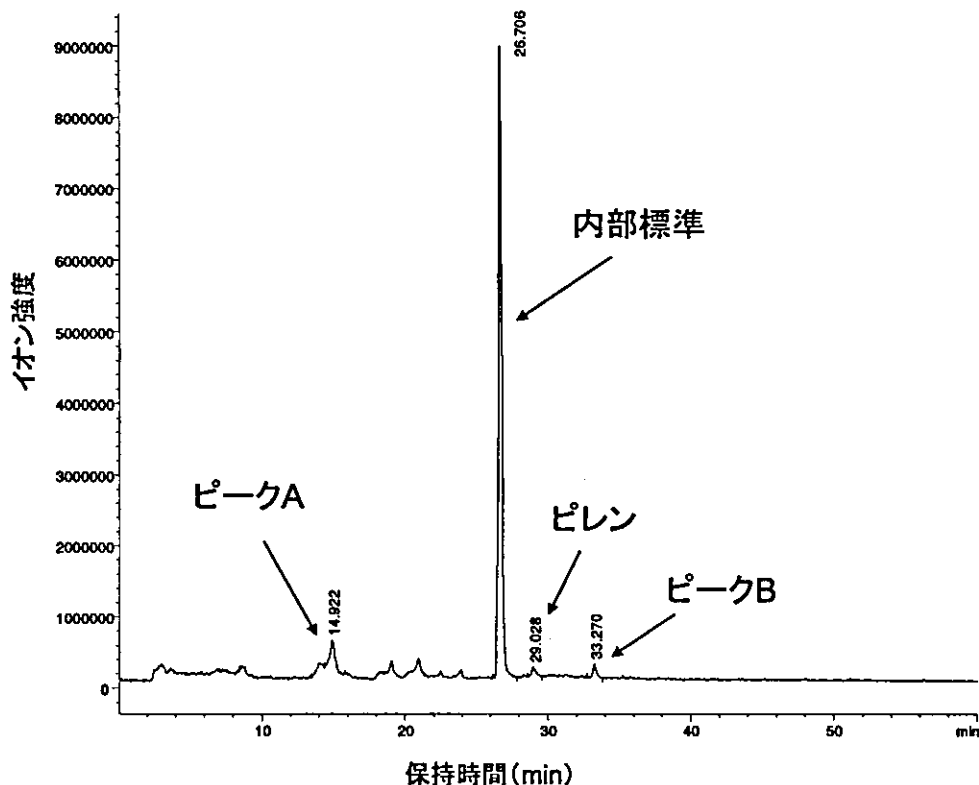


図 5 48 時間処理後の TIC クロマトグラム (フラグメンター電圧 : 270 V)

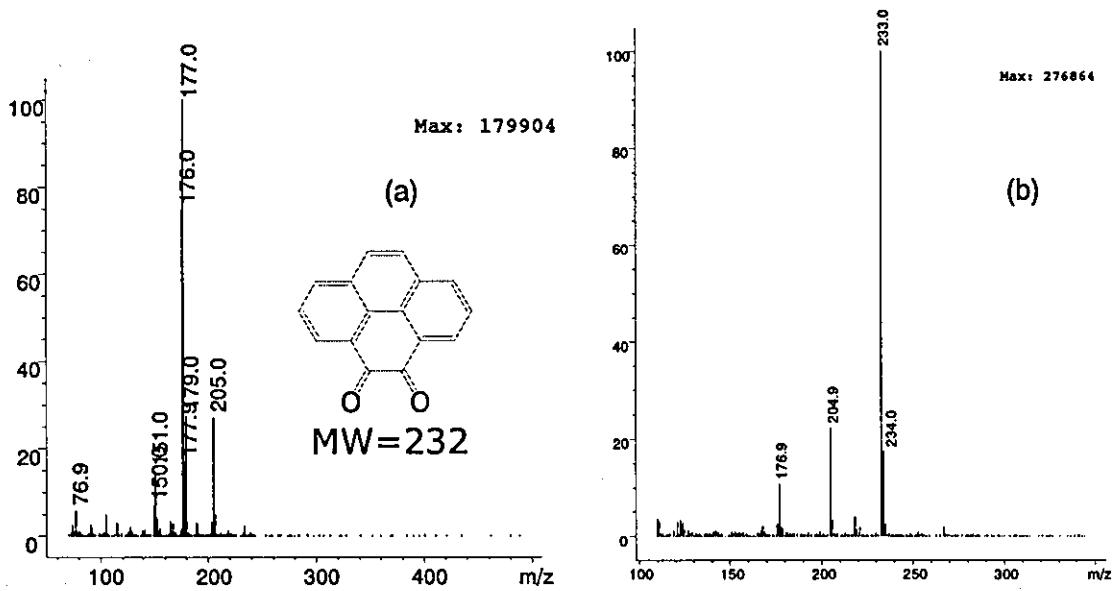


図6 ピークAのマスペクトル (フラグメンター電圧: (a) 270 V, (b) 180 V)

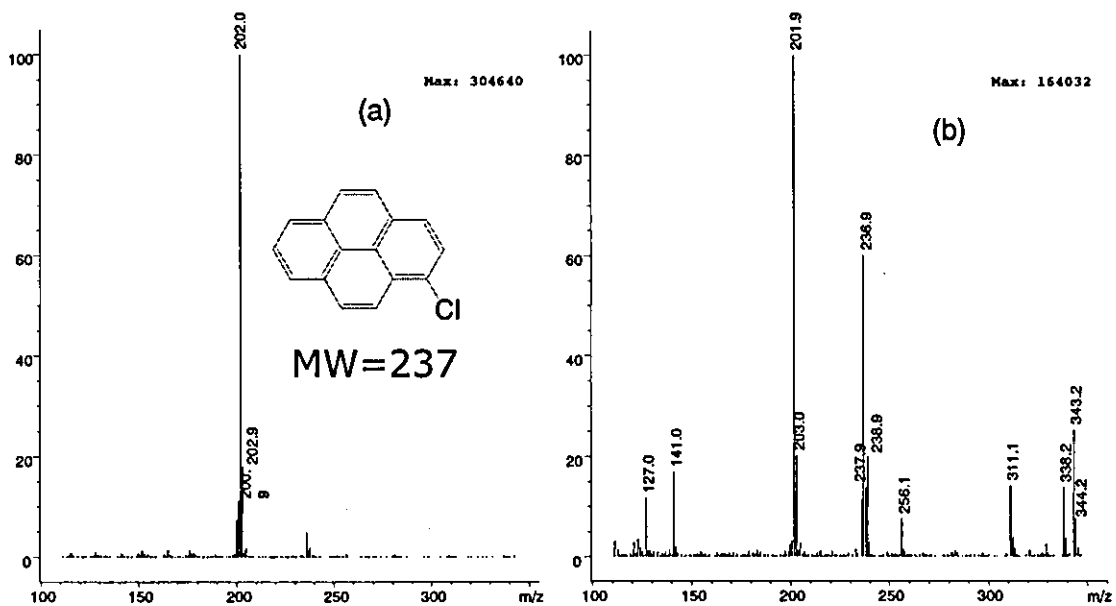


図7 ピークBのマスペクトル (フラグメンター電圧: (a) 270 V, (b) 180 V)

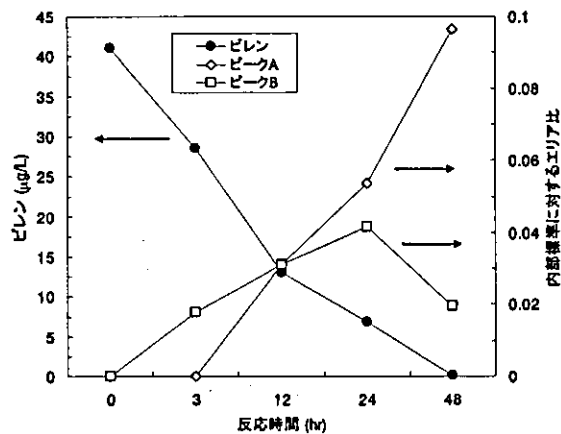


図8 ピレンおよび反応生成物の経時変化

参考文献

1) Oyler, A. R., Liukkonen R. J.,
Lukasewycz M. K., Cox, D. A., Peake D. A.
and Carlson R. M., *Environ. Health
Perspectives* 1982, 46, 73-86.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 小坂浩司, 吉田伸江, 国包章一: ピレン
の塩素反応性および反応生成物に関する
研究, 第 39 回日本水環境学会年会講演集,
p.534, 千葉, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ピレンと塩素との反応生成物の
構造同定及びそのAhR活性評価

主任研究者 国包章一
研究協力者 相澤貴子、胡 建英、金 暁輝

ピレンと塩素との反応生成物の構造同定及びその AhR 活性評価

国立保健医療科学院 国包章一、横浜市水道局 相澤貴子、
北京大学環境学院 胡建英 金曉輝

要旨

モノブromo-pyrene の構造、ジブromo-pyrene 異性体を HPLC 法で分取して、NMR で構造を決定した。モノブromo-pyrene は 1-Br-pyrene で、ジブromo-pyrene は 1,3-, 1,6-, 1,8-Br-pyrene の三種類の異性体であった。量子力学的な手法を用いて、生成物の構造を推測した結果と NMR 構造解析結果から、pyrene と塩素との反応はエネルギー支配的な反応であることがわかった。その結果に基づいて、他の PAHs 塩素反応副生成物の予測に貢献できると考えられた。また、HPLC で 1-Cl-pyrene とジクロロ pyrene も分取した。四種類の単独副生成物の AhR 活性を酵母株 YCM3 により測定したところ、pyrene の EC50 は 5632 nM であるのに対して、1-Br-pyrene、1-Cl-pyrene、ジブromo-pyrene (1,6-, 1,8-Br-pyrene 混合物)、ジクロロ-pyrene (1,6-, 1,8-Cl-pyrene 混合物) の EC50 はそれぞれ 3089、1942、147.3 および 597.2 nM と活性が高いことが示された。

1. はじめに

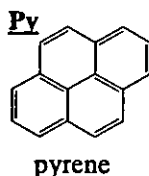
PAHs は環境中に広く存在する発ガン性、変異原性を有する化学物質であり、近年は特に内分泌攪乱物質としても注目されている。水道水中の PAHs の残留や塩素処理による副生成物の生成及びその変異原性などが古く研究されてきた。しかし、副生成物の構造決定や内分泌攪乱作用活性強度については不明な点も多い。

昨年度は、GC-MS を用いて、PAHs 汚染のマーカとしても使われている pyrene の塩素分解生成物を同定し、AhR と Arnt を組み込んだ酵母株 YCM3 を用いて、生成物の AhR 活性を調べた。その結果、臭化物イオンが存在する場合、反応速度が大きくなり、モノクロロ pyrene、モノブromo pyrene、ジクロロ pyrene、ジブromo pyrene 等が生成されることが明らかになった。しかし、ジブromoとジクロロ pyrene については、異性体が存在し、構造決定には GC-MS のみでは困難であった。

今年度は、昨年度の結果を踏まえて、ジクロロ pyrene とジブromo pyrene を HPLC で分取精製した後、更に重結晶により異性体を分離させて、NMR 方法で構造決定を行った。また、分取した 1-Cl-pyrene、1-Br-pyrene、di-Cl-pyrene、di-Br-pyrene を用いて、単独の副生成物の AhR 活性を測定した。

2. 実験方法

2.1 対象 PAHs



2.2 反応経路に関する計算方法

Pyrene と次亜塩素酸との反応解析に必要な部分電荷、HOMO 軌道密度の計算には、半経験分子軌道法プログラムの CAChe MOPAC(CAChe Scientific 社)の PM3 ハミルトニアンを用いた。

2.3 HPLC 法により副生成物の分取

臭素化副生成物を分取する場合には、50 lの超純水に5mgのpyrene (約100 μ g/l) を溶解させ、臭化物イオン (1.5mg/l) とNaClO (約2mg/l) を添加し、反応液のpHを3に調整した後、25°Cの反応温度で24時間反応させた。塩素化副生成物を分取する場合には、臭素化副生成物の場合と同様の条件で実験を行ったが、このとき臭化物イオンは添加しなかった。反応液の残留塩素は、塩素処理後にNa₂S₂O₃で消去した。反応液は、7mlのCH₂Cl₂、CH₃OH、5mlの水でコンデイショニングしたC18固相カートリッジに通水した後、8mlのCH₂Cl₂で抽出した。窒素バージで抽出液の溶媒を完全に除去し、1mlのCH₃CNで転溶して、HPLCで分取した。分取にはC18カラム(Zorbax-ODS、4.6 mm I.D. × 250 mm、粒径5mm、Agilent、USA)を用いた。溶離液はアセトリル/水を用いた。このとき、アセトリルの割合を0分の70%から10分後に100%に変え、その後15分保持するグラディエント条件とした。試料の注入量は500 μ lで、流速は1.5ml/min、UV検出器の波長は333 nmに設定して分取を行った。

