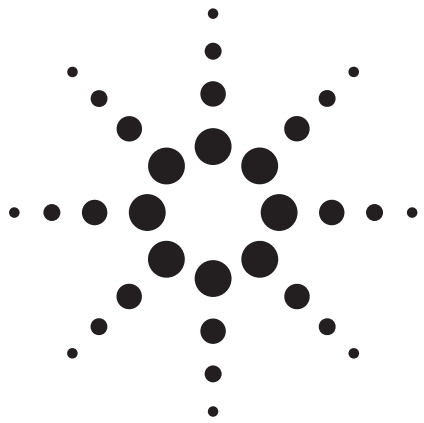


水中に含まれる 多環芳香族炭化水素 (PAH) の ZORBAX Eclipse PAHカラムによる分析



アプリケーション

環境

著者

Rongjie Fu and Yun Zou
Agilent Technologies, Inc.
412 Ying Lun Road
Pu Dong, Shanghai 200131
China

概要

多環芳香族炭化水素 (PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) は、発癌性化合物ですが、煙草、タール、燃料などの不完全燃焼により生じ、環境中にごく普通に存在する化合物です。空気や水、土壌、食品などの各種サンプルに含まれるPAHの分析については、多くの規制当局が分析手法を定めています。水中に含まれる微量PAHを分析するには、非常に高感度の手法が求められます。本論文では、新開発のZORBAX Eclipse PAHカラムを用いた総合的なHPLC手法による水中のPAH分析を紹介いたします。水サンプルの抽出には、AccuBond ODS C18固相抽出 (SPE) カートリッジを使用しました。最適化されたC18結合相により、高レベルの再現性をもたらすEclipse PAH は、ルーチン分析に理想的なカラムです。

はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、環境中のいたるところに存在しています。自然発生したものも、人為的に発生したものも、その発生源は同様であると考えられています。最近の研究により、多くのPAHには、発癌性や変異誘発作用、催奇作用があることが明らかになっています。こうしたことから、環境機関はPAHを要注意化合物とみなし、人体の健康を守るために、水中の許容濃度を厳しく規制しています[1]。

多環芳香族炭化水素は、「多核芳香族炭化水素」(Polynuclear Aromatic Hydrocarbons) とも呼ばれます。現在では、この種の化合物については、PAHという略語が広く使われています。米国環境保護局 (EPA) は、16種類のPAHを「優先汚染物質」と指定し、規制の対象としています。この16種類のPAHについては、廃水 (610[2])、飲料水 (550.1[3])、固形廃棄物 (8310[4]) 中でその存在を同定するだけでなく、定量することが求められています。

米国国立労働安全衛生研究所 (NIOSH) も、PAHの規制手法を定めています。NIOSHのメソッド5506[5]では、17種類のPAHが規制の対象となっています。表1には、規制対象となっている17種類のPAHとその特性の一部を記載しています。



表1[5]. NIOSHメソッド5506に含まれるPAHの化学式と物理的特性

化合物(分子量順)	化学式	分子量	融点 (°C)	沸点 (°C)	水溶解度 mg/L (25 °C)
1	ナフタレン	C ₁₀ H ₈	80.2	218	30
2	アセナフチレン	C ₁₂ H ₈	152.20	92.5	3.9
3	アセナフテン	C ₁₂ H ₁₀	154.21	93.4	3.9
4	フルオレン	C ₁₃ H ₁₀	166.22	115	2
5	アントラセン	C ₁₄ H ₁₀	178.23	215	0.07
6	フェナントレン	C ₁₄ H ₁₀	178.23	99.2	1.2
7	フルオランテン	C ₁₆ H ₁₀	202.26	108	0.26
8	ピレン	C ₁₆ H ₁₀	202.26	151	0.13
9	ベンゾ[a]アントラセン	C ₁₈ H ₁₂	228.29	167	0.01
10	クリセン	C ₁₈ H ₁₂	228.29	258	0.002
11	ベンゾ[b]フルオランテン	C ₂₀ H ₁₂	252.32	168	0.014
12	ベンゾ[k]フルオランテン	C ₂₀ H ₁₂	252.32	217	0.008
13	ベンゾ[a]ピレン	C ₂₀ H ₁₂	252.32	177	0.004
14	ベンゾ[e]ピレン	C ₂₀ H ₁₂	252.32	178	—
15	ベンゾ[ghi]ペリレン	C ₂₂ H ₁₂	276.34	278	—
16	インデノ[1,2,3-cd]ピレン	C ₂₂ H ₁₂	276.34	164	0.0005
17	ジベンゾ[a,h]アントラセン	C ₂₂ H ₁₄	278.35	270	0.00026

—該当なし

実験手法

使用装置

本アプリケーションの実験結果は、すべてAgilent 1200SL Rapid Resolution HPLCシステムを用いて得られたものです。システム構成は以下のとおりです：

G1312B	バイナリSL
G1379B	マイクロデガッサ
G1367C	54 × 2 mLサンプルトレイを搭載した 高性能ウェルプレートオートサンプラ (WPS)
G1316B	カラム恒温槽 (TCC) SL
G1315C	標準フローセルを搭載した ダイオードアレイ検出器 (DAD)
G1321A	蛍光検出器 (FLD)

装置に使用したチューブは、すべて内径0.17 mmです。

1100バイナリシステムや1100および1200クォータナリポンプシステムなどの他の装置でも、この手法を実施できる可能性があります。それについては本アプリケーションでは検証していません。他の装置を使用する場合は、グラジエントに若干の調節を施す必要がある場合があります。

HPLC条件

カラム：	ZORBAX Eclipse PAH, 4.6 mm × 150 mm、3.5 μm (部品番号 959963-918)
移動相：	A 水；B アセトニトリル
グラジエントタイム テーブル：	時間(分) %B
	0.0 50
	2.0 50
	22.0 100
	停止時間28分、ポストラン5分
流速：	1.5 mL/min
DAD：	PW 0.1 min；スリット4 nM； 標準フローセル
シグナルA：	254, 4 nm；Ref off.
FLD：	
タイムテーブル：	PMT=12
	時間(分) Ex(nm) Em(nm)
	0 220 330
	7 210 330
	9.6 250 363
	10.7 250 405
	12 250 460
	13 270 400
	20.2 270 415
	24.3 250 490

標準溶液

EPA 610混合物質からなるPAH標準溶液とベンゾ[e]ピレン標準溶液を、SUPELCO (ペンシルバニア州、米国) から購入しました。EPA 610混合液0.9 mLと1.25 mg/mLのベンゾ(e)ピレン0.1 mLを混合し、分析用原液を作成しました。

原液における各PAHの濃度を表2に示しています。原液をアセトニトリルで希釈し、較正用の標準溶液を作成しました。5ポイントの検量線を作成しました。

表2. 原液における各PAH標準物質の濃度

化合物(分子量順)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1 ナフタレン	900
2 アセナフチレン	1800
3 アセナフテン	900
4 フルオレン	180.1
5 アントラセン	90.2
6 フェナントレン	90.1
7 フルオランテン	180
8 ピレン	89.9
9 ベンゾ[a]アントラセン	89.9
10 クリセン	90.2
11 ベンゾ[b]フルオランテン	180
12 ベンゾ[k]フルオランテン	89.9
13 ベンゾ[a]ピレン	90.1
14 ベンゾ[e]ピレン	125
15 ベンゾ[ghi]ペリレン	179.9
16 インデノ[1,2,3-cd]ピレン	90.1
17 ジベンゾ[a,h]アントラセン	179.9

サンプル前処理

水中の微量PAHを分析するために、AccuBond ODS C18 SPEカートリッジ(部品番号188-1356)を用いて1 Lの水を抽出しました。4等分した10-mLのジクロロメタン(DCM)、メ

タノール、2等分した10-mLの水(HPLCグレード)で順次洗浄し、カートリッジ(0.5 g)を調整しました。

自動固相抽出機を用いて、1-Lの水サンプルを流速2.5 mL/minでSPEカートリッジを通過させ、抽出しました。その後、カートリッジを10 mLのHPLC水で洗浄し、約10分間にわたって窒素を吸引して乾燥させました。乾燥後、PAHサンプルを5-mLのDCMでカートリッジから溶出させ、混合しました。N₂を吹きつけて溶出液を容積1 mLになるまで蒸発させ、アセトニトリル3.0 mLを添加し、更に1.0 mLに濃縮して最終溶液を作成しました[3]。

