

ZORBAX Eclipse PAHカラムによる 多環芳香族炭化水素 (PAH) の分離 6種類から24種類までのPAHを分析

アプリケーション

食品安全性/環境

著者

John W. Henderson, Jr., William Biazzo, and William Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

概要

ZORBAX Eclipse PAHカラムとアセトニトリル/水の移動相を用いた逆相HPLCにより、複数の多環芳香族炭化水素 (PAH) 混合物を分離しました。分析に用いたサンプルