

テクニカルレター

ベンゾ[*a*]ピレンの分析における高速液体クロマトグラフィー
及びガスクロマトグラフィー/質量分析法の評価*今村 清^{®**}, 江口正治^{**}, 大平修平^{**}, 竹中規訓^{**}, 田代恭久^{**},
立花茂雄^{**}, 田中 稔^{**}, 平井恭三^{**}, 藤方 豊^{**}, 矢坂裕太^{**}Evaluation of HPLC and GC/MS for the determination of
benzo[*a*]pyrene in environmentK. IMAMURA, M. EGUCHI, S. OHIRA, N. TAKENAKA, T. TASHIRO,
S. TACHIBANA, M. TANAKA, K. HIRAI, Y. FUJIKATA and Y. YASAKA^{**}^{**}Section of the 23rd Cooperative Test, Association for Environmental Analysis in Osaka, 1-8-4, Utsubohon-
machi, Nishi-ku, Osaka 550-0004

(Received 18 July 2001, Accepted 26 September 2001)

環境分析技術協議会では有害大気汚染物質に係る優先取組物質であるベンゾ[*a*]ピレンについて HPLC 及び GC/MS を用いた分析法の精度について共同実験を行った。試料としては HPLC 用及び GC/MS 用にそれぞれ 2 種類と底質試料の抽出液の 1 種類を合わせて各 3 種類の溶液試料, 更に石英濾紙に添加された濾紙試料として 2 種類の合わせて 5 種類を使用した。濾紙試料は有害大気汚染物質測定法マニュアル (1999 年 3 月) に従って前処理を行い, 分析した。HPLC では棄却データを除けばほとんどの機関の相対標準偏差は 1~5% の範囲に入っていた。GC/MS では分析感度に関しては HPLC よりも少し劣っており, 分析精度についてもシリジスバイクを添加しているにもかかわらず, HPLC よりも少し劣っていた。また, GC/MS ではベンゾ[*e*]ピレン及びペリレンについても検討した。

Keywords : roundrobin test; benzo[*a*]pyrene; HPLC; GC/MS.

1 はじめに

大気中には極微量でも有害な化学物質が数多く存在していると考えられており, これらを精度良く分析すること, 及びその精度並びに問題点を検討することは極めて重要なことである。関西地区の産官学の研究機関からなる 1972 年に設立された環境分析技術協議会 (現委員長, 田中 稔 大阪大学教授) では, 環境分析技術等の向上を目指して共同実験による種々の検討を行ってきた^{1)~8)}。当協議会の第 23 共同実験部会「有害大気汚染物質の分析」では, 1997 年度からの 3 年間において, 有害大気汚染物質に係る優先取組物質中の 9 種類の揮発性有機化合物 (ビニルクロ

リド, 1,3-ブタジエン, アクリロニトリル, ジクロロメタン, クロロホルム, 1,2-ジクロロエタン, ベンゼン, トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレン) の容器採取-ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS), 固体吸着-溶媒抽出/GC/MS, 及び固体吸着-加熱脱着/GC/MS における分析精度等の検討を行った^{6)~8)}。今回は, 同じく優先取組物質で, 発がん性があると言われている難揮発性有機化合物の, ベンゾ[*a*]ピレンの分析における精度等の評価検討を行った。分析には, 有害大気汚染物質測定法マニュアル⁹⁾ (以下, 測定法マニュアルという) に準じた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) あるいは GC/MS で, 各自検証した方法を用いた。試料としては, 標準試薬を希釈した標準溶液及び前処理済み底質抽出溶液を, そのまま試料溶液としたもの, 及び石英濾紙に試料溶液を添加してサンプリングした状態にしたものを用いた。また, GC/MS では同時に検出されるベンゾ[*e*]ピレンとペリレンにつ

* 有害大気汚染物質の分析に関する共同実験 (第 4 報)。前報は今村 清ほか, 環境技術, 29, 461 (2000)。

^{**} 環境分析技術協議会第 23 共同実験部会: 550-0004 大阪府大阪市西区朝本町 1-8-4

いても検討したので、その結果を報告する。

2 実 験

2.1 共同実験参加機関

本共同実験に参加したのは17機関^{*1}（そのうち、HPLCには7機関、GC/MSには10機関）であり、その企画、立案、配布試料の調製並びに結果の取りまとめは10名の幹事らにより行った。