結果と考察

分離, 検出感度

本アプリケーションでは、ZORBAX Eclipse PAHカラムを用いて、17種類すべてのPAHをベースラインで分離することができました。このカラムで17種類のPAHを分離したクロマトグラムを、図1(DAD)および図2(FLD)に示しています。分析した混合液には、5組の幾何異性体が含まれています(1つ目が5と6、2つ目が7と8、3つ目が9と10、4つ目が11と12と13と14、5つ目が16と17)。これらの一部は、他の逆相PAHカラムでは分離できません。できる場合でも、ベースラインで分離することはできません。Eclipse PAHカラムは、こうした異性体を分離できるように特別に設計された結合相を備えたカラムです。ピーク3と4、ピーク11と12といった近接するピークの分離係数は、すべて2.0を上回りました。

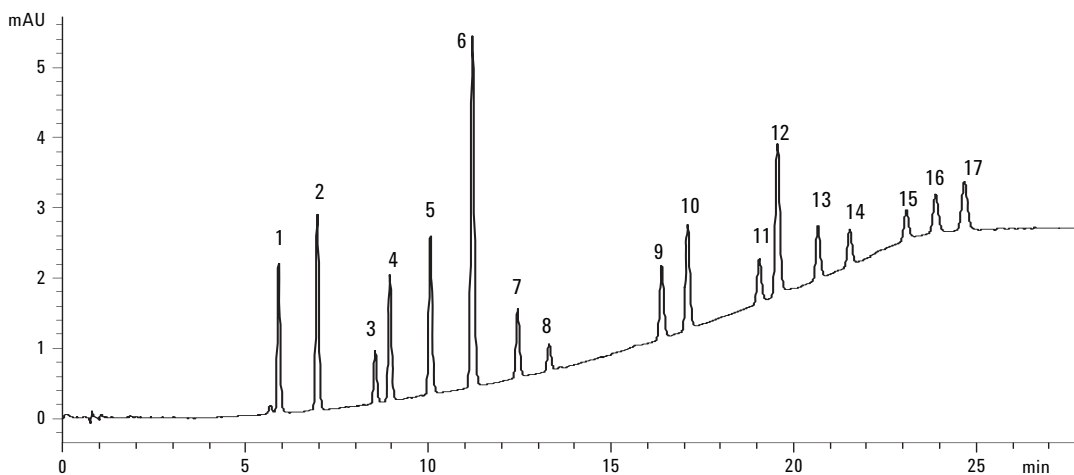


図1. Eclipse PAHカラム、4.6 mm×150 mm、3.5 μm (p/n 959963-918)とDAD-254 nmを用いて分離した17種類のPAHのクロマトグラム

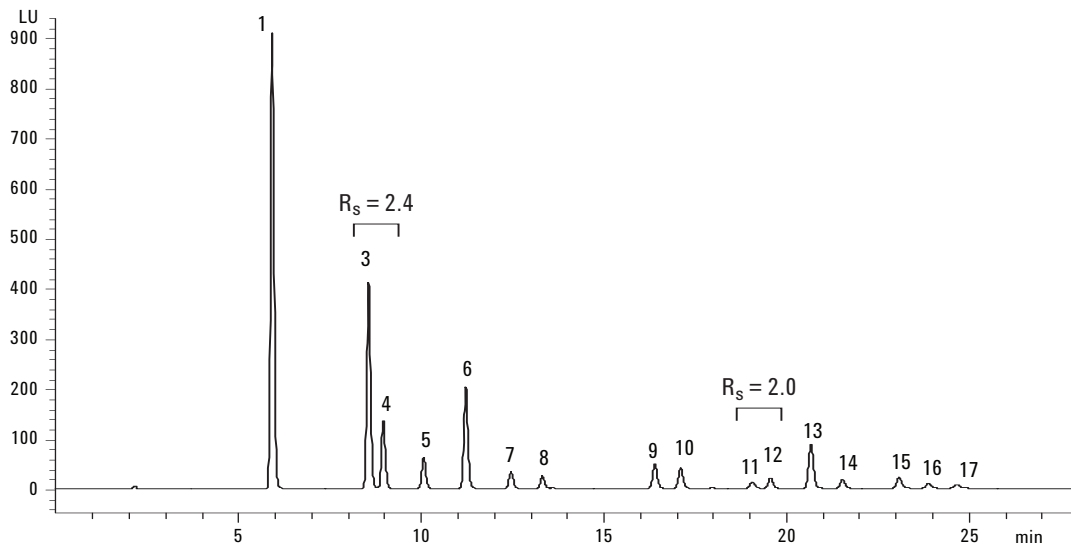


図2. Eclipse PAHカラム、4.6 mm×150 mm、3.5µm (p/n 959963-918)とFLDプログラムを用いて分離した17種類のPAHのクロマトグラム

