

カートリッジカラムによる水中の 多環芳香族炭化水素の簡易分析法

望月恵美子 小林 裕 中山 昭

Simplified Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water with Sep-Pak Reversed Phased Cartridges

Emiko MOCHIZUKI, Hiroshi KOBAYASHI and Akira NAKAYAMA

多環芳香族炭化水素(PAH)は、元来、石油、石炭ター
ル中の常成分であるが、環境汚染物質の一例として知ら
れている。工場の煤煙、自動車の排ガスによる大気汚染、
産業排水等による海、河川、土壌の汚染をはじめ、生鮮
食品や加工食品からも検出例がある。動物実験では、発
がん性を示すPAHも多く、人の健康に対する障害が危
惧されている¹⁾。

WHOの飲料水水質ガイドライン(1)―勧告―では、
ベンゾ(a)ピレンとして0.01 $\mu\text{g}/\ell$ のガイドライン値が
提案されている。又、水中のPAHの調査研究から、ベ
ンゾ(a)ピレンを含む6種の指標PAHの総量を限界値
200 ng/ ℓ として提案している²⁾。水中における様々な
種類の指標PAHの濃度は、地下水で10~50 ng/ ℓ 、比較
的汚染されていない河川水で50~200 ng/ ℓ 、汚染され
ている河川水と排水ではこれ以上のレベルであったと同
勧告では報告している。

PAHの分析法についてはこれまで数多くの報告がさ
れている。水溶液試料では、有機溶媒による抽出の後、
濃縮、精製後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と
いう分析方法がひろく使用されている。一方、セップパ
ック C_{18} カートリッジカラムを用いた水中の汚染物質の簡
単な分析方法³⁾が開発されている。一般に、溶媒抽出
法は、溶媒の消費量が多く、乳化をおこしたり、濃縮に
時間がかかるなど、不都合な点も少なくない。そこで、
いくつかの利点を持つ、カートリッジカラムを使用した
微量増量法の試料前処理法としての有用性について検討
したので報告する。

試 験 方 法

1. 試料および試薬

(1) 試料は、水道水、河川水A(濁度1以下、色度

6)、河川水B(濁度1、色度4、クロロフィルaとして
0.02 mg/ ℓ)、河川水C(濁度3、色度8)を用いた。河
川水AおよびCのクロロフィルaは0.002 mg/ ℓ 以下であ
る。

(2) PAH標準試薬、フルオランテン [F]、ベンゾ
(b)フルオランテン [B(b)F]、ベンゾ(k)フルオラン
テン [B(k)F]、ベンゾ(a)ピレン [B(a)P]、ベンゾ
(ghi)ペリレン [B(ghi)P] は、和光純薬工業株式製を使
用した。各PAH共5~10mgを精秤し、アセトンに溶解
後、全量を100 mlとし、標準原液とした。適宜希釈して、
使用した。

(3) セップバックカートリッジカラムは、Waters
Associates社製を使用した。 C_{18} カートリッジカラムは
あらかじめメタノール5 ml、蒸留水10 mlで洗滌し、シ
リカカートリッジカラムはn-ヘキサン20 mlで洗滌した
後、使用した。

(4) その他の試薬はすべてHPLC用を用いた。

2. 器具および装置

(1) 高速液体クロマトグラフ、島津製作所製LC-
2にRF-510型蛍光検出器を接続した(島津クロマトパ
ックC-R6Aデータ処理装置付)。

(2) マイクロチューブポンプは、東京理化学器械株式
MP-3A型を使用した。

3. 試験溶液の調製

(1) セップバック C_{18} を用いる微量増量法
調製したセップバック C_{18} カートリッジカラムに、マ
イクロチューブポンプを接続し、500 mlの試料を流した
(流速20 ml/min)。メタノール/水(1:1)5 mlで他の有
機物を溶出して除去した後、テトラヒドロフラン2 mlで
PAHを溶出し、HPLC分析用試験溶液とした。

