

## ノ ー ト

## 蛍光/化学発光検出高速液体クロマトグラフィーによる 大気粉じん中の多環芳香族炭化水素及びそのニトロ誘 導体の同時分析

村橋 毅, 早川和一<sup>®</sup>, 岩本侑子, 宮崎元一\*

(1994年6月21日受理)

### 1 緒 言

発がん性多環芳香族炭化水素 (PAH) は, 化石燃料などの不完全燃焼によって発生するが, 近年, 大気中に PAH より強い発がん活性を示すニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) の存在が報告され, これらの化合物による大気汚染の現状把握の必要性が叫ばれている<sup>1)</sup>. このうち PAH については既に蛍光検出 HPLC<sup>2)~4)</sup> や GC/MS<sup>5)</sup> を用いた幾つかの分析法が報告され, 大気内動態も研究されている. 一方, NPAH についても蛍光検出 HPLC<sup>6)</sup> や GC/MS<sup>7)</sup> による分析法が報告されているが, 大気中 NPAH 濃度は極めて低いため, 感度が不足し, 大気内動態研究の大きな障害になっていた. そこで, 著者らは化学発光検出 HPLC の原理に基づく超高感度 NPAH 分析法を新しく開発し<sup>8)9)</sup>, これを自動車排ガス粉じんに適用してジニトロピレン (DNP) 及び 1-ニトロピレン (1-NP) の排出状況<sup>10)</sup>を明らかにした. 次いで, 内標準物質を用いることにより本法を更に低濃度の大气浮遊粉じんにも適用可能とした<sup>11)</sup>. 本法では, NPAH を粉じんから抽出後, 化学発光検出に高感受性なアミノ多環芳香族炭化水素 (APAH) に還元し, 更に ODS カラムで分離溶出して化学発光検出する<sup>8)9)</sup>. ところで, PAH はこの抽出操作により NPAH と同時に抽出されて ODS カラムに注入されるが, カラム保持時間は APAH よりはるかに長い. そこで, 著者らはこの違いに着目して, ミニ ODS カラムでこれらを分離し, 更に高圧流路切り換えバルブを用いて NPAH 分析システム (化学発光検出) と PAH 分析システム (蛍光検出) とを接続することにより, 1 回の試料注入で両者の同時分析を可能とした.

### 2 実 験

#### 2・1 試 薬

フルオランテン (Fl), ベンゾ [a] アントラセン (BaA) は半井化学製, ピレン (Py), コロネン (Co) 及び 1-NP は東京化成製, クリセン (Ch), ベンゾ [b] フルオランテン (BbF), 1,3-, 1,6-, 1,8-DNP, 2-フルオロ-7-ニトロフルオレン (FNF) はアルドリッチ製, ベンゾ [k] フルオランテン (BkF) は RK ケミカル製, ベンゾ [a] ピレン (BaP) は和光純薬製を購入した. その他の試薬は市販特級品を用いた.

#### 2・2 大気浮遊粉じんの捕集と前処理

大気浮遊粉じんは, 市街地交差点脇にハイボリウムエアサンプラー (紀本電子) を設置して, 24 時間, 1.5 m<sup>3</sup>/min の吸引速度で, 石英繊維フィルター (パルフレックス 2500QAT-UP 20.3×25.4 cm) 上に捕集した. 捕集粉じん量の 1/400 (0.28 mg) を既報<sup>8)</sup>により, ベンゼン-エタノールで超音波抽出, アルカリ, 酸で精製, 更に水酸化ナトリウムを加えて沸騰水浴上で還流した. 減圧乾固後, 残留物をアスコルビン酸含有アセトニトリルに溶解し, HPLC システムに導入した.