このアプリケーションでは、検出器にDADとFLDの2種類を使用しました。PAHの微量分析で最大の感度を得るためには、蛍光検出器を推奨します。蛍光検出器を使用すれば、すべてのPAHで最適な励起波長と放出波長が得られます。感度を最大にするために、検出限界 (LOD) が低ピコグラムレベルのFLDプログラムを使用しました。UV吸光度法と比較すると、分析対象物のシグナル/ノイズ比が100倍ほど向上するため、LODも約100倍低くなります。シグナル/ノイズ比を3として算出したFLDおよびDADのLODデータを表3に示しています。

汚染度の高いサンプルの場合、UV可視吸光度ダイオードアレイ検出器が、ピーク同定やピーク純度確認の補助分析ツールとして効果を発揮します。また、アセナフチレンは蛍光を発しないため、この化合物については、UV検出器が必要となります。規制当局が定める多くのメソッドでは、UV-254 nmが採用されていますが、これはすべての化合物に最適な波長とはいえません。一部の論文では、最適なシグナル/ノイズ比を得るために、DAD波長変換プログラムが使用されています[6]。

表3. FLDおよびDADにおける17種類のPAHの理論上LOD (S/N = 3)

化合物 (溶出順)	LOD (FLD) (pg)	LOD (DAD) (pg)
1 ナフタレン	1.93	196.6
2 アセナフチレン	—	521.1
3 アセナフテン	2.64	936.3
4 フルオレン	2.13	774.5
5 フェナントレン	0.54	31.5
6 アントラセン	0.14	16.0
7 フルオランテン	0.62	150.0
8 ピレン	0.24	189.8
9 ベンゾ(a)アントラセン	0.69	56.5
10 クリセン	0.80	41.9
11 ベンゾ(e)ピレン	2.18	133.2
12 ベンゾ(b)フルオランテン	2.35	55.8
13 ベンゾ(k)フルオランテン	0.17	72.6
14 ベンゾ(a)ピレン	0.38	117.0
15 ジベンゾ(a,h)アントラセン	2.11	202.1
16 ベンゾ(g,h,i)ペリレン	1.89	206.5
17 インデノ(1,2,3-c,d)ピレン	1.69	87.0

再現性と直線性

複雑な環境マトリックスに含まれる分析対象物を正確に同定するためには、安定した保持時間 (retention time = RT) が重要です。タイムプログラマブル蛍光検出器を使用する場合、分析中の波長変換を設定するうえでも、RTの安定性がきわめて重要となります。信頼性の高い定量データを得るためには、ピーク面積の精度が重要です。

表4のデータは、Eclipse PAHカラムを用いた繰り返し10回の分析において、おおむね0.1%よりも優れたRT精度が得られることを示しています。FLDおよびDADのピーク面積精度は、相対標準偏差 (RSD) で2%を下回っています。

こうした質の高い結果を実現しているのは、Eclipse PAHカラムのクオリティと1200 SL装置の信頼性の高さです。新開発のEclipse PAHカラムでは、他のEclipse Plusカラムと同じシリカが使われています。このシリカは、最高のピーク形状が得られるように処理された新型の高純度シリカで、PAHサンプルをはじめとするあらゆる種類のサンプルで、最高レベルの分析効率と再現性を実現します。

