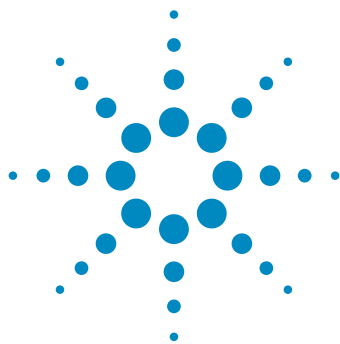




Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution を用いた 未精製油中の多環芳香族炭化水素の分析

アプリケーションノート

エネルギーと化学

著者

Gerd Vanhoenacker, Frank David, and Pat Sandra
Research Institute for Chromatography
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution を用いて、コンプリヘンシブ 2D-LC (LC x LC) による鉱物油由来の多環芳香族炭化水素 (polyaromatic hydrocarbon, PAHs) フラクシオンの分析を行いました。未置換 PAHs、アルキル置換 PAHs、ヘテロ環 PAHs から成るこのフラクシオンの複雑さは、1D-LC のピークキャパシティ (分離能力) を大きく上回っています。

シアノプロピルカラムを一次元目に、PAH 用カラムを二次元目に使用すると、高い直行性とその結果として大きなピークキャパシティが得られました。検出器には DAD と FLD を用いました。このアプリケーションノートでは、鉱物油中の PAHs フラクシオン分析における 2D-LC の有用性を示しています。



Agilent Technologies

はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAHs) は環境中、食品中に存在する汚染物質としてよく知られています。PAHs は、ほぼ自然または人為的な燃焼に起因しています。今日まで環境サンプル(水、土壌、空気、堆積物)中の PAHs の微量分析は、特定の 16 種の未置換 PAHs のみが主に注目されていました (fluoranthene, chrysene, benzo(a)pyrene, benzo(a)fluoranthene など)。分析法は、GC/MS (シングル四重極、トリプル四重極)、もしくは HPLC と DAD、FLD を組み合わせたものです。

特定の PAHs の発がん性が明らかになり、PCDD や PCDF、PCB と同様に、毒性等価係数 (TEF) はサンプル中の全 PAHs 量により測定しています。

最近、アルキル置換 PAHs の毒性が懸念されてきています。実際に、ディーゼル油、鉱物油、未精製油などの石油製品中の総 PAHs が示す毒性に対して、置換 PAHs は従来分析されてきた未置換 PAHs よりはるかに大きく影響します。このことは、ESFA (欧州食品安全機関) による食品中の鉱物油炭化水素に関する科学的見解からも理解できます¹。食品やパッケージ原料中の鉱物油分析では、固相抽出または順相 HPLC を用いて芳香族フラクション (mineral oil aromatic hydrocarbons, MOAH) から飽和炭化水素フラクション (mineral oil saturated hydrocarbons, MOSH) を分離後、GC-FID 法が使用されています。

MOSH に関してはよく調べられていますが、MOAH に関する情報は不足しています。これは MOAH の毒性が MOSH の毒性より大幅に高いという事実に矛盾しています。

芳香族、多環芳香族フラクションは、2 - 6 環の未置換 PAHs、アルキル置換 PAHs、ヘテロ環 PAHs (dibenzothiophene など)、アルキル置換ヘテロ環 PAHs、そしておそらくより極性の高い水酸化 PAHs、アミノ PAHs、ニトロ PAHs などを含んでいます。この複雑さゆえに、分離能の高い分離技術が求められています。MOSH と MOAH は、ほとんど GC×GC、GC×GC/MS により

分析されてきましたが、コンプリヘンシブ LC×LC システムは優れた相補的技術となります。特に 6 環のように分子量の大きい PAHs が簡単に分析でき、FLD による選択的高感度分析ができます。

2 つの分離モードの結合 (疎水性による分離と環の数に応じた分離) は特に鉱物油中の芳香族フラクション分析に有用です。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 を用いた LC×LC 手法を紹介します。

分析条件

サンプルとサンプル前処理

スタンダード溶液は、16 種 PAHs の 2 mg/mL アセトン/ベンゼン溶液 (PAH Mix 25, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany) をアセトンで希釈し 2 µg/mL としました。