2.2 装 置

本実験で使用したHPLC装置は、島津製作所製5機関、Hewlett-Packard製2機関、GC装置は、Hewlett-Packard製5機関、島津製作所製2機関、Thermo Quest製2機関、日立製作所製1機関、MS装置は、Hewlett-Packard製4機関、島津製作所製2機関、Thermo Quest製2機関、日立製作所製1機関、日本電子製1機関であった。これらの装置の操作条件は各分析機関に任せた。

2.3 試料の調製及び測定

2.3.1 検証試験用試料の調製

(1) 標準溶液の調製 HPLC用試料L1, L2はベンゾ[a]ピレン標準試薬のアセトニトリル溶液、GC/MS用試料G1, G2はベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[e]ピレン及びペリレンのトルエン混合溶液、また試料Fはこれら3種類のヘキサン混合溶液を石英濾紙に添加したものである。これらの試料は(株)コベルコ科研西神事業所において調製した。標準物質 {ベンゾ[a]ピレン (純度98%, 和光純薬製)、ベンゾ[e]ピレン (純度99%, Aldrich Chem. 製) 及びペリレン (純度98%, 東京化成製)} の標準第一原液は標準試薬を正確にひょう量し、各々トルエンに溶解し、10~50 mlに調製した(それぞれの計算値2.03, 1.02及び1.01 mg/ml)。試料L1, L2はベンゾ[a]ピレンの標準第一原液をアセトニトリルで適宜希釈した標準溶液で、この溶液の約1.5 mlをミニバイアル瓶に取り分け、テフロンシートをバイアル瓶とクリーンキャップとの間に挟んで密栓し、配布試料とした。試料G1, G2はベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[e]ピレン及びペリレンの各標準第一原液を適宜混合してトルエンで希釈した標準溶液で、この溶液約1.5 mlをミニバイアル瓶に取り分け、同様に密栓して配布試料とした。GC/MSに用いるクリーンアップスパイク用内標準物質ベンゾ[a]ピレン-d₁₂ (純度98%, Cambridge Isotope

Laboratories 製) 及びシリンジスパイク用内標準物質クリンセン-d₁₂ (純度98%, 和光純薬製) もそれぞれ正確にひょう量してトルエンに溶解し、更に10倍希釈した溶液(計算値はいずれも0.10 mg/ml) 約1.5 mlをミニバイアル瓶に取り分け、同様に密栓して配布した。試料Fはベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[e]ピレン及びペリレンの各標準第一原液を適宜混合し、ヘキサンで希釈した溶液20 µlを石英濾紙(直径47 mm, アドバンテック東洋製QR-100)に添加し、溶媒を除去して調製した。試料成分の光分解、揮散等を防ぐため、試料調製後直ちにアルミはくで遮光し、スチロールシャーレに入れ、セロテープで密封して配布し、抽出の工程まではできるだけ速やかに行うよう指示をした。希釈溶媒はすべて残留農薬試験用を使用した。

(2) 底質抽出溶液の調製 底質試料を抽出して得られた多環芳香族炭化水素画分のヘキサン溶液(試料S)、及びこの抽出液を石英濾紙に添加した試料(試料SF)は、大阪府公害監視センターにおいて調製した。大和川河口で採取した底質(湿泥25 g)をアセトニトリルで3回超音波抽出した。得られた抽出液をヘキサン-アセトニトリル分配によりクリーンアップした後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離操作を行い、多環芳香族炭化水素溶出画分を分取した¹⁰⁾。このようにして得られた抽出液をGC/MSを用いて分析し、ベンゾ[a]ピレン濃度を測定した。ベンゾ[a]ピレン濃度が約30 ng/mlになるようヘキサンで希釈した溶液約1.5 mlをミニバイアル瓶に取り分け、同様に密栓して配布試料Sとした。溶媒は残留農薬試験用を使用した。試料SFは抽出液をベンゾ[a]ピレン濃度が200 ng/mlになるように濃縮した溶液250 µlを石英濾紙(直径47 mm アドバンテック東洋製QR-100)に添加し、溶媒を除去した後、同様にアルミはくで遮光してスチロールシャーレに入れ、密封して配布した。また、試料Bは空試験に用いる無添加の石英濾紙であり、無添加の石英濾紙を同様にスチロールシャーレに入れて配布した。配布試料中の測定対象成分の濃度あるいは含量(計算値及び参考値)をTable 1に示した。