2.4 NMRで同定

¹H NMR と H-H COSY スペクトルは Bruker ARX400 (¹H、400 MHz、Switzerland)で測定した。溶媒は Deuteriochloroform を用いた。

2.5 GC/MS 分析条件

反応生成物の定量には GC/MS (Hewlett Packard 5971MSD ; HP-5MS (30mx0.25mmx0.25 μ m)) を使用した。

2.6 AhR 活性の測定

本研究では Miller らが開発した酵母法により、対象 PAHs の AhR 結合活性を測定した。酵母 YCM3 株に人 AhR と ARNT 遺伝子を染色体 III に融合し、AhR と ARNT が galactose 調節 GAL1、10 プロモータで表し、AhR/ARNT 仲介の転写活性が β -galactosidase 活性で評価される方法である。

測定手順は基本的に文献と同じである。YCM3 酵母が 30°C で tryptophan 除外した合成グルコース培地で一晩培養した。200 μ l の 2% galactose 培地に 50 μ l の前培地液を加えた後に、2.5 μ l の PAHs の DMSO 溶液を添加して、30°C で 8 時間培養した。150 μ l の培養液を 96 穴のマイクロプレートに移し、プレートリーダーで 595nm の菌液の濁度を測定する。残りの培養液 100 μ l を 15000rpm で 5 分間遠心分離を行った後、上清を捨て、1mg/ml Zymolyase を含む Z-バッファ 200 μ l を加え、ボルテックスした後、30°C で 20 分静置する。40 μ l の 4mg/ml ONPG 溶液を加え、ボルテックスした後、30°C で反応を開始する。30 分後、100 μ l の 1M Na₂CO₃ を加え、反応を停止させる。15000rpm、5 分間遠心した後、上清 150 μ l をプレートリーダーで 415nm と 570nm の吸光度を測定する。

Galactosidase 活性は下記の式に基づいて得られた。

$$\text{Unit}=1000(A_{415}-1.75A_{570})/(t^*v^*A_{595})$$

3. 実験結果および考察

3.1 分取

図-1は臭化物イオンを添加した塩素反応系でのpyreneの反応液のGC-MSクロマトグラムである。図からわかるように、モノプロモpyreneとジプロモpyreneの生成量が最も多い。ジプロモpyreneに相当するピークは二つあったため、今まで発表された文献情報で、相応の構造を判断することはできなかった。そこで、ジプロモpyreneをHPLCで分取して、構造解析を試みた。

臭化物イオンが共存する場合のモノプロモ-pyrene、ジプロモpyreneの分取におけるHPLCクロマトグラムを図-2に示す。図から1-Br-pyrene、di-Br-pyreneとその他の副生成物とは明らかによく分離されていることがわかる。保持時間は16min、21.5minのピークを分取し、GC-MS法で確認したところ、それぞれ1-Br-pyrene、di-Br-pyreneであり、di-Br-pyreneはGC-MSクロマトグラム(図-1)における保持時間24.77分に現れたピークに相当する。

臭化物イオンが共存しない塩素反応液を用いて上記と同様な方法で1-Cl-pyrene、di-Cl-pyreneも分取した。

3.2 NMR法による構造決定

上記の手順で分取したモノプロモpyrene、ジプロモpyreneの構造解析をNMR法により行った。モノプロモpyreneのNMRマススペクトルは市販標準品1-Br-pyreneのと同様であることから構造を決定した(NMR: 7.99 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 8.01 (1H, d, $J=9.2$ Hz), 8.03 (1H, t, $J=7.4$ Hz), 8.075 (1H, d, $J=9.2$ Hz), 8.15 (1H, d, $J=9.2$ Hz) 8.20 (1H, d, $J=7.4$ Hz), 8.21 (1H, d, $J=7.4$ Hz), 8.22(1H, d, $J=7.5$ Hz), 8.42 (1H, d, $J=9.2$ Hz))。

分取したジプロモpyrene構造をNMRで測定したところ、NMRスペクトルでは構造決定困難であった。そのため、重結晶によりHPLCで分取したジプロモpyreneを二種類のジプロモpyreneに分離することを成功した。分離したジプロモpyreneをNMRで測定した結果を表-1にまとめた。¹H NMR, COSYの結果から、HPLCで分離したのは等量の1,6-, 1,8-di-Br-pyreneであることを証明できた。臭素化反応は塩素化反応と類似していることから、図-1におけるpeak Hは1,3-di-Br-pyreneであると推定した。この三種類のジプロモpyreneのGC-MS感度が同様と仮定して、その面積値から1,6-di-Br-pyrene、1,8-di-Br-pyreneおよび1,3-di-Br-pyreneの三種類の濃度比は1: 1: 0.1であることが明らかになった。

3.3 反応メカニズム

上記のように構造を決定してから、量子力学的な手法を駆使して、PAHsの塩素化反応メカニズムを検討した。化学反応には電荷支配反応とエネルギー支配反応とがある。そこで、図-3、図-4にpyrene分子の部分電荷と各原子のHOMO密度を示した。pyreneと塩素との反応が電荷支配反応である場合、pyreneとHOClとの反応ではHOCl分子における正電荷を持つ塩素原子は優先的にpyrene分子上における電荷がより負である炭素原子に攻撃し、塩素付加反応が起こることが考える。すなわち、最も優先的に攻撃する原子は部分電荷が-0.101であるC原子で、2-モノクロロpyreneが生成される。生成された2-モノクロロpyreneがさらに次亜塩素酸と反応する。その反応点を定める

ために、2-ブロモpyrene分子の部分電荷も計算した (図-4 (b))。この図から分かるように、反応性をもっとも高いのは部分電荷が-0.101である炭素原子で、2、7-ジクロロpyreneをもっとも優先的に生成される。続いて攻撃しやすい反応点は分電荷が-0.0901の炭素原子で、1,2-ジクロロpyreneも生成される。しかし、上記予測結果はNMR測定結果と異なった。

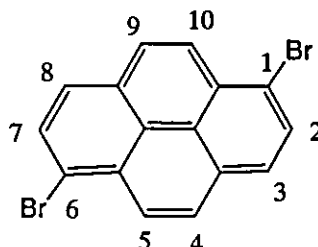
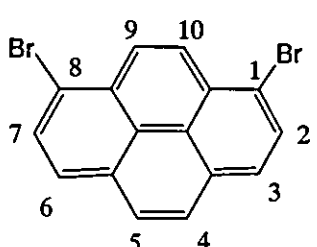
Pyreneと塩素との反応はエネルギー支配反応である可能性があることから、pyrene分子のHOMO密度も計算し、結果を図-4に示した。図-4からわかるように、エネルギー的に有利な反応点はHOMO密度高いC原子で、1-Br-pyreneが生成されると推測できる。生成された1-モノブロモpyreneがさらに次亜塩素酸と反応する。その反応点を決めるために、1-ブロモpyrene分子の部分電荷も計算した(図-4 (b))。この図からわかるように、反応性をもっとも高いのはHOMO密度の高いC6またC8で、その結果1,6-ジブロモpyrene、1,8-ブロモpyreneが最も優先的に生成される。その推測結果は今回のNMR測定結果とは類似しているため、pyreneの塩素反応はエネルギー支配反応であることが明らかになった。このメカニズムに基づいて、今後PAHsの塩素反応副生成物や反応経路を予測することができると思われる。