未精製油から、ヘキサンとニトロメタンを使用した液 - 液抽出により多芳香族フラクションを単離しました。

100 mg の未精製油を 5 mL ヘキサンに溶解しました。溶解後、5 mL のニトロメタンを加えて液 - 液抽出を行いました。上部のヘキサン層は飽和炭化水素の大半を含み、下部のニトロメタン層はこの分析に使用する極性の高い芳香族フラクションです。未精製油の中で、芳香族フラクションは全体のおよそ 5-30 % です¹。

装置

Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A): 一次元目の分離に使用
- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A): 二次元目の分離に使用
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330A): サンプルを冷却
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)

- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A): 標準フローセル
- Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1321B)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)
- Agilent 1290 Infinity 2-ポジション/4-ポジション duo-valve (G4236A)

データ処理

- Agilent Open LAB edition、version C.01.07
1290 Infinity 2D-LC software、version A.01.02
(ChemStation アドオンソフトウェア)

メソッド

一次元目	
カラム	Agilent ZORBAX SB-CN, 2.1 × 150 mm, 5 µm (p/n 883700-905)
溶媒 A	水
溶媒 B	メタノール
流量	100 µL/min
グラジエント	0 minutes – 40 %B 80 minutes – 100%B 85 minutes – 100 %B
ポストタイム	10 minutes – 40 %B
カラム温度	40 ° C
二次元目	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH, 3.0 × 50 mm, 1.8 µm (p/n 959757-318)
溶媒 A	水
溶媒 B	アセトニトリル
流量	2 mL/min
アイドル流量	0.3 mL/min
初期グラジエント	0 minutes – 50%B 0.35 minutes – 70%B 0.4 minutes – 70%B 0.41 minutes – 50%B
グラジエント	0 minutes – 50%B から 70 minutes – 100%B
モジュレーション	0.35 minutes – 40 %B から 55 minutes – 70 %B
カラム温度	40 ° C
モジュレーション	
モジュレーション	7 ~ 85 分
ループ	60-µL ループ 2 本、直列
モジュレーション時間	0.50 分
注入 ^a	
注入量	1 µL (注入プログラム, 1-µL water plug と混合)
ニードル洗浄	5 秒フラッシュポート (メタノール/アセトン)
検出 DAD ^a	
波長	シグナル 220/10 nm
データレート	80 Hz
検出 FLD ^b	
波長	マルチエミッションモード シグナル A: Ex 260 nm/Em 350 nm シグナル B: Ex 260 nm/Em 430 nm シグナル C: Ex 260 nm/Em 500 nm
データレート	37.04 Hz
PMT ゲイン	7

^a サンプルをウォータープラグとともに注入し、注入溶媒の強さによるピークブロードニングやピーク割れを回避しました。

^b 二次元目カラムの出口にゼロデッドボリューム T コネクタを設置し、DAD と FLD の間でフローをスプリットしました。0.12-mm PEEK 赤色チューブを用いて、検出器に接続しました。T コネクタから FLD までのチューブ長は DAD までのチューブの 2 倍の長さであり、DAD/FLD スプリット比はおおよそ 2:1 となりました。

- GC Image LCxLC Edition software for 2D-LC data analysis (GC Image 社)

結果と考察

PAHs は、一般的に PAH 用カラムで DAD および FLD を用いて分析されます。PAHs 用カラムで水/アセトニトリルによるグラジエント溶出を行うと、主要な 16 種の未置換 PAHs を完全に分離することができます。このサンプルを別の逆相分離系 (異なるカラムと異なるグラジエント条件) で分析すると、いくつかの成分は共溶出することがあります。より複雑な PAHs サンプル (PAHs の種類が多い、マトリックスが複雑) の分析は非常に難しく、より高いクロマトグラフィーの選択性とピークキャパシティが、そしてもし可能ならより選択性の高い検出器が必要となります。ZORBAX SB-CN カラムを用いて、16 種の PAHs 標準液と未精製油を分析した結果を図 1 に示します (分析条件は 2D-LC の最終条件とは異なります)。実サンプルが一次元の LC 分析にとって複雑すぎることが明らかです。サンプルの複雑さの原因は、未精製油には置換 PAHs に加えて、未置換 PAHs、ヘテロ環 PAHs も含まれるからです。置換 PAHs はほとんどアルキル置換体であり、置換の程度、アルキル鎖長、分岐、置換基の位置の多様性を考慮すると、大きな化合物群となります。これらのことは、未精製油中の PAHs が極めて複雑な組成である原因となっており、すべての構成成分を完全分離するクロマトグラフィー手法はありません。PAHs フラクションのキャラクタリゼーションには、芳香環の数や相対置換度、より極性の高い PAHs の存在について情報を得ることが重要です。