2.3.2 HPLC L1, L2, S, SF, F, Bの6種類の試料を配布した。溶液試料のうち試料L1, L2はアセトニトリル溶液であるのでそのままHPLC測定できるが、試料Sはヘキサン溶液のため、一定量をメスフラスコに分取し、適量のアセトニトリルを加えてかくはんし、静置した。上層に分離するヘキサン部分は窒素ガスを通気して除去し、更にアセトニトリルを加えて標線まで満たすことによって、10倍希釈した。石英濾紙の試料SF, F, Bは測定法マニュアルに従って抽出を行い、抽出液を10 mlに定容した。検量線を作成後、各試料について4回測定し、ベンゾ[a]ピレンの濃度を求め、結果等を配布したデータシート(フロッピーディスク)に入力した。

*1 共同実験参加機関(順不同)(株)大阪化学分析センター、大阪府公害監視センター、(株)環境科学コーポレーション、環境計測サービス(株)、(株)関西新技術研究所、(株)関西総合環境センター、(株)コベルコ科研西神事業所、新日本気象海洋(株)、(株)住化分析センター、帝人エコ・サイエンス(株)、(財)日本気象協会関西本部、日本検査(株)、(株)ユニテカ環境技術センター

Table 1 Samples used in this test

Analyte	Sample							
	Concentration of analyte/ng ml ⁻¹					Content of analyte/ng		
	L1	L2	G1	G2	S	SF	F	
Benzo[a]pyrene	1.0	8.0	5.1	102	34	41	50.8	
Benzo[e]pyrene	0	0	10.2	81.6	36	41	40.8	
Perylene	0	0	40.2	161	85	69	126	