以上の研究からpyreneの塩素反応経路を提案できた (図-5)。

3.3 副生成物の AhR 活性評価

最後に、酵母 YCM3 株を用いて、分取した四種類である 1-Cl-pyrene、1-Br-pyrene、di-Cl-pyrene (1,6-di-Cl-pyrene と 1,8-Cl-pyrene の混合物)および di-Br-pyrene (1,6-di-Br-pyrene と 1,8-di-Br-pyrene の混合物)の副生成物の AhR 活性を測定した (図-6)。1-Br-pyrene と 1-Cl-pyrene の AhR 活性は pyrene と類似しており、EC50 はそれぞれ 3089、1942 および 5632 nM であった。一方、ジブロモ pyrene とジクロロ pyrene の場合、 β -galactosidase 活性の最大値は比較的に低く、その活性はより低い濃度範囲で表れていた。すなわち、ジブロモ pyrene とジクロロ pyrene の EC50 値はそれぞれ 147.3 および 597.2nM で、pyrene よりはるかに活性が強かった。

表-1 1,6- and 1,8-di-Br-pyrene の NMR 分析結果(CDCl₃)

					
¹ H chemical shifts		Multiplicity ^{a)} (coupling constants)	¹ H chemical shifts		Multiplicity ^{b)} (coupling constants)
1	-	-	1	-	-
2 & 7	8.45	d, J = 9.1	2 & 7	8.25	d, J = 8.0
3 & 8	8.05	d, J = 9.1	3 & 6	8.04	d, J = 8.0
4 & 9	8.11	d, J = 8.1	4 & 5	8.02	s,
5 & 10	8.26	d, J = 8.1	8	-	-
6	-	-	9 & 10	8.50	s,

a)s: singlet; d: doublet

b)¹H-¹H coupling constants (Hz)

isolated compound ; MS *m/z*: 358 (M⁺), 360 (M⁺+2), 362 (M⁺+4)

¹H-NMR (CDCl₃) □:8.51(s), 8.46 (d), 8.27 (d), 8.26 (d), 8.11 (d), 8.05 (d), 8.035 (d), 8.03(s)

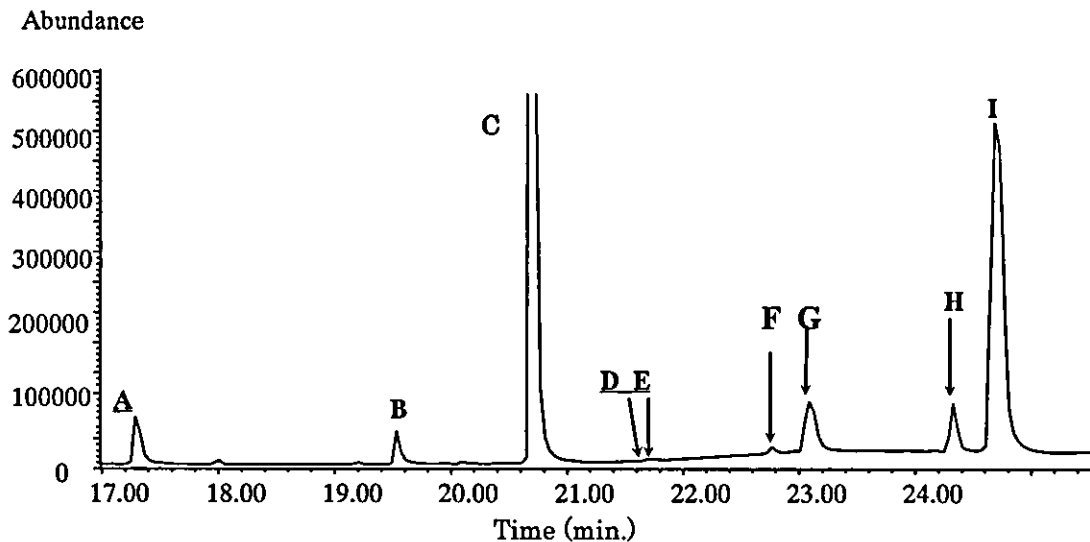


図-1 臭化物イオンが共存した塩素反応系における pyrene の塩素反応液の GC-MS クロマトグラム (臭化物イオン濃度 : 1mg/l ; 塩素反応時間: 41h; pH: 7.22; A: pyrene; B: monochloro-pyrene; C: monobromo-pyrene; D: di-chloro-pyrene; E: di-chloro-pyrene; F: monobromo-monochloro-pyrene; G: monobromo-monochloro-pyrene; H: di-bromo-pyrene; I: di-bromo-pyrene.)