一次元目の分離に使用した SB-CN カラムで、興味深い分離が得られました。16 種類の PAHs の溶出順は、従来の逆相カラムで得られる通

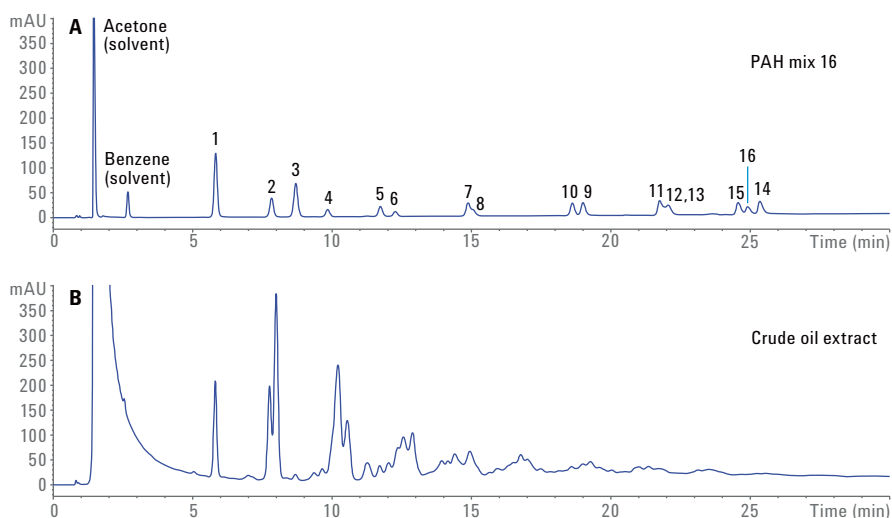


図 1. PAH 標準混合物とサンプル抽出物との一次元分析の比較。カラムは Agilent ZORBAX SB-CN、2.1 × 150 mm、5 μm、流量は 0.3 mL/min、グラジエントは 0 - 40 分まで 40 - 100 % メタノール水溶液。ピーク番号については表 1 を参照してください。

表 1. PAH 16 種類のピーク番号 (ピーク番号は PAH カラムの溶出順序の予測に従って割り当てられます)。

ピーク番号	化合物名
1	Naphthalene
2	Acenaphthylene
3	Acenaphthene
4	Fluorene
5	Phenanthrene
6	Anthracene
7	Fluoranthene
8	Pyrene
9	Benzo(a)anthracene
10	Chrysene
11	Benzo(b)fluoranthene
12	Benzo(k)fluoranthene
13	Benzo(a)pyrene
14	Dibenzo(ah)anthracene
15	Benzo(ghi)perylene
16	Indeno(1,2,3-cd)pyrene

常の溶出順 (表 1) とは大きく異なります。このことが 2D-LC における直行性をもたらします。

最適なクロマト条件や UHPLC の使用により、未精製油の分析は改善すると考えられます。しかし、ピークキャパシティの劇的な改善にはコンプリヘンシブ 2D-LC の使用がより有効です。一次元目に ZORBAX SB-CN カラム (移動相: 水/メタノール)、二次元目に典型的な PAHs 分析条件 (Eclipse PAH カラムと水/アセトニトリル系の移動相) を組み合わせました。PAH カラムでは、同じ環数の化合物群 (ベンゾフルオランテン異性体のような) が良好に分離されます。

SB-CN/Eclipse PAH による 2D-LC から作成した等高線図を図 2B に示します。比較のために、SB-CN カラムによる一次元の分離を図 2A に示します。2phenanthrene/anthracene、benzoanthracene/chrysene/benzofluoranthenes で良好な分離が得られました。Benzo(ghi)perylene と indeno(1,2,3.cd)pyrene だけが完全分離できませんでした。つづいて、鉱物油の芳香族フラク