#### 2・3 装置及び条件

Fig. 1 に HPLC システムの概略を示した. 送液ポンプ P1, 2 は島津 LC-10AD, P3 はサヌキ DMX2200T, 高圧流路切り換えバルブ V は島津 FCV-12AH, 試料注入器 I はレオダイン 7125 (20 µl ループ), カラムオープン CO は島津 CTO-10AC, 分離用ミニカラム SC はナカライテスク製コスモシール 5C<sub>18</sub> (4.6 mm i.d.×10 mm), PAH 分析カラム AC1 はセパレーショングループ製バイダック 201TP54 (4.6 mm i.d.×250 mm),

\* 金沢大学薬学部: 920 石川県金沢市宝町 13-1

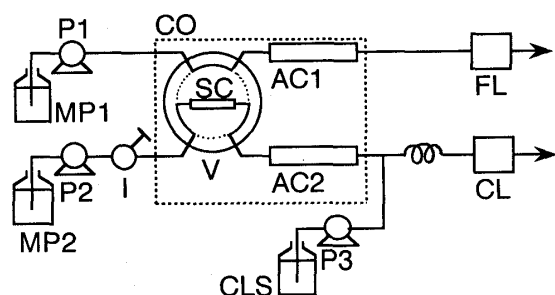


Fig. 1 HPLC system

MP1, 2: mobile phases; P1~3: pumps; I: injector; SC: mini separation column; V: valve; AC1, 2: analytical columns; CO: column oven; CLS: chemiluminescence reagent solution; FL: spectrofluorometer; CL: chemiluminescence detector

NPAH 分析カラム AC2 はナカライテスク製コスモシール 5C<sub>18</sub>MS (4.6 mm i.d.×250 mm) をそれぞれ使用した。

PAH 分析用移動相 MP1 はアセトニトリル-水 (75 : 25, v/v) を用い, APAH 分析用移動相 MP2 は既報<sup>3)</sup>に従い, アセトニトリル-イミダゾール・過塩素酸緩衝液 (pH 7.6) (1 : 1, v/v) を用い, 流量をそれぞれ 1.5, 1 cm<sup>3</sup>/min, カラム温度を 15°C とした。

蛍光検出器 FL は日本分光 820-FP を用い, 検出励起波長及び蛍光波長はタイムプログラムによりそれぞれ 270, 425 (0~11 min), 270, 390 (11~16 min), 280, 435 (16~22 min), 285, 415 nm (22~60 min) に定めた。又, 化学発光検出器 CL は相馬光学 S-3400 を用い, 化学発光試液 CLS は 20 μM ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキサレートと 15 mM 過酸化水素を含むアセトニトリル溶液とし, 流量を 1 cm<sup>3</sup>/min に定めた。

### 3 結果及び考察

#### 3・1 システムの構築及びカラムスイッチング時間の検討

上述したように, 著者らは既に化学発光検出 HPLC による NPAH 分析法を開発し, 又, PAH については分析カラム及び蛍光検出に関する最近の報告<sup>3,4)</sup>を一部改良した HPLC 条件を確立し, 大気浮遊粉じん分析に供してきた。そこで本同時分析法では, まず分析カラム, 溶離液及び検出条件は NPAH 及び PAH それぞれの最適分析条件を活用できるシステム構成とした。更に MP2 を用いて SC から APAH と PAH を分離溶出させ, それぞれの最適分析カラム-溶離液系に導入することを考えた (Fig. 1)。すなわち, I より注入された試料

のうち APAH は SC に対する保持が弱いので, 直ちに SC を通過して, AC2 に導入される。一方, PAH は SC に対する保持が強いので遅れて SC を通過する。この間, V を実線から点線に切り換えると SC の移動相は溶出力が強い MP1 となり, 同時に流路は AC1 に切り換わる。そこで, V の流路が実線するとき, APAH, PAH 混合試料を注入してから SC を通過するまでの時間を調べた。4 種 APAH のうち, 最後に溶出する 1-アミノピレンは試料注入後 1.5 分以内に, 又, 8 種 PAH のうち最初に溶出する Fl は 2.0 分以上を要した。従って, 4 種 APAH のみが完全に溶出する試料注入後 1.8 分に, V を実線から点線に切り換えた。なお, 目的成分ピークの溶出中にベースラインの変動を防ぐため, V は試料注入後 50 分に点線から実線へと戻した。

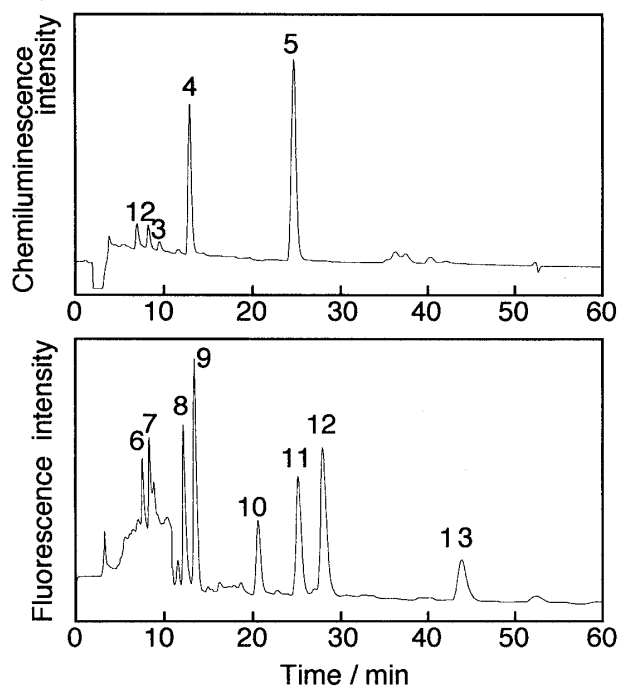
#### 3・2 検出下限, 再現性及び検量線

以上の条件で, 1,3-, 1,6-, 1,8-DNP の検出下限 ( $S/N=3$ ) は 0.25~0.35 fmol, 1-NP の検出下限は 1.5 fmol, Co を除く 7 種 PAH の検出下限はいずれも 10 fmol 以下であり, 二つのシステムを組み合わせることによる検出感度の低下は認められなかった。又, いずれの化合物ピークも, 保持時間の相対標準偏差は 0.4% 以下 ( $n=5$ ), 高さの相対標準偏差は 5% 以下 ( $n=5$ ) であった。更に検量線は, 1,3-, 1,6-, 1,8-DNP については 1~100 fmol, 1-NP については 10~1000 fmol, Co を除く 7 種 PAH では 1~100 pmol の範囲で, いずれも相関係数 0.999 以上であった。

#### 3・3 大気浮遊粉じん抽出物の分析

大気浮遊粉じん (0.28 mg) のベンゼン-エタノール抽出物の分析例を Fig. 2 に示した。化学発光検出クロマトグラムでは 1,6-, 1,8-, 1,3-DNP, FNF (内標準物質) 及び 1-NP が, 蛍光検出クロマトグラムでは Fl, Py, BaA, Ch, BbF, BkF, BaP 及び Co が, それぞれ順に 50 分以内に分離検出された。又, 60 分以後は妨害ピークが出現せず, 60 分ごとの連続分析が可能であった。FNF とのピーク高さ比より計算される各化合物の大気中濃度は以下のとおりであった: 1,3-DNP, 7.5 fmol/m<sup>3</sup>; 1,6-DNP, 7.8 fmol/m<sup>3</sup>; 1,8-DNP, 8.9 fmol/m<sup>3</sup>; 1-NP, 460 fmol/m<sup>3</sup>; Fl, 17 pmol/m<sup>3</sup>; Py, 24 pmol/m<sup>3</sup>; BaA, 13 pmol/m<sup>3</sup>; Ch, 21 pmol/m<sup>3</sup>; BbF, 17 pmol/m<sup>3</sup>; BkF, 5.9 pmol/m<sup>3</sup>; BaP, 13 pmol/m<sup>3</sup>。