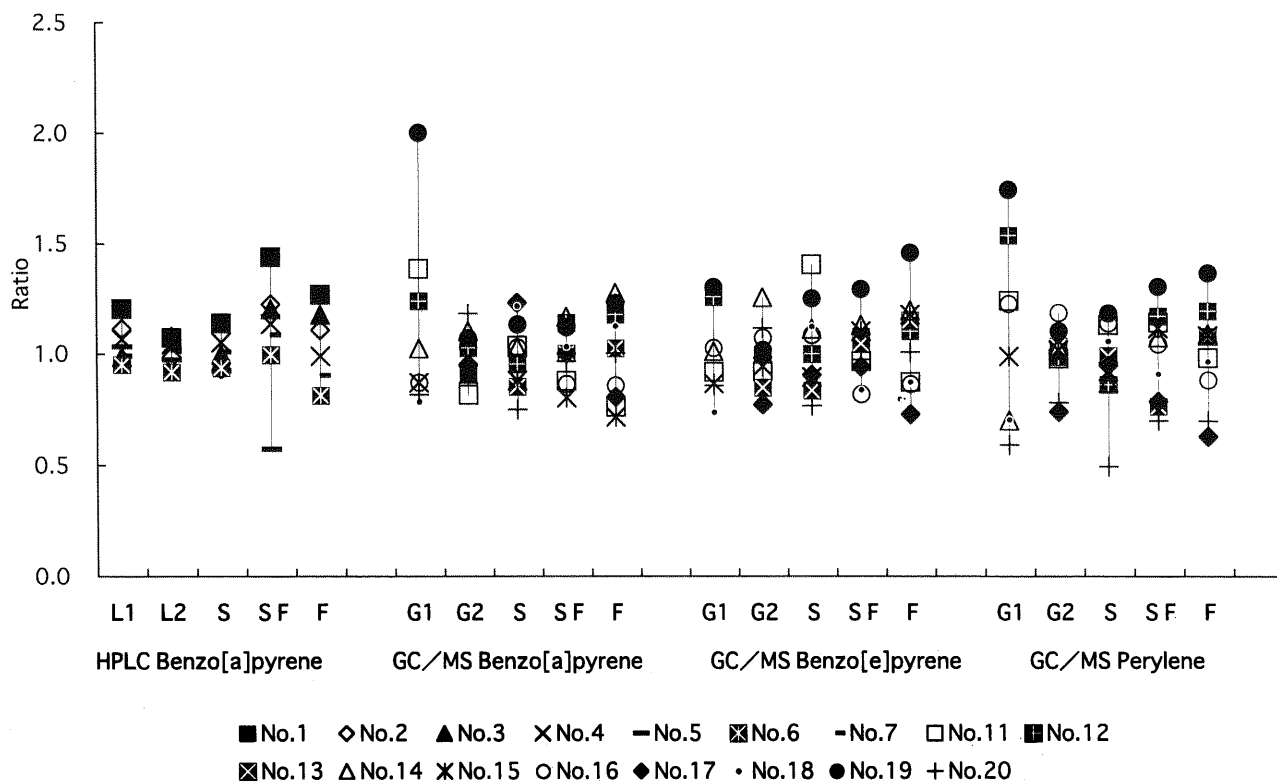


Fig. 1 Ratio of observed value (concentration or content) of each analyte to mean of its series before rejection on JIS Z 8402-2

2・3・3 GC/MS 配布した溶液試料 G1, G2, S は, クリーンアップスパイクとしてのベンゾ[a]ピレン-*d*₁₂ 及びシリンジスパイクとしてのクリセン-*d*₁₂ を含んでいないため, 試料 1.0 ml を正確に分取し, 検量線作成用標準液と同じ濃度になるようにベンゾ[a]ピレン-*d*₁₂ 及びクリセン-*d*₁₂ をそれぞれ添加した. 石英沓紙の試料 SF, F, B は測定法マニュアルに従って抽出を行った. 石英沓紙に最終液のクリーンアップスパイク濃度が, 検量線作成用標準液と同じ濃度になるようにベンゾ[a]ピレン-*d*₁₂ を添加した後, 抽出操作を行い, シリカゲルカラムで前処理し, 1.0 ml まで濃縮した最終液に, 検量線作成用標準液中のシリンジスパイク濃度と同じ濃度となるようにクリセン-*d*₁₂ を添加した. 検量線を作成後, 各試料について 4 回測定し, ベンゾ[a]ピレン, ベンゾ[e]ピレン, ペリレンの濃度及び回収率を求め, 結果等を配布したデータシート (フロップ

ーディスク) に入力した.

3 考 察

試料 L1, L2 については HPLC で, 試料 G1, G2 については GC/MS で, 試料 S, SF, F, B は HPLC と GC/MS の両法で測定した. 石英沓紙に添加した試料 SF, F の測定値は, 空試験値 (試料 B) を差し引いた値を測定値とした. なお, 試料 B の測定値で 0.1 ng 以上の値を報告した分析機関は HPLC ではなく, GC/MS で 1 機関が報告している. 測定値の検定は JIS Z 8402-2 により行い, 棄却限界値は 5% とした. 測定結果は異常値を棄却した後の平均値を基準とし, その比を用いて評価した. 各試料の濃度比及び相対標準偏差 (RSD, %) を Fig. 1 及び 2 にそれぞれ示した.