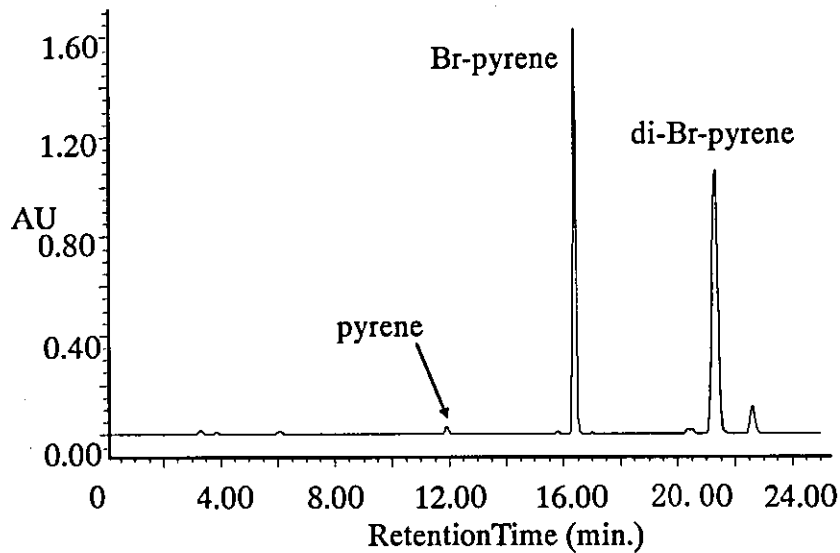


図-2 di-Br-pyrene、Br-pyrene を分取する際の HPLC クロマトグラム

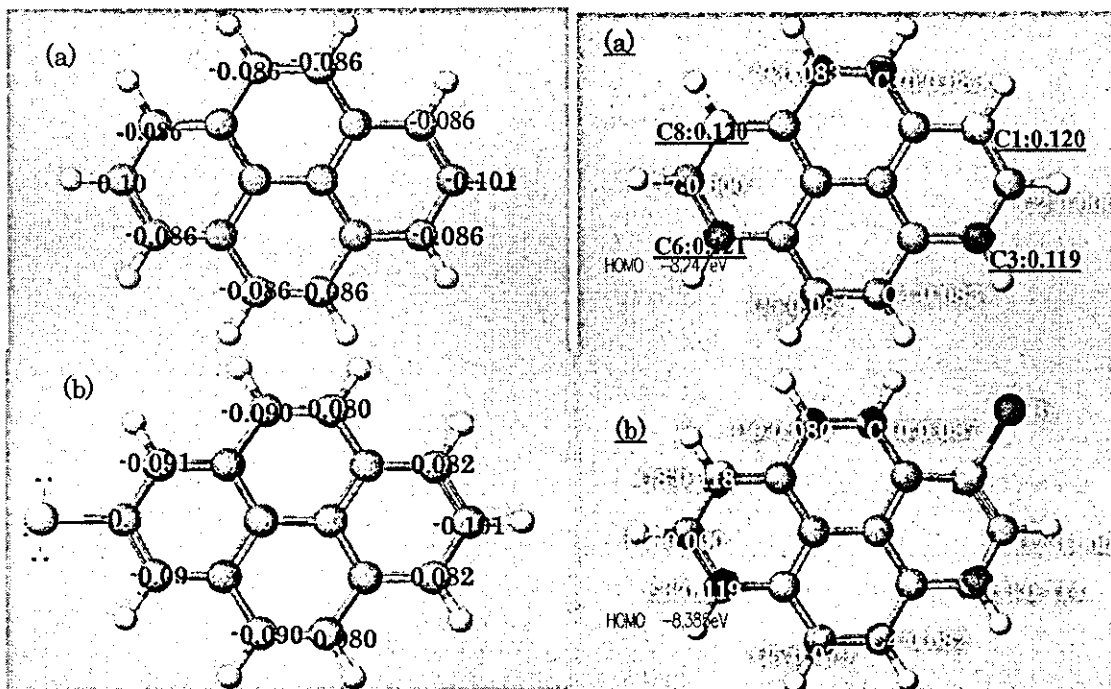


図-3 pyrene と 2-Br-pyrene 分子の部分電荷. (a)pyrene 分子; (b)2-Br-pyrene 分子の部分電荷

図-4 pyrene、1-Br-pyrene HOMO (highest occupied molecular orbit) 密度 (a) pyrene; (b) 1-Br-pyrene.