従来法では NPAH と PAH を全く別々に前処理して, 異なる HPLC システムで分析していたため, 上記化合物の分析には合計 8 時間を必要とした。ところ



**Fig. 2** Chromatograms of benzene/ethanol extract from airborne particulates

Peaks 1: 1,6-DNP; 2: 1,8-DNP; 3: 1,3-DNP; 4: FNF; 5: 1-NP; 6: Fl; 7: Py; 8: BaA; 9: Ch; 10: BbF; 11: BkF; 12: BaP; 13: Co

が、本同時分析法は前処理操作が共通でしかも HPLC 時間も半分となり、3 時間ですべての分析が可能であ

る。又、試料や有機溶媒の量も従来法の 1/2 ですむなど、ランニングコスト面での利点も多い。以上のように、本同時分析法は大気中 NPAH 及び PAH の分析に極めて有用な方法と考えられる。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金助成 (No. 6557121 及び No. 6672138) による。

## 文 献

- 1) 常盤 寛: 大気汚染学会誌, **27**, 73 (1992).
- 2) K. Ogan, E. Katz and W. Slavin: *Anal. Chem.*, **51**, 1315 (1979).
- 3) 塩崎卓哉, 田辺 潔, 松下秀鶴: 大気汚染学会誌, **19**, 300 (1984).
- 4) S. A. Wise, L. R. Hilpert, R. E. Rebbert, L. C. Sander, M. M. Schantz, S. N. Chesler and W. E. May: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **332**, 573 (1988).
- 5) A. G. Howard, G. A. Mills: *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **14**, 43 (1983).
- 6) 田辺 潔, 松下秀鶴, 郭 錦堂, 今宮俊一郎: 大気汚染学会誌, **21**, 535 (1986).
- 7) D. Schuetle, T. L. Riley, T. J. Prater, T. M. Harvey, D. F. Funt: *Anal. Chem.*, **54**, 265 (1982).
- 8) K. Hayakawa, R. Kitamura, M. Butoh, N. Imazumi, M. Miyazaki: *Anal. Sci.*, **7**, 573 (1991).
- 9) K. Hayakawa, M. Butoh, M. Miyazaki: *Anal. Chim. Acta*, **266**, 251 (1992).
- 10) K. Hayakawa, M. Butoh, Y. Hirabayashi, M. Miyazaki: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 20 (1994).
- 11) 村橋 毅, 早川和一, 渡辺智子, 宮崎元一: 日本分析化学会第 42 年会講演要旨集, p. 615 (1993).



**Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives in airborne particulates by HPLC with fluorescence/chemiluminescence detection** Tsuyoshi MURAHASHI, Kazuichi HAYAKAWA, Yuko IWAMOTO and Motoichi MIYAZAKI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920)

A simultaneous determination method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs (NPAHs) in airborne particulates was developed. Airborne particulates were extracted with benzene/ethanol, cleaned up by liquid-liquid partition, refluxed in the presence of NaSH and then the resultant solution was injected into an HPLC system. The system was hybridized into two systems with different optimum conditions for PAHs and NPAHs by introducing a switching valve and a mini separation column. Mobile phases were acetonitrile/water (75 : 25) for PAHs, and acetonitrile/imidazole HClO<sub>4</sub> buffer (1 : 1) for NPAHs and the postcolumn reagent solution for NPAHs was an acetonitrile solution containing bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. By this method, four NPAHs (1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene) and eight PAHs (fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene and coronene) in sub-milligram quantities of airborne particulates were de-

terminated chemilumigenically and fluorogenically, respectively using 2-fluoro-7-nitrofluorene as an internal standard within sixty minutes.

(Received June 21, 1994)

***Keyword phrases***

nitropolycyclic aromatic hydrocarbon; polycyclic aromatic hydrocarbon; airborne particulates; simultaneous determination; HPLC; chemiluminescence; fluorescence.

---