表4. Eclipse PAH (4.6 mm×150 mm、3.5µm) カラムにおけるピーク面積と保持時間の再現性

化合物 (溶出順)	DAD 面積RSD (%) (N = 10)	FLD 面積RSD (%) (N = 10)	DAD RT RSD (%) (N = 10)	FLD RT RSD (%) (N = 10)
1 ナフタレン	0.39	0.70	0.04	0.07
2 アセナフチレン	0.44	—	0.06	—
3 アセナフテン	0.56	0.84	0.05	0.05
4 フルオレン	0.61	0.77	0.05	0.05
5 フェナントレン	0.47	0.45	0.04	0.11
6 アントラセン	0.57	0.27	0.04	0.04
7 フルオランテン	0.67	0.45	0.03	0.04
8 ピレン	1.44	0.27	0.03	0.02
9 ベンゾ(a)アントラセン	0.48	0.36	0.09	0.02
10 クリセン	0.41	0.30	0.02	0.02
11 ベンゾ(e)ピレン	1.15	0.29	0.02	0.02
12 ベンゾ(b)フルオランテン	0.42	0.41	0.01	0.02
13 ベンゾ(k)フルオランテン	0.74	0.47	0.01	0.02
14 ベンゾ(a)ピレン	1.41	0.98	0.009	0.02
15 ジベンゾ(a,h)アントラセン	1.02	0.39	0.007	0.01
16 ベンゾ(g,h,i)ペリレン	1.12	0.89	0.01	0.01
17 インデノ(1,2,3-c,d)ピレン	0.75	0.39	0.008	0.01

表5に示したDADおよびFLDの直線性係数は、すべてのPAHで1.00にきわめて近い優れた値となっています。図3には、0.011 ngから0.18 ngの範囲におけるベンゾ(a)ピレンの直線プロットを示しています。相関係数は0.99990で、飲料水に含まれる低濃度PAHの定量において、優れた直線性と直線性範囲を実現しています。

表5. DADおよびFLDを用いた場合におけるEclipse PAHカラムの直線性係数

化合物 (溶出順)	DADの 直線性係数(r2)	直線性範囲 (ng)	FLDの 直線性係数(r2)	直線性範囲 (ng)
1 ナフタレン	0.9999	1.76 – 56.25	0.9999	0.11-1.76
2 アセナフチレン	0.9999	3.52 – 112.5	—	—
3 アセナフテン	0.9999	1.76 – 56.25	0.9998	0.22 – 3.52
4 フルオレン	0.9999	3.52 – 112.5	0.9993	0.11 – 1.76
5 フェナントレン	0.9999	0.18 – 5.63	0.9998	0.22 – 3.52
6 アントラセン	0.9999	0.18 – 5.64	0.9998	0.011 – 0.176
7 フルオランテン	0.9999	0.35 – 11.25	0.9999	0.011 – 0.176
8 ピレン	0.9990	0.35 – 11.25	0.9999	0.022 – 0.352
9 ベンゾ(a)アントラセン	0.9998	0.18 – 5.62	0.9999	0.011 – 0.176
10 クリセン	0.9999	0.18 – 5.64	0.9999	0.011 – 0.176
11 ベンゾ(e)ピレン	0.9993	0.49 – 15.62	0.9999	0.011 – 0.176
12 ベンゾ(b)フルオランテン	0.9999	0.35 – 11.25	0.9999	0.015 – 0.244
13 ベンゾ(k)フルオランテン	0.9994	0.35 – 11.25	0.9999	0.022 – 0.352
14 ベンゾ(a)ピレン	0.9994	1.41 – 45.0	0.9999	0.011 – 0.176
15 ジベンゾ(a,h)アントラセン	0.9993	0.70 – 22.5	0.9999	0.022 – 0.352
16 ベンゾ(g,h,i)ペリレン	0.9990	0.70 – 22.5	0.9996	0.022 – 0.352
17 インデノ(1,2,3-c,d)ピレン	0.9994	0.35 – 11.25	0.9996	0.011 – 0.176