(2) 溶媒抽出による方法

試料500 mlにn-ヘキサン80 mlを加え、5分間振とうし、n-ヘキサン層を分取した。この操作を2回繰り返した後、抽出液を合わせた。蒸留水100 mlで洗滌した後、脱水し、ロータリーエバポレーターで4 mlに濃縮した。クリーンアップは玉川ら⁵⁾の報告に準じて行った。あらかじめn-ヘキサンで洗滌したセップバックシリカカートリッジに通筒し吸着させた後、n-ヘキサン25 mlで溶出した。溶出液を再びロータリーエバポレーターで濃縮乾固後、アセトニトリル2 mlに溶解し、HPLC分析用試験溶液とした。

4. HPLC測定条件

カラム : NOVA-PAK C₁₈ (3.9 mm φ × 15 cm, 5 μm) (Waters Associates社製)

移動相 : アセトニトリル/水(70:30)

流速 : 0.6 ml/min

検出波長 : 290 nm(Ex), 415nm(Em)

試料注入量 : 20 μl

HPLCによる試験溶液中のPAHの定量は、データ処理装置を用い、あらかじめ作成した検量線により、ピーク面積法で行った。検量線は、5~25ng/ml [B(b)F], 10~50ng/ml [F, B(k)F, B(a)P, B(ghi)P]の濃度の標準溶液に調製した。

結果および考察

1. 測定条件の検討

PAHの測定波長の選択に関しては数多くの報告がある。辻ら⁴⁾、および玉川ら⁵⁾は測定波長グループを設け、検出器の波長プログラムを設定し、数種のPAHを同一波長で測定し良い結果を得ている。Takatsukiら⁶⁾は、370nm(Ex)-410nm(Em)の測定波長を用い、中川ら⁷⁾は384nm(Ex)-406nm(Em)で測定している。又、鈴木ら⁸⁾は、290nm(Ex)-415nm(Em)で大気中のPAHの測定を行っている。これらを参考にして、種々の測定波長での各PAHの感度と相互分離について検討した

結果、測定波長は290nm(Ex)-415nm(Em)と決定した。

カラムは逆相分配型、C₁₈系カラム4種(Nucleosil C₁₈, LiChrosorb RP-18, SHODEX DS-613, NOVA-PAK C₁₈)を用いて比較検討した。その結果、分離能および感度とも優れているNOVA-PAK C₁₈を使用することとした。

溶離液は種々の混合比のアセトニトリル-水系を用い、各PAHの保持時間と分離能、ピーク形状、感度について検討したところ、アセトニトリル/水(70:30)が良好な結果を示したため、移動相にはこの溶離液を用いることとした。

2. カートリッジカラムを用いる前処理法の検討

カートリッジカラムを用いる微量増量法は、溶媒抽出法に比較して、ガラス器具、溶媒、試薬の使用量が少なく済み、水性溶媒中から目的物質を直接濃縮できること、又、分析操作が短くなることなど、いくつかの利点が明らかにされている³⁾。そこで、水性溶媒中のPAHの前処理法として使用するための溶出溶媒の種類とその量について検討した。

調製したセップバックC₁₈カートリッジカラムに、PAH混合アセトン溶液50μl [F:60ng, B(b)F:25ng, B(k)F:25ng, B(a)P:35ng, B(ghi)P:100ng]を負荷し、溶媒2 mlを用いて、PAHの溶出を検討した。溶出溶媒は、極性、非極性溶媒とよく混和するメタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフランを選んだ。その結果、テトラヒドロフランによる溶出が最も優れており、ついで、アセトン、メタノール、アセトニトリルの順であった(表1)。つぎに、PAHの負荷量を変えて、テトラヒドロフランで溶出したところ、高負荷量でも溶媒量は2 mlでほぼ全量溶出されることがわかった(表2)。