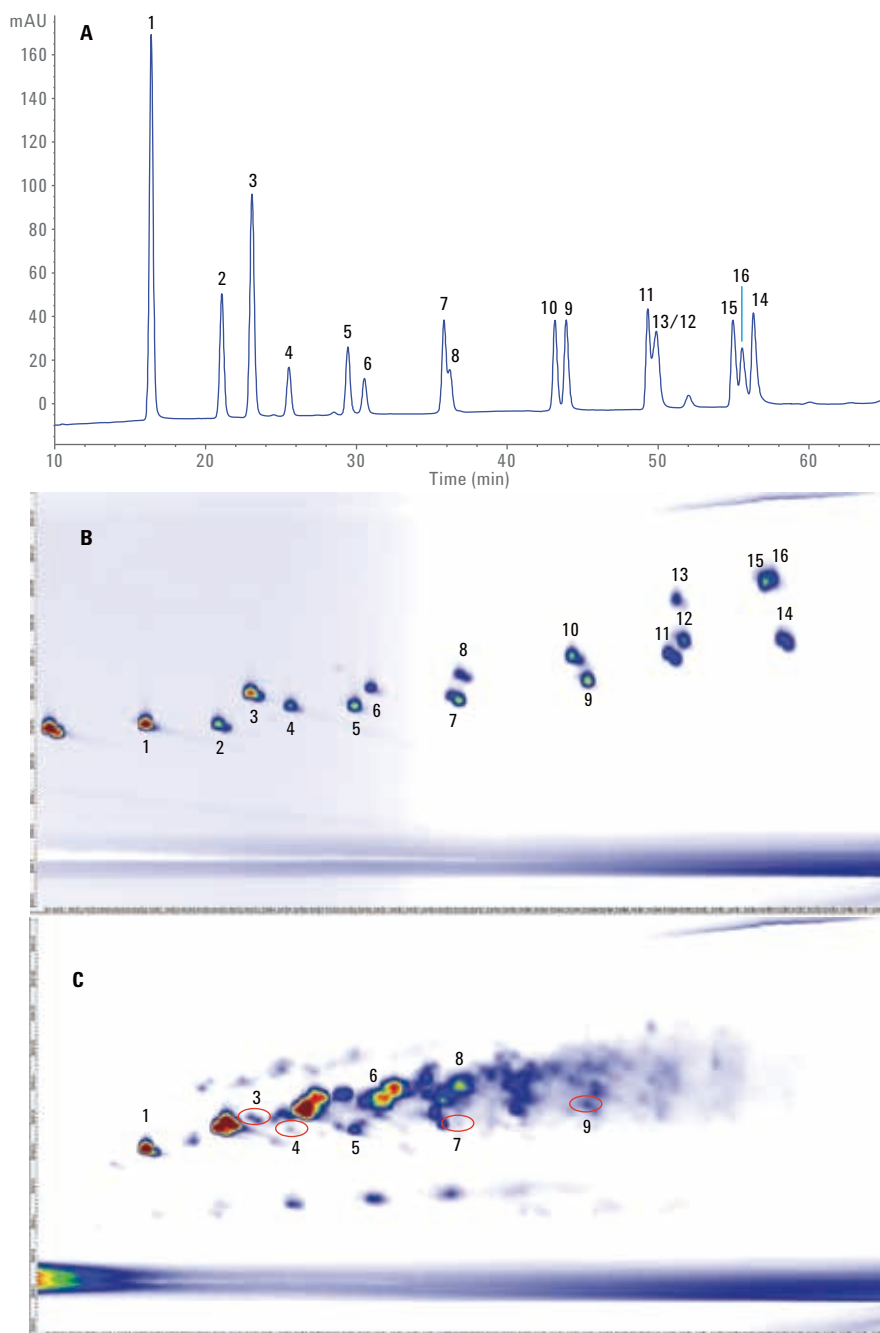


図 2.(A) 標準混合物の一次元 LC 分析、(B) 標準混合物の LCxLC 分析、および (C) サンプル抽出物の LCxLC 分析の比較。シグナルは DAD 220 nm。

ションを同条件で分析し、得られた 2D-LC の等高線図を図 2C に示します。

図 3、4、5 は蛍光波長の異なる FLD のクロマトグラムです。DAD では検出していないいくつかの置換 PAHs をはっきりと検出できました。一つの例として、二次元目カラムにおいて、未置換 PAHs よりも先に溶出する一連の PAHs があります。これらは FLD によって、よりはっきりと検出することができます。さらに、膨大な数の化合物があり、PAHs 標準液中の化合物の周辺にちらばって存在しています。鉱物油抽出物に見いだされた化合物の同定には、例えば APPI-MS と接続するなどさらなる検討が必要です。しかし、相対的な溶出パターンからアルキル置換 PAHs の存在が予想されます。これらの結果から、未精製油の PAHs フラクションがとて複雑な混合物であることがはっきりとわかります。

同定されていない化合物がありますが、Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution がこのような分析に