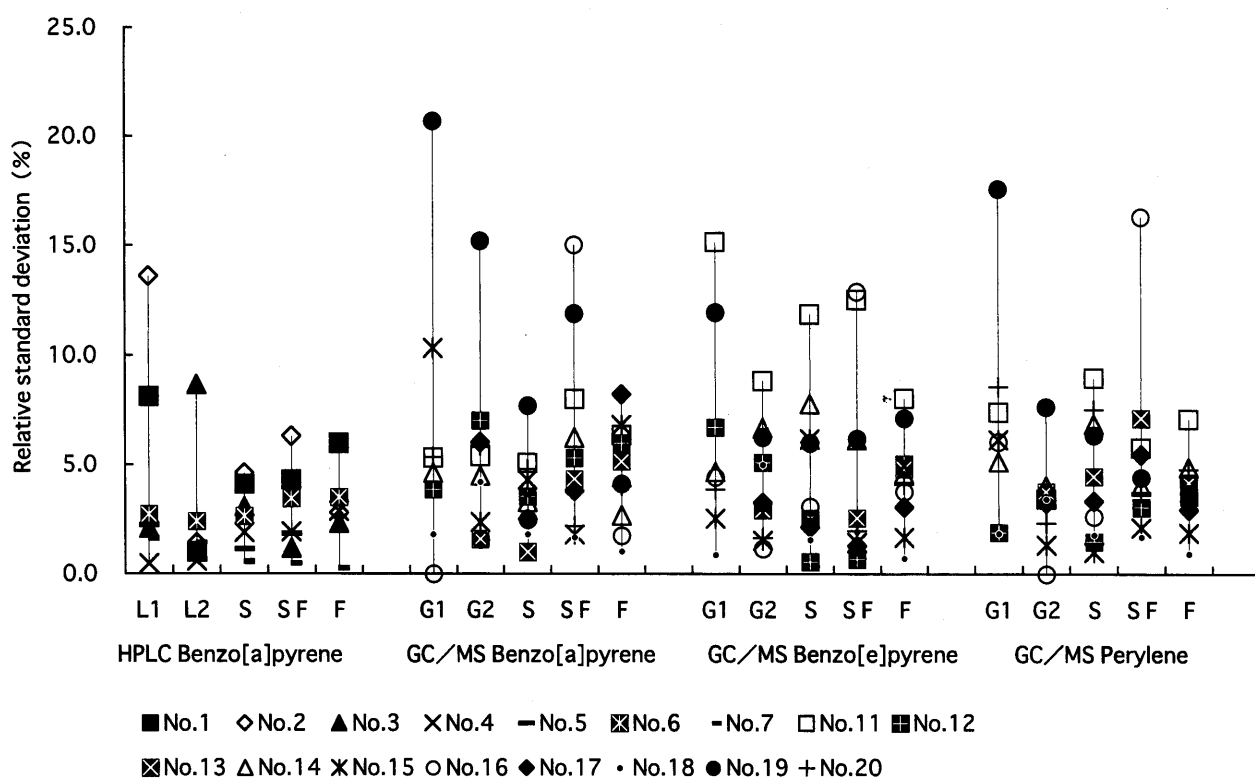


Fig. 2 Relative standard deviation of the ratios in Fig. 1

3.1 HPLC

HPLCで測定した試料 L1 及び L2 は、ベンゾ[a]ピレン標準溶液のそれぞれ低濃度及び高濃度の溶液であり、試料 L1 では 2 機関 (No.1: ■, 2: ◇), 試料 L2 では 1 機関 (No.3: ▲) の測定値が棄却された。特に、低濃度の試料 L1 で RSD が大きく、棄却された分析機関はベースラインの安定性、テイリング等による分離段階が原因として考えられるため、分析装置の維持管理に注意が必要である。底質試料の抽出液である試料 S ではアセトニトリル溶媒に転溶し、10 倍希釈しているが、棄却された分析機関はない。

石英濾紙に添加した試料 SF, F での結果は、抽出操作を含む分析精度を示している。試料 SF (No.1: ■, 2: ◇), 試料 F (No.1: ■) の 3 個の棄却データを除けば、分析そのものについての RSD は約 3% であった。しかし、分析機関間の測定値を比較すると、7 機関中 1 機関 (No.5: —) だけが著しく低い値を示した。この分析機関は抽出法にソックスレー抽出 (16 時間) を用いており、抽出操作方法に問題があったものと推定される。以上の棄却データを除くと、ほとんどの分析機関で、RSD は 1~5% 程度であった。