3. 添加回収試験

試料500 mlに5種のPAHの混合アセトン溶液50μl [F:60ng, B(b)F:25ng, B(k)F:25ng, B(a)P:35ng, B(ghi)P:100ng]を加えて混合し、試験溶液の調製(1)に示した方法により分析を行い回収率を求めた。

表1 セップバックC₁₈カートリッジカラムからのPAHの溶出

PAH	負荷量 (ng)	溶出率 (%)			
		メタノール	アセトン	アセトニトリル	テトラヒドロフラン
F	60	76.4	85.6	77.9	100
B(b)F	25	47.0	69.7	53.7	100
B(k)F	25	61.1	82.9	59.1	100
B(a)P	35	65.3	79.9	62.0	100
B(ghi)P	100	67.3	80.6	50.7	100

表2 セットバックC₁₈カートリッジカラムからのテトラヒドロフランによるPAHの溶出

PAH	負荷量 μg	溶出率 (%)			
		0 ~ 1	1 ~ 2	2 ~ 3 ml	total
F	1.2	51.6	46.0	2.4	100
B(b)F	0.5	51.1	47.5	1.4	100
B(k)F	0.5	46.9	50.3	2.8	100
B(a)P	0.7	50.5	49.2	0.3	100
B(ghi)P	2.0	40.2	57.3	2.5	100
F	0.12	68.5	31.5		100
B(b)F	0.05	44.6	55.4		100
B(k)F	0.05	66.1	33.9		100
B(a)P	0.07	58.6	41.4		100
B(ghi)P	0.20	59.8	40.2		100
F	0.024	100			100
B(b)F	0.010	100			100
B(k)F	0.010	100			100
B(a)P	0.014	100			100
B(ghi)P	0.040	100			100

まず、水道水および河川水での添加回収実験にさきだち、蒸留水にPAHの混合アセトン溶液を添加して、回収実験を行った。PAHは全く回収されず、水中の有機物質等とPAHの間に何らかの関連があるものと考えられた。

水道水に添加した回収実験では、4種の溶媒による溶出を比較したところ、テトラヒドロフランによる溶出がメタノール、アセトニトリル、アセトンに比べて優れていた(表3)。

河川水でのPAHの添加回収率(溶出溶媒:テトラヒドロフラン)は河川水Aに添加した時、66.8~80.3%であった。藻類が繁殖している河川水Bでは、33.6~75.1

%, 泥などによりやや濁度のある河川水Cでは、48.9~69.1%と回収率は低下した。抽出法と比較すると、回収率、再現性とも低かった(表4)。澄明な試料では、多数の試料処理を器具をあまり使用せず、速やかに行うことができるため、迅速性を要する簡易検査法としては適切であると考えられた。又、後2者の河川水では、次第にカートリッジカラムに藻類等による目づまりが生じ、試料の流入速度は遅くなった。来雑物などにより濁度の高い試料では、カートリッジカラムによる微量増量法より溶媒抽出法の方が適していると考えられた。

カートリッジカラムとして、C₁₈プリセップ〔ガスクロ工業株製〕を使用したところ、セットバックC₁₈カー

表3 水道水での添加回収試験(溶出溶媒:メタノール, アセトン, アセトニトリル, テトラヒドロフラン)

PAH	添加量 ng	回収率 (%)							
		メタノール		アセトン		アセトニトリル		テトラヒドロフラン	
		\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
F	60	50.5	6.7	58.3	3.5	53.7	8.9	84.3	5.3
B(b)F	25	39.3	2.9	43.8	4.6	37.7	7.2	74.3	5.8
B(k)F	25	40.2	8.1	38.8	4.3	36.7	6.8	77.1	6.3
B(a)P	35	27.1	9.3	36.5	9.3	26.7	9.2	67.7	6.4
B(ghi)P	100	31.6	6.3	39.7	2.4	31.3	8.3	66.9	2.2