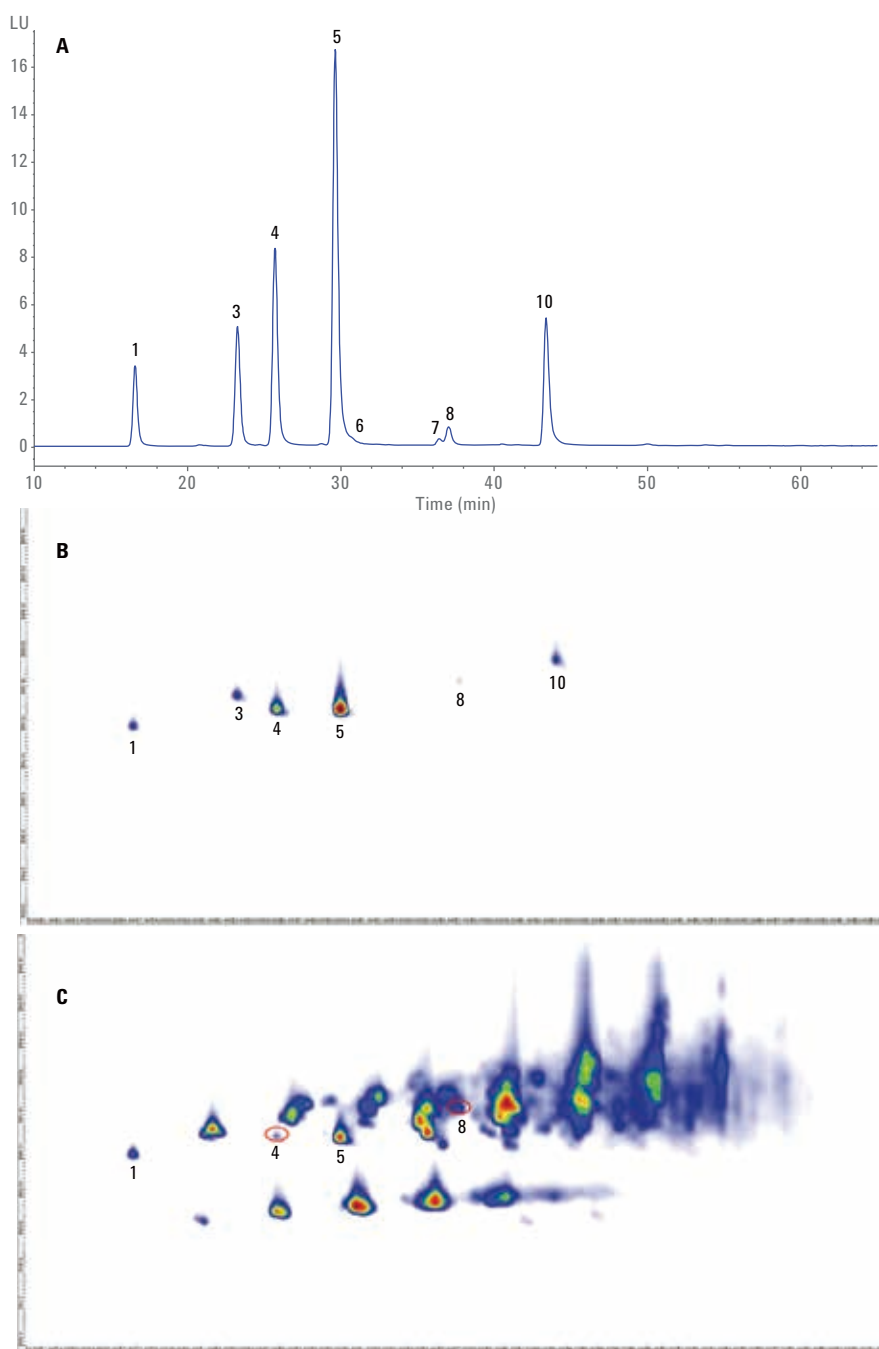


図 3.(A) 標準混合物の一次元 LC 分析、(B) 標準混合物の LCxLC 分析、および (C) サンプル抽出物の LCxLC 分析の比較。シグナルは FLD Ex 260 nm/Em 350 nm。

対して高い能力を有していることが明らかになりました。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution (DADとFLD) により、鉱物油中の芳香族フラクション中の PAHs のプロファイル調べられることを示しました。この方法は、未精製油、瀝青、その他鉱物油中の PAHs のプロファイルの調査に有用です。この 2D-LC 法と APPI-MS を組み合わせることで、検出された PAHs の構造解析をさらに進めることができます。