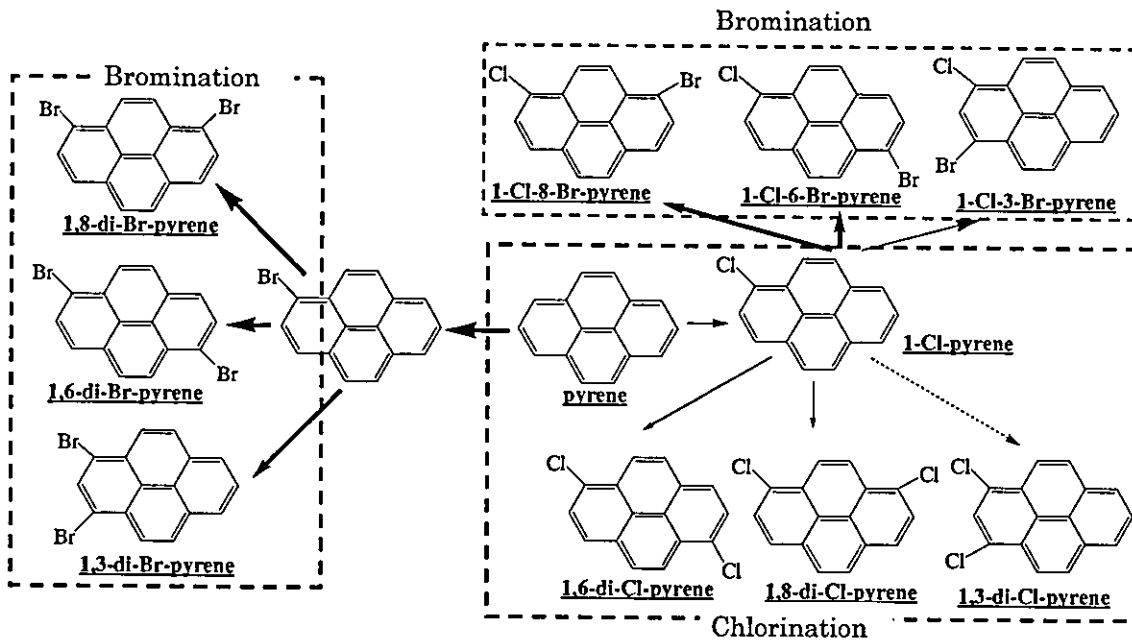


図-5 pyrene の塩素反応における反応経路

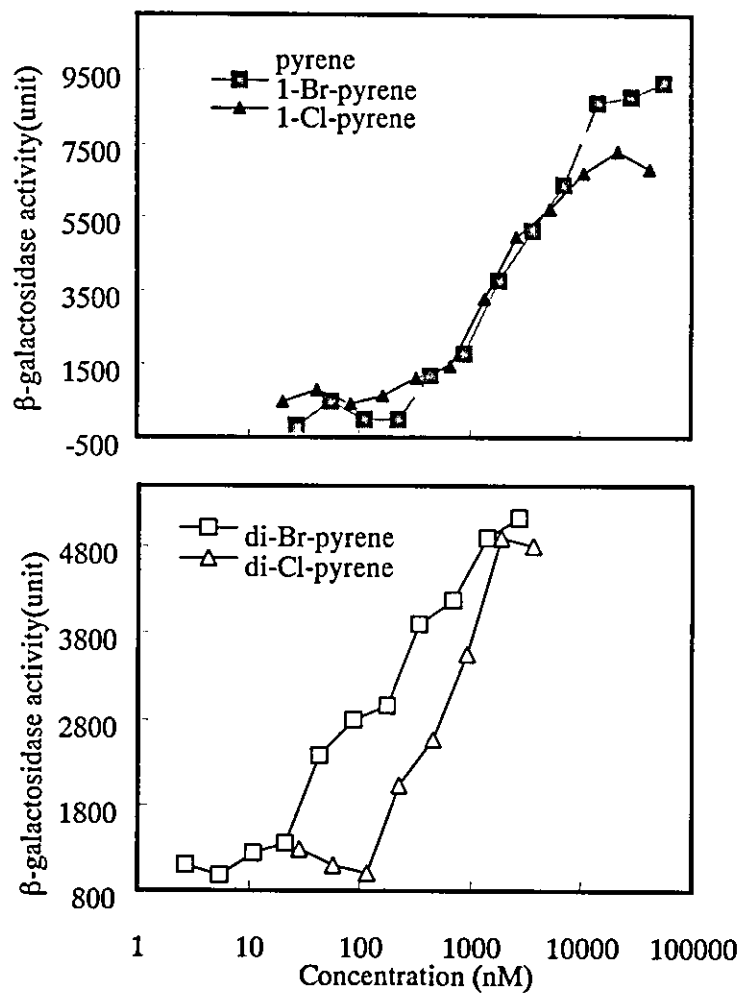


図-6 1-Br-pyrene, 1-Cl-pyrene, di-Br-pyrene, di-Cl-pyrene の用量-反応曲線

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- 1) Thaveemaitree Y, Nakajima F, Furumai H and Kunikane S(2004) Relationship between di-(2-ethylhexyl) phthalate concentration and chemical structure of organic matter on solids in drinking water treatment processes. *Water Science & Technology: Water Supply*, Vol.4, No.5-6, pp.321-333.
- 2) 伊藤禎彦(2005) 水道水のエストロゲン様作用の構造、水、Vol.47-1 (No.666), pp.17-33.

2. 学会発表

- 1) Thaveemaitree Y, Nakajima F, Furumai H and Kunikane S(2005) DEHP adsorption isotherm on various solids generated in drinking water treatment process, *Proceedings of 1st IWA-ASPIRE Conference*(発表予定).
- 2) Thaveemaitree Y, Nakajima F, Furumai H and Kunikane S(2005) Adsorption of di-(2-ethylhexyl) phthalate on coagulated floc in drinking water treatment process. 第14回環境化学討論会講演要旨集(発表予定).
- 3) Thaveemaitree Y, Nakajima F, Furumai H and Kunikane S(2004) Relationship between di-(2-ethylhexyl) phthalate concentration and chemical structure of organic matter on solids in drinking water treatment processes. *Proceedings of 4th IWA World Water Congress*(Paper ID134491 in CD-ROM).
- 4) 中島典之、Thaveemaitree Y、古米弘明、国包章一(2004) 浄水汚泥、スラム等の熱分解GC/MSによる有機物組成解析結果とDEHP含量との関係、第55回全国水道研究発表会講演集、pp.606-607.
- 5) 竹田 誠、宮谷伸之、大野浩一、亀井 翼、眞柄泰基、田畑 彰久(2004) 酵母とヒメダカを用いた2種のバイオアッセイにおける化学物質のエストロゲン様作用の比較、第38回日本水環境学会年会講演集.
- 6) 伊藤和徳、竹田 誠、大野浩一、亀井 翼、眞柄泰基(2004) 浄水処理におけるエストロゲン様活性制御のための塩素処理条件の検討、第38回日本水環境学会年会講演集.
- 7) 河合富貴子、大野浩一、亀井 翼、眞柄泰基(2004) 酵母Two-hybrid法を用いた環境水のエストロゲン様活性評価における妨害作用低減の検討、第38回日本水環境学会年会講演集.
- 8) 竹田 誠、栗原沙織、河合富貴子、大野浩一、亀井 翼、眞柄泰基(2004) 浄水汚泥のエストロゲン様作用に関する研究、第55回全国水道研究発表会講演集.
- 9) 宮谷伸之、竹田 誠、大野浩一、亀井 翼、河合富貴子、田畑彰久、眞柄泰基(2004) ヒメダカピテロジェニンアッセイによる環境水のエストロゲン様作用評価に関する研究、第10回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会講演集.
- 10) 宮谷伸之、竹田 誠、大野浩一、亀井 翼、眞柄泰基(2005) ヒメダカピテロジェニンを指標とした環境水評価における共存物質の影響、第39回日本水環境学会年会講演集.

- 11) 平井友希子、竹田 誠、大野浩一、亀井 翼、眞柄泰基(2005) 酵母Two-Hybrid法を用いた環境水のエストロゲン様作用評価における妨害作用および改良試験法の検討、第39回日本水環境学会年会講演集。
- 12) Itoh S, Yoshimura Y, Okada T and Tsujimura Y(2004) Detection of estrogenic effect formation potential in chlorinated drinking water, 2nd IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Treatment Technologies, Prague, Czech Republic, 1-4June, 2004, pp.60-62.
- 13)伊藤禎彦、吉村友希、岡田朋之、辻村泰聡(2004) 水道水のエストロゲン様作用の構造、環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集、p.119.
- 14) 西村哲治、久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、徳永裕司、安藤正典(2004) 浄水処理場汚泥のエストロゲン様活性、第10回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会講演集、pp.79-80.
- 15) 西村哲治、久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、徳永裕司(2004) 浄水処理工程におけるエストロゲン様活性、環境ホルモン学会第7回研究発表会講演集。
- 16) 小坂浩司、国包章一、米沢龍夫(2004) 浄水処理工程におけるフタル酸エステル類の実態調査、第55回全国水道研究発表会講演集、pp.348-349.
- 17) 小坂浩司、中島典之、国包章一、米沢龍夫(2005) 浄水プロセスにおけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの挙動、第56回全国水道研究発表会講演集(発表予定).
- 18) Kosaka K, Kunikane S and Yonezawa T(2005) Fate of phthalate esters in water treatment process. 1st IWA-ASPIRE, Singapore(発表予定).
- 19) 小坂浩司、吉田伸江、国包章一(2005) ピレンの塩素反応性および反応生成物に関する研究、第39回日本水環境学会年会講演集、p.534.