3.2 GC/MS

ベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[e]ピレン及びペリレン混合標

準溶液の、それぞれ低濃度及び高濃度の溶液である試料 G1 及び G2 は、ともに同じ機関の 2 測定値 (No.19: ●のベンゾ[a]ピレン及びペリレン) が棄却された。この機関はほかの分析機関に比べて RSD が大きく、特に低濃度の試料 G1 で大きい値を示しており、これは 3 種の化合物いずれにも見られた (ベンゾ[a]ピレン: 20.7%, ベンゾ[e]ピレン: 12.0%, ペリレン: 17.6%)。試料 S では 3 機関の 4 測定値 (No.11: □のベンゾ[e]ピレン, ペリレン, No.19: ●のベンゾ[a]ピレン, No.20: +のペリレン) が棄却された。石英濾紙に添加した試料 SF, F での結果は、前処理 (抽出, クリーンアップ) 操作を含む分析精度を示している。試料 SF では 4 機関でベンゾ[a]ピレンを除く 5 測定値 (No.11: □のベンゾ[e]ピレン, No.14: △のベンゾ[e]ピレン, No.16: ○のベンゾ[e]ピレン, ペリレン, No.19: ●のベンゾ[e]ピレン) が、試料 F では 1 測定値 (No.19: ●のベンゾ[e]ピレン) が棄却された。しかし、試料 SF 及び F でこのように棄却された分析機関の中には、標準溶液試料 G1, G2 及び S でも同じように棄却された分析機関があるので、前処理としての濾紙からの抽出方法及びクリーンアップ操作が、棄却の原因ではないものと推定される。また、試料 B では、1 機関 (No.17) が 0.1 ng 以上の測定値 (ベンゾ[a]ピレン 2.72 ng, ベンゾ[e]ピレン 1.24 ng, ペリレン 0.185 ng) を報告している。この機関はソックスレー抽出法を使用しているが、装置など

Table 2 Recoveries of benzo[a]pyrene- d_{12}

	G1		G2		S		SF		F		B	
No.11	94.1	(2.89)	106	(5.54)	114	(10.1)	99.5	(4.71)	121	(4.50)	125	(12.3)
No.12	95.8	(5.92)	104	(3.35)	97.5	(3.08)	119	(2.69)	88.5	(6.92)	69.2	(4.97)
No.13			89.9	(5.42)	91.7	(5.38)	95.4	(6.69)	81.5	(2.43)	109	(8.24)
No.14	98.6	(5.59)	101	(9.32)	103	(4.01)	100	(7.29)	97.7	(5.99)	96.2	(2.71)
No.15							83.5	(0.75)	70.7	(4.29)	89.7	(1.01)
No.16	96.5	(8.26)	99.5	(1.68)	98.8	(2.66)	71.8	(2.21)	79.6	(7.95)	66.7	(1.41)
No.17			75.3	(2.29)	93.9	(2.25)					88.0	(4.39)
No.18	95.1	(1.22)	88.4	(4.47)	110	(6.22)	116	(3.61)	117	(1.51)	102	(3.06)
No.19							44.5	(9.97)	65.0	(8.88)	51.2	(1.87)
No.20	146	(7.59)	104	(3.87)	101	(9.48)	124	(2.64)	128	(4.67)	115	(5.73)

The values in the parenthesis () are relative standard deviation(%).

からによる汚染が原因と考えられる。

3・3 回収率 (GC/MS)

サロゲートのベンゾ[a]ピレン- d_{12} の理論値に対する実測値の比は, クリセ- d_{12} を内標準物質として定量分析する液体試料 G1, G2 の結果では分析誤差, 一方石英汙紙に添加した試料では, 回収率すなわち分析と前処理操作を含む誤差を示している。ベンゾ[a]ピレン- d_{12} の理論値に対する実測値の比に関しては, 報告値のない機関 (試料 G1: 4 機関, 試料 G2, S: 各 2 機関, 試料 SF, F: 各 1 機関) もあるが, 液体試料 (G1, G2, S) では, 試料 G1, G2 で各 1 機関 (それぞれ No.20, 14) が棄却された。この値に 146% を報告している機関 (試料 G1 の No.20) もあるが, 棄却後はほとんどの機関で $100 \pm 10\%$ の範囲に入っている (Table 2)。