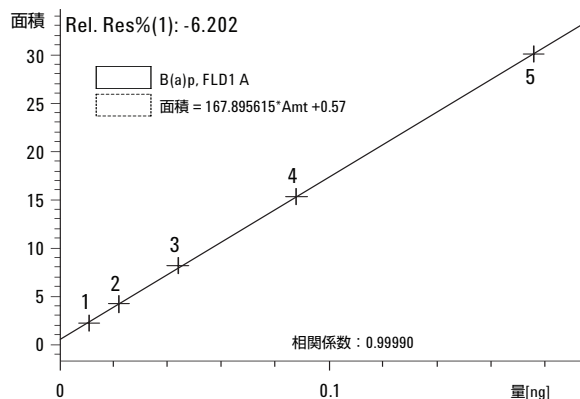


図3. FLDプログラムによるベンゾ(a)ピレンの直線性プロット

回収率

表6には、1 LのHPLC水に分析用原液10 μ Lを添加した溶液の回収率データを示しています。回収サンプルは、「サンプル前処理」の項で述べた手順に従って作成しました。PAHは水に溶けにくく、特に溶出の遅い化合物ほど水溶性が低いことから、STDを水に添加する際は、一般に、メタノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、あるいはこれらの混合液などが使用されます。本手法では、20%のメタノールを使用しました。各化合物の回収率データは、化合物2、3、4、5、6、7で85%を上回りましたが、化合物1、10、11、12、13、15、16、17ではそれよりも低く、35~49%の範囲内でした。ナフタレンは揮発性なので、窒素を吹き付けて濃縮する場合、回収率が低くなります。また、溶出の遅い化合物で回収率が低くなっているのは、添加溶媒に20%メタノールを用いたものの、溶解が不十分だったためと考えられます。

表6. 全17種類のPAHの回収率データ (n = 3)

化合物 (溶出順)	FLD 回収率 (%)	RSD (%)	DAD 回収率 (%)	RSD (%)
1 ナフタレン	42.6	1.48	44.0	5.9
2 アセナフチレン	-	-	97.1	5.3
3 アセナフテン	97.2	4.38	95.7	4.4
4 フルオレン	100.6	5.5	100.4	6.1
5 フェナントレン	95.4	5.11	101.6	5.6
6 アントラセン	88.3	3.73	90.9	4.7
7 フルオランテン	94.1	3.60	92.4	4.5
8 ピレン	88.4	4.30	83.5	2.4
9 ベンゾ(a)アントラセン	61.6	1.74	60.3	5.8
10 クリセン	48.0	2.99	48.9	6.1
11 ベンゾ(e)ピレン	40.1	4.97	40.4	12.8
12 ベンゾ(b)フルオランテン	48.7	2.06	48.8	3.4
13 ベンゾ(k)フルオランテン	42.0	3.81	45.8	1.7
14 ベンゾ(a)ピレン	58.8	3.59	57.6	10.0
15 ジベンゾ(a,h)アントラセン	39.1	6.36	35.2	11.1
16 ベンゾ(g,h,i)ペリレン	39.2	2.34	45.6	4.8
17 インデノ(1,2,3-c,d)ピレン	46.7	1.57	39.8	6.8

揮発性のナフタレンの回収率を高めるために、チューブヒーターによる濃縮法で濃縮し、ODS-C18 DCM溶離液をアセトニトリルに置換しました[1]。

実際のサンプル

試薬水、飲料水、水道水、河川水といった各種の水サンプルのクロマトグラムを図4に示しています。各水サンプルには、1/640に希釈した原液40 μ L (ベンゾ(a)ピレン0.225 ppb)を添加しました。すべての添加標準溶液が検出され、良好に分離されました。前回の研究では、18分というやや短いグラジエント時間を使用していました。この際、すべての標準溶液がベースラインで分離されましたが、ピーク13と14のあいだで干渉が見られました。このピーク干渉を防ぐために、グラジエント時間を22分に延長しました。本研究の条件下においては、HPLC用純水からはターゲットとなるPAHが検出されませんでした。したがって、この水サンプルをブランク水とみなしました。一番上のクロマトグラムが、標準溶液を添加した試薬水 (HPLC用純水) です。一部の水道水サンプルでは、微量のナフタレンが検出されました。一部の河川水サンプルでは、ナフタレン、アセナフテン、フルオレン、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、ベンゾ(a)アントラセンが微量ながらFLDにより検出されました。