研究成果の刊行物・別刷

Relationship between di-(2-ethylhexyl) phthalate concentration and chemical structure of organic matter on solids in drinking water treatment processes

Y. Thaveemaitree*, F. Nakajima*, H. Furumai* and S. Kunikane******

* Department of Urban Engineering, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan (E-mail: yongyodt@env.t.u-tokyo.ac.jp; nakajima@env.t.u-tokyo.ac.jp; furumai@env.t.u-tokyo.ac.jp)

** Research Center for Water Environment Technology (RECWET), School of Engineering, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan

*** Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8638, Japan (E-mail: kunikane@niph.go.jp)

Abstract Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), regarded as a toxic substance, is widely used and abundantly contaminated in environments. Via contamination of freshwater, DEHP can enter into drinking water treatment and be adsorbed on solid particles. This study was aimed at understanding the concentration phenomenon of DEHP in drinking water treatment process, focusing on the relationship between DEHP concentration and characteristics of organic matter on the solids formed in the processes as scum, suspended solid and sludge. Solid samples were collected from five drinking water treatment processes in Japan and analyzed by pyrolysis GC/MS. The solids were categorized by the sampling locations, solid types and fragment composition. The specificity of the pyrolysis fragments in each group was summarized into a matrix. When compared with concentration of DEHP and characteristics of organic matter, a solid specifically containing many specific aliphatic fragments contained significantly high concentration of DEHP.

Keywords Di-(2-ethylhexyl) phthalate; drinking water treatment; pyrolysis GC/MS; scum; sludge

Introduction

Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) has been widely used as plasticizer and reported to be present abundantly in environments (Tan, 1995; Bauer and Hermann, 1997; Vitali *et al.*, 1997). Although DEHP has been regarded as a substance of low acute toxicity, it has been reported to be carcinogenic when exposed repeatedly at low dose (DeFoe *et al.*, 1990; Cimini *et al.*, 1994; Arcadi *et al.*, 1998). Because of its hydrophobic property, DEHP also enters into the environment, associating with dust particles in the air and suspended/settled particles in water. The concentration of DEHP was found in the range 0.1–100 µg/L in surface freshwater (Vitali *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998; Fromme *et al.*, 2002).

Via contamination in freshwater, DEHP can enter into drinking water treatment processes. From the surveying data (shown in Materials and Methods), high concentrations of DEHP were detected in solids generated in several drinking water treatments in Japan, even when the concentrations of DEHP in raw water and treated water were lower than the detection limit. The DEHP accumulation in the retained solids in the processes may have a possible risk of accidental DEHP contamination into the distributed water in a sense, and from another point of view, this phenomenon may work as a natural removal of micro-pollutants from water in the process. Understanding the mechanism of the DEHP accumulation phenomenon in drinking water treatment plant would be important in risk control. Several types of solids are produced in drinking water treatment process, in forms of sludge, suspended solid, and scum. Characteristics of the solids should change due to raw water

source, chemicals added for coagulation, flocculation, chlorination, etc., and process operation. In addition, natural organic matter (NOM) in source water may attach/adsorb on the solids and change the characters of the solid surfaces. Adsorption of DEHP might be controlled by (1) properties of inorganic solids in raw water, (2) characters of organic matter associated with solid particles, (3) complex matrix of coagulated flocs, and (4) gas-liquid interface such as bubble formed due to water pressure change in the processes. This study focused mainly on the second hypothesis, organic matter in different types of solids generated in drinking water treatment processes. To extract the character of organic matter, we use pyrolysis GC/MS technique, which reveals composition of the fragments arising from thermal degradation of complex organic molecules. The compositional variations between the organic matters are compared with concentration of DEHP on solid particles.

Materials and methods

Sample collection and DEHP concentration in solids

Samples were collected as mixed liquor of solids and water in pre-cleaned transparent glass bottles at five drinking water treatment plants in Japan in January and February, 2003. All the treatment processes are basically composed of coagulation, flocculation, sedimentation, rapid sand filtration and disinfection. The collected solid samples were classified into three types (floating (scum), settled (sludge), and suspended solids) and solid in backwash water of filtration unit was considered as suspended solid. DEHP concentration was determined originally as the concentration in mixed liquor in units of mg/m^3 . In Table 1, the concentrations are given as content in solid in the unit of mg/kg , assuming that all DEHP in mixed liquor was associated with solids. Ignition loss in the unit of percentage of volatile solid (%VS) is also shown in Table 1.

Sample preparation and pyrolysis-GC/MS characterization

The solids in the mixed liquor samples were separated from the water by GF/F (Whatman) to avoid any further transformation during storage in a freezer and were analyzed within one week after collection. The solids were dried in a freeze-dryer to obtain dry solid samples for pyrolysis GC/MS analysis. The pyrolysis GC/MS consisted of a micro furnace pyrolyzer (PY-2010D, Frontier Lab. Co., Japan), GC (Shimadzu GC-17A) and MS (Shimadzu QP 5000) connected with online operation. Approximate 1–2 mg of homogenized and finely ground freeze-dried sample was inserted into the pyrolyzer (preheated to 600°C). After pyrolysis in the micro furnace, the pyrolysis products were flushed with helium gas to a fused silica capillary column (DB-WAX (30 m long \times 0.25 mm i.d. and 0.25 μm film thickness), J&W Scientific Inc.). The column temperature was programmed for heating at $3^\circ\text{C}/\text{min}$ from 40 to 220°C , with initial and final holds of 5 and 20 min, respectively. The MS signals were scanned at 2 scans/second from m/z of 35 to 450 and the MS spectra were identified by comparing matching percentage with mass spectral library of NIST. If the matching percentage was less than 80%, the chemical fragment was defined as unknown fragment. If higher than 90%, the satisfactory match was noted by using the symbol “*”. Each solid sample was duplicated and the reproductivity of the pyrolysis was confirmed. The identified fragments were categorized into five groups (Table 2) according to the possible origin (parent compound).

Quantification of pyrolysis products is difficult because of the vast quantity and range of pyrolysis fragment obtained (Page *et al.*, 2003). Absolute integration of fragment areas is unreliable because of the different weights of samples and the different relative amounts of organic material in the samples. The relative ratio of area between pyrolysis fragments and one normalizing fragment is used to achieve a fingerprint of the pyrolysis data as shown in