Reference

1. EFSA Journal 2012; 10(6):2704, European Food Safety Authority <http://www.efsa.europa.eu/fr/search/doc/2704.pdf>

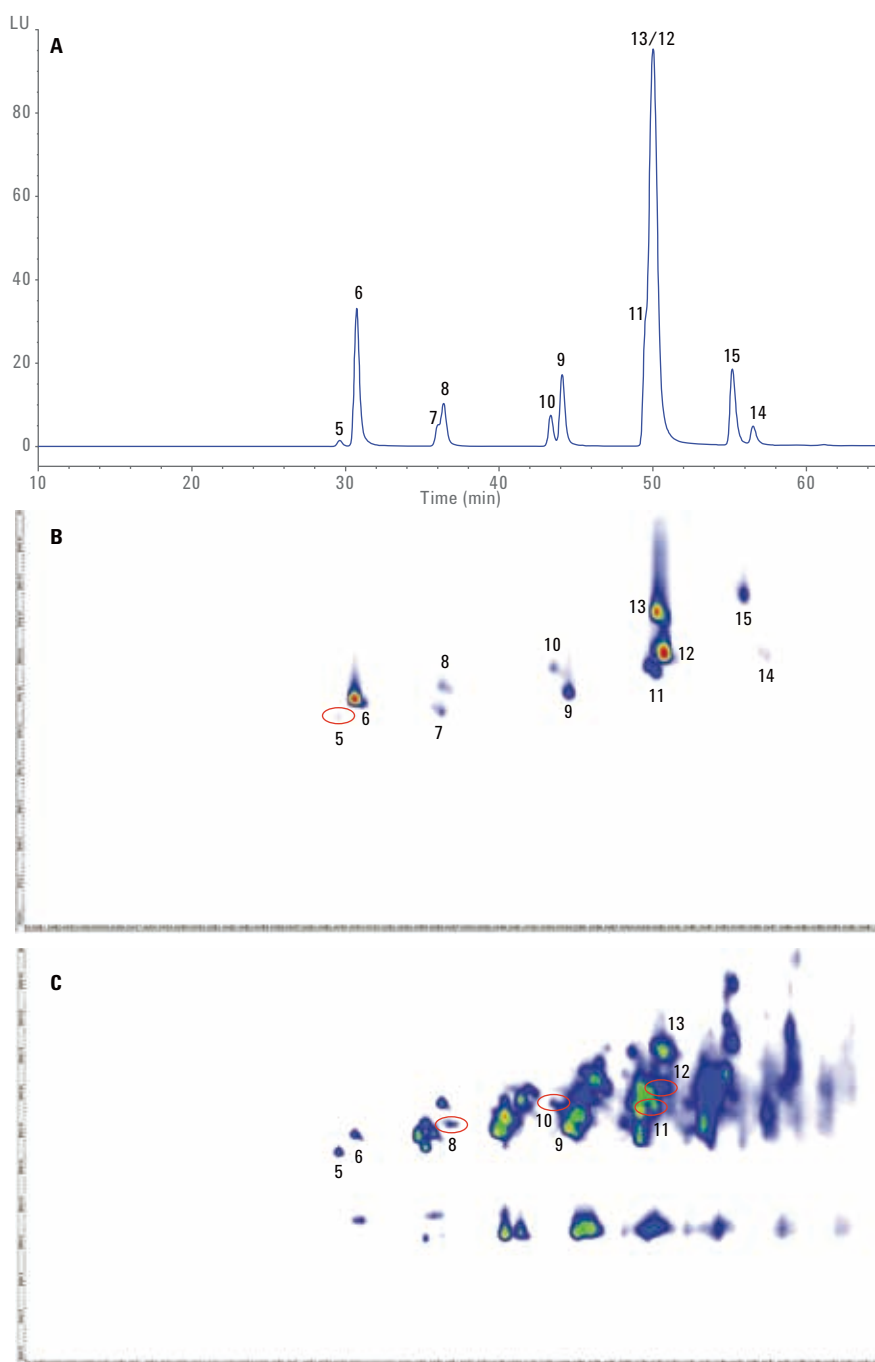


図 4.(A) 標準混合物の一次元 LC 分析、(B) 標準混合物の LCxLC 分析、および (C) サンプル抽出物の LCxLC 分析の比較。シグナルは FLD Ex 260 nm/Em 430 nm。