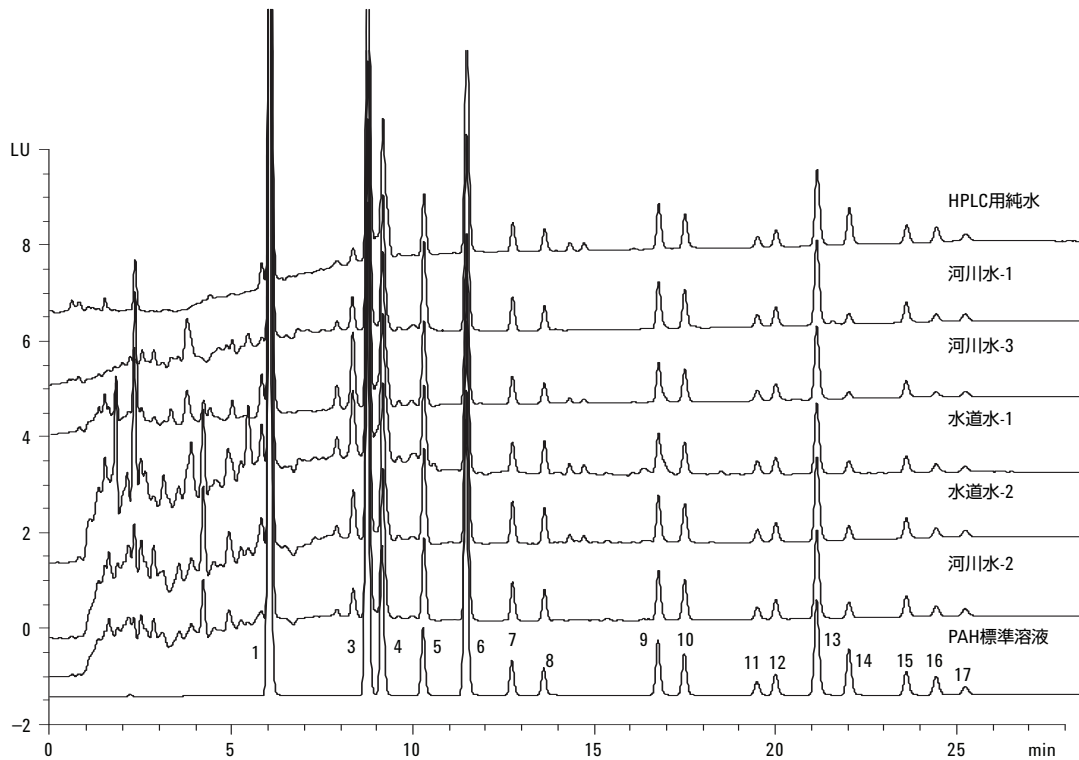


図4. Eclipse PAHカラムでPAH標準溶液を添加した各種水サンプルのクロマトグラム

まとめ

新しいZORBAX Eclipse PAHカラムを使えば、17種類のPAHすべてをベースラインで分離でき、近接する化合物の分離係数は、ほとんどの場合で2.0を上回ります。河川水および飲料水サンプルでは、すべての添加PAHを干渉物質から分離できます。直線性も優れています。ピーク面積再現性の平均値は1.5%未満、保持時間再現性の平均値は0.1%未満です。AccuBond ODS C18を使用した回収率も優れています。サンプル前処理の手順を最適化すれば、さらに優れた結果が得られる可能性があります。その点については本論文では検証しませんでした。FLDプログラムの使用により、低ピコグラム域のLODが得られました。本アプリケーションのFLD設定では、蛍光を発さないアセナフチレンを除くすべてのPAHについて、最良のシグナル/ノイズ比が得られます。

PAH分析の効率の良さ、独自の選択性といったEclipse PAHカラムの特性により、実際の水サンプルに含まれる微量PAHの分析において、最高レベルの感度が得られました。

参考文献

1. Harry Prest, "Solid-Phase Extraction and Retention-Time Locked GC/MS Analysis of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)" Agilent Technologies publication, 5988-7150EN (2002).
2. United States Environmental Protection Agency, "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Municipal and Industrial Wastewater," Method 610, 1982, EPA Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268.
3. United States Environmental Protection Agency, "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection," Method 550.1, 1990, EPA Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268.

4. United States Environmental Protection Agency,
“Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
in Ground Water and Wastes,” Method 8310, 1986,
EPA Environmental Monitoring
Systems Laboratory, Office of Research and Develop-
ment, Cincinnati, Ohio 45268.
5. National Institute for Occupational Safety and Health
Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edi-
tion, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC,
Method 5506, Issue 3, 1998, Washington DC 20201.
6. Sun, Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydro-
carbons by Liquid Chromatography with Solid Phase
Extraction (II), J. of University of Science and Tech-
nology of Suzhou, 19(4): 43-48 (2006).

詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、
ウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により
付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、仕様等は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
February 14, 2008
5989-7953JAJP