Table 1 Details of collected sample, DEHP concentration and ignition loss

Treatment Plant	Sampling Date	Type of solids, DEHP concentration and ignition loss			Suspended solid
		Floating solid (scum)	Settled solid (Sludge)		
A	2003/Jan/21-22	Flocculation tank (11.0 mg DEHP/kg) (38%VS)	Sedimentation tank (0.7 mg DEHP/kg) (29%VS)	Filtration tank (backwashing) (3.3-5.2 mg DEHP/kg) (30%VS)	
B	2003/Jan/27	Filtration tank (2.7-4.3 mg DEHP/kg) (36%VS)	Sedimentation tank (0.6 mg DEHP/kg) (29%VS)	Return water (8.8-18.8 mg DEHP/kg) (34%VS)	
C	2003/Jan/27	Flocculation tank (13.0 mg DEHP/kg) (26%VS)	Sedimentation tank (12.0 mg DEHP/kg) (20%VS)	Draining water (2.5 mg DEHP/kg) (22%VS)	
D	2003/Feb/04	(no scum observed)	Adjustment tank (14.0 mg DEHP/kg) (35%VS)	Filtration tank (backwashing) (4.3-4.4 mg DEHP/kg) (36%VS)	
E	2003/Feb/25	Filtration tank (1) (5.2 mg DEHP/kg) (38%VS)	Sedimentation tank (7.9 mg DEHP/kg) (25%VS)	Filtration tank (backwashing) (5.3-5.6 mg DEHP/kg) (32%VS)	
				Distribution tank (2) (210 mg DEHP/kg) (67%VS)	

Table 2 Details of proposed origin compounds

	Origin	Description
Pr	Protein and N-containing compound	Structure contains basic molecule of protein and/or nitrogen.
Ps	Polysaccharide	Basic structure is sugar, or fragment of sugar, furan, and/or cellulose.
Lg	Lignin and aromatic compound	Basic structure is aromatic ring.
Lp	Lipid and aliphatic compound	Basic structure is aliphatic compound, long aliphatic chain or paraffinic material.
S	S-containing compound	Structure contains sulfur.

Source: Huang *et al.*, 1998; Christy *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000

Equation (1). The fragment used as normalizer must be present in all samples, have high matching percentage and be a distinctive peak. From the pyrolysis GC/MS analysis, acetonitrile, toluene, 2-cyclopenten-1-one, acetic acid and furfural appeared in all the pyrograms. Due to the high matching percentage and the distinctiveness, toluene was the most suitable fragment as the normalizer for this experiment.

$$\text{Relative ratio} = \frac{\text{Area of fragment}}{\text{Area of normalizing fragment (toluene)}} \quad (1)$$

The average relative ratios were calculated for duplicated samples and the value of 0.10 was selected as the limit of fragment identification (the fragments with the average relative ratio less than 0.10 were neglected). The fragments having average relative ratio higher than 0.20 at least in one of all the solid samples were considered as "important fragments" in this study. The results from fragment identification are shown later in Table 3. The sum of relative ratios in each sample ranged between 9 and 32, and it meant that the criterion of fragment identification at relative ratio 0.10 could neglect minor fragments whose peak area contributed less than 1.1% to total peak area.

Results and discussion

Characterization of solids

As shown in Table 1, DEHP concentration and ignition loss (related with organic content) varied between the solids. The highest DEHP concentration (210 mg/kg) was found in the scum collected at a distribution tank in treatment plant E and was significantly higher than others. The scum sample also had distinctively high ignition loss (67%VS) compared with other solids. Table 3 shows average relative ratios of the fragments produced in pyrolysis of the solid samples. The origins of the fragments were estimated according to the reference shown in Table 2 and the estimated origin composition of each solid is listed at the bottom of Table 3. Characterization of the solid samples in terms of chemical structure was done using the pyrolysis result shown in Table 3. To compare between average relative ratios of all samples, the second normalization was employed by each sum of relative ratio. Figure 1 shows a dendrogram generated in cluster analysis based on the second normalized relative ratio using Ward method. From the dendrogram and the percentage of estimated origin composition, the solid samples could be classified into 5 groups: (1) all samples from treatment plant C, floating and settled samples from treatment plant B, and settled sample from treatment plant A (total 6 samples) composed mainly of estimated origin in Pr; (2) all samples from treatment plant D, floating and settled samples from treatment plant A, and

Table 3 Average relative ratios in all solid samples based on important fragments

Estimated origin	Important fragment	Average relative ratio ¹														
		A		B		C		D		E						
		Suspended	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled				
Pr	* Acetonitrile	3.92	3.45	5.84	4.40	4.70	4.98	5.64	5.14	7.53	3.96	2.37	4.28	2.44	1.51	3.35
Pr	* Pyrrole	0.76	0.83	0.52	0.81	0.66	0.80	0.87	0.94	1.17	0.95	0.77	1.19	0.86	1.18	1.18
Pr	* N,N'-isophthaloylbis(3-aminobenzoic acid)	0.13		0.20	0.14	0.13	0.18	0.20	0.15	0.19	0.12	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14
Pr	* 2,4-Pentadienenitrile	0.32		0.45	0.30	0.28		0.45	0.37	0.50	0.37	0.31	0.38	0.29		0.46
Pr	* Propanenitrile			0.26		0.30	0.33	0.46	0.32	0.35	0.21	0.28	0.29	0.29	0.17	0.20
Pr	Carbamic acid, phenyl ester			0.65	0.34		0.29	0.31	0.35	0.33	0.40	0.33	0.42	0.42	2.33	0.73
Pr	* 1H-Pyrrole, 3-methyl-			0.46	0.16		0.19	0.24	0.25	0.29	0.20	0.19	0.13	0.13	0.31	0.31
Pr	* Acetamide									0.22	0.56	0.26	0.63	0.46	0.69	0.69
Pr	2-Butenenitrile					0.14	0.11	0.21		0.19	0.18		0.33	0.46	0.14	0.14
Pr	1H-Pyrrole, 1-methyl-	0.16	0.17	0.10	0.21											
Pr	2(1H)-Pyridinone, 1-methyl-							0.33	0.38	0.46	0.53		0.80			
Pr	* Propane, 2-nitro-										0.22	0.24	0.34	0.26	0.31	0.32
Pr	Tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hex-3-ene-3-carbonitrile			0.16	0.79		0.15					0.16				
Pr	Pyrrolidine, 2-methoxy-			0.21			0.37					0.32				0.79
Pr	2,3-Dimethyl-aziridine									0.21		0.30				
Pr	3-Hexadecyloxy-carbonyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylimidazolium ion														0.68	
Pr	* Pentadecanenitrile													0.16	0.34	
Pr	* 1-Tetrazol-2-ylethanone													0.24	0.24	
Pr	2-Azetidinone, 3,3-dimethyl-										0.43				0.38	
Pr	9-Octadecenamide, (Z)-															
Pr	Aziridine, 1-(2-buten-2-yl)-													0.79		
Pr	Butanenitrile, 4-oxo-	0.21														
Pr	Eicosanenitrile														0.41	
Pr	Ethanol, 2-(2-aminoethoxy)-				0.21											
Pr	* Pyridine															
Ps	* 2-Cyclopenten-1-one	0.31	0.44	0.18	0.25	0.20	0.21	0.18	0.22	0.22	0.28	0.19	0.55	0.42	0.42	0.51