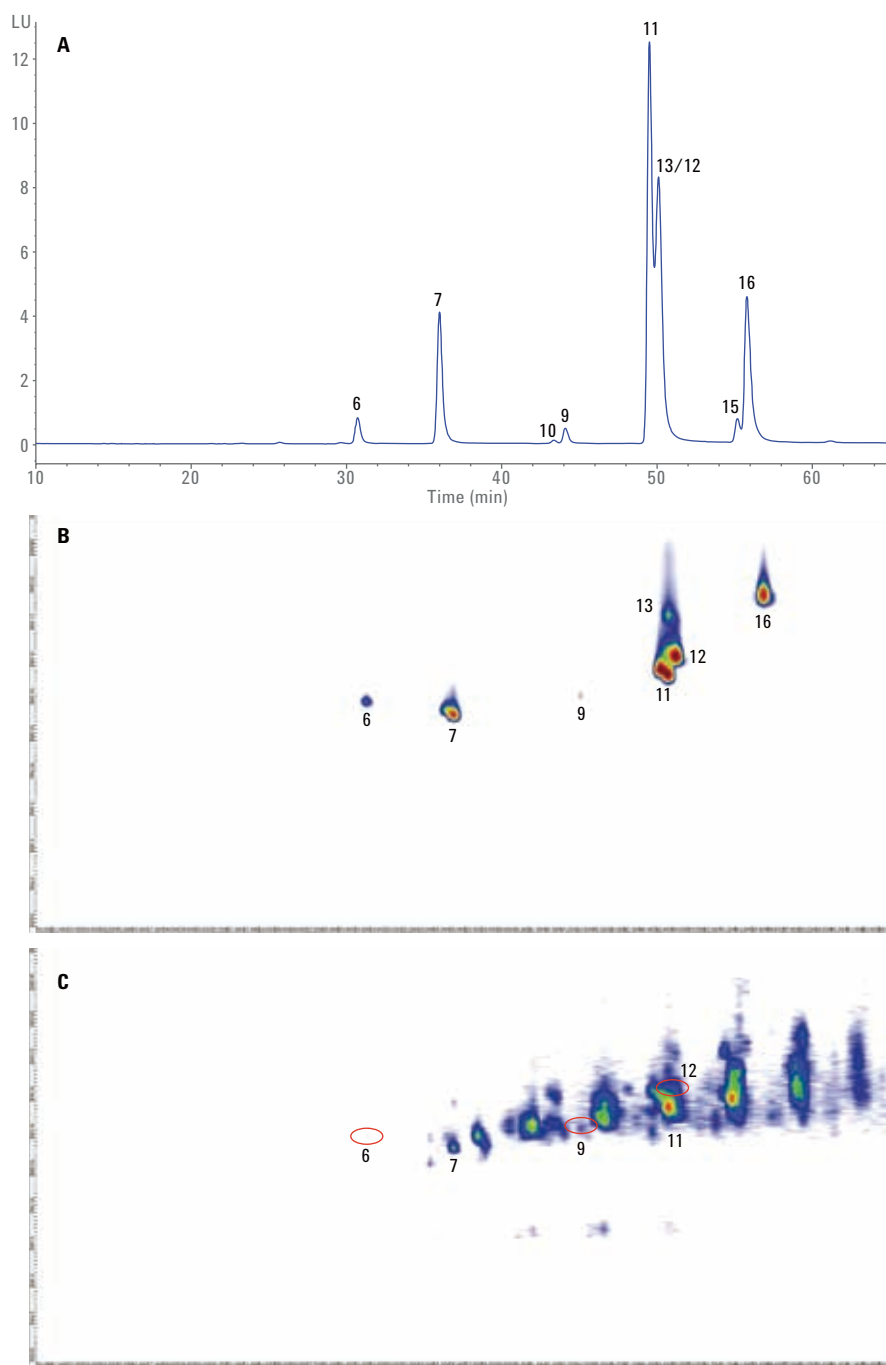


図 5.(A) 標準混合物の一次元 LC 分析、(B) 標準混合物の LCxLC 分析、および (C) サンプル抽出物の LCxLC 分析の比較。シグナルは FLD Ex 260 nm/Em 500 nm。

www.agilent.com/chem

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Published in Japan, March 1, 2015
5991-5619JAJP



Agilent Technologies