石英汙紙の試料 (SF, F, B) では, 回収率は空試験試料 B で 3 機関 (No.11, 13, 20) が棄却されている。また, 回収率が 80~120% の範囲を超える値を報告している機関が 5 機関 (試料 SF の No.16, 19, 20, 試料 F の No.11, 15, 19, 20, 試料 B の No.11, 12, 16, 19) もあった。このように分析値の変動幅が大きくなること, また回収率結果が棄却されている機関数が多いなどの要因としては, 汙紙からの抽出及びクリーンアップの二つの前処理操作にあると考えられるので, これらの操作は十分注意して行う必要がある。

3・4 HPLC と GC/MS との精度比較

異常値棄却後の各試料別のベンゾ[a]ピレンの併行標準偏差 (s_j) 及び再現標準偏差 (s_{Rj}) を, それらの平均値とともに Table 3 に示した。試料 SF の再現標準偏差を除いて, HPLC のほうが GC/MS より低い値となっている。HPLC の精度 (平均値) は併行標準偏差 (s_j) 0.0217, 再現標準偏差 (s_{Rj}) 0.1468 であり, GC/MS の精度はそれぞれ 0.0512, 0.1734 となっている。このように GC/MS は分析精度に関して HPLC より少し劣るが, どちらの方法

Table 3 Precision of HPLC and GC/MS for the measurements of benzo[a]pyrene (after the rejection test)

	HPLC		GC/MS		
	s_j	s_{Rj}	s_j	s_{Rj}	
L1	0.0195	0.138	G1	0.0538	0.236
L2	0.0134	0.112	G2	0.0480	0.121
S	0.0297	0.0830	S	0.0333	0.163
S F	0.0199	0.251	S F	0.0730	0.139
F	0.0258	0.150	F	0.0477	0.208
mean	$s_j = 0.0217$	$s_{Rj} = 0.1468$	mean	$s_j = 0.0512$	$s_{Rj} = 0.1734$

でも装置の維持管理を正しく行っていれば, 十分信頼できる精度で測定できる分析法であることが分かった。

付記

今回の共同実験の幹事の所属は次のとおりである。(順不同) 今村 清 (大阪府公害監視センター), 江口正治, 田中 稔, 矢坂裕太 (大阪大学保全科学研究センター), 大平修平 ((財)日本気象協会関西本部), 竹中規訓 (大阪府立大学工学部), 田代恭久 ((株)ユニチカ環境センター), 立花茂雄 ((株)コベルコ科研西神事業所), 平井恭三 ((株)大阪環境技術センター), 藤方 豊 ((株)住化分析センター)

文 献

- 1) 日色和夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **28**, T9 (1979).
- 2) 日色和夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **30**, T45 (1981).
- 3) 日色和夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **33**, T77 (1984).
- 4) 黒田大介: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **36**, T21 (1987).
- 5) 黒田大介: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 313 (1995).
- 6) 今村 清, 江口正治, 大平修平, 田代恭久, 多々野秀二, 立花茂雄, 田中 稔, 中原 忠, 平井恭三, 藤方 豊, 藤瀬剛一, 前田泰昭, 矢坂裕太,

- 藁科宗博: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 121 (1999).
- 7) 今村 清, 江口正治, 大平修平, 田代恭久, 立花茂雄, 田中 稔, 平井恭三, 藤方 豊, 藤瀬剛一, 前田泰昭, 矢坂裕太, 藁科宗博: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 717 (1999).
- 8) 今村 清, 江口正治, 大平修平, 田代恭久, 多々野秀二, 立花茂雄, 田中 稔, 中原 忠, 平井恭三, 藤方 豊, 藤瀬剛一, 前田泰昭, 矢坂裕太, 藁科宗博: 環境技術, **29**, 461 (2000).
- 9) 有害大気汚染物質測定法マニュアル (水銀・ベンゾ [*a*]ピレン) (環境庁大気保全局大気規制課, 1999年3月).
- 10) 水質・底質モニタリング調査マニュアル (環境庁環境保健部環境安全課, 1991年3月).