n=4

表4 河川水での添加回収試験

PAH	添加量 ng	微量増量法による回収率 (%)						溶媒抽出法による回収率 (%)					
		A		B		C		A		B		C	
		\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
F	60	80.3	8.0	75.1	6.6	66.1	6.0	99.7	2.3	93.2	4.6	87.3	3.1
B(b)F	25	72.6	8.7	67.6	11.9	69.1	7.1	96.9	3.5	90.3	6.7	86.9	2.7
B(k)F	25	76.3	10.6	69.0	6.9	60.2	5.4	95.6	1.8	91.7	3.0	90.1	3.9
B(a)P	35	67.2	9.9	62.2	7.0	55.0	7.4	94.8	4.1	90.8	4.8	86.1	4.5
B(ghi)P	100	66.8	10.1	33.6	15.1	48.9	9.3	95.8	3.3	92.2	3.9	90.2	3.6

A (濁度1以下、色度6) B (濁度1、色度4、クロロフィルa=0.02mg/l) C (濁度3、色度8) n=4

A、C共 クロロフィルa=0.002mg/l以下

トリッジよりも目づまりがはやく、試料の流入に支障をきたした。C₁₈ プリセップの方が充填粒子が細かいためと考えられた。なお、カートリッジカラムからの PAH の溶出の際、テトラヒドロフランを用いた場合、溶出液に着色が認められたが、HPLC 分析上、問題はなかった。

まとめ

カートリッジカラムを用いた水中の PAH の簡易な濃縮分析法について検討した。分析対象とした PAH は5種類(F, B(b)F, B(k)F, B(a)P, B(ghi)P)であった。試料の流入速度は20 ml/min、カートリッジカラムからの溶出溶媒はテトラヒドロフランが優れており、溶出量は2 mlで十分であった。溶媒抽出法と比較すると、カートリッジカラムを用いる微量増量法は、回収率、再現性などの点で劣った。しかしながら、本法は簡単、迅速であり、澄明で、来雑物の少ない水性試料の分析には適していると考えられた。

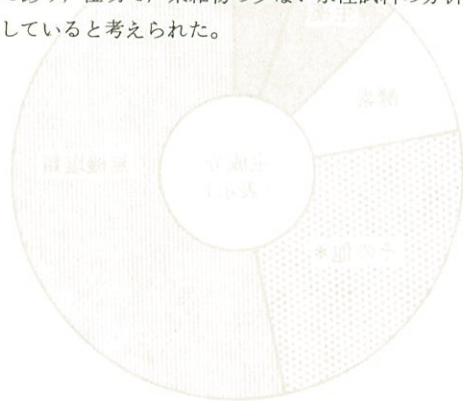


図1 市販のバスソルトの組成成分の割合を示した円グラフ

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 1980, 79, 金原出版(1980)
- 2) 日本水道協会抄録委員会訳, 八木正一, 佐安戸安好, 真柄泰基監修：水道協会雑誌 54, 67 (1985)
- 3) 日本ウォーターズリミテッド：ウォーターズ印刷物Q 04 用廃水に含まれる微量有機物の迅速濃縮法(1983)
- 4) 辻功, 小出圭子, 森山秀樹, 田辺潔, 松下秀鶴：食衛誌 26, 50~55 (1985)
- 5) 玉川勝美, 大金由夫, 加藤由美, 三島靖子, 関敏彦, 角田行：衛生化学 32, 475~477 (1986)
- 6) Keigo Takatsuki, Shigeru Suzuki, Nobutoshi Sato and Isamu Ushizawa：J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 945~949 (1985)
- 7) 中川友夫, 佐藤洋子, 渡辺愛, 河村太郎, 森田昌敏：衛生化学 26, 286~293 (1980)
- 8) 鈴木寿一, 坪井弘, 塩田恒雄, 前田博之, 富所謙吉, 高杉信男：札幌市衛研報 13, 71~82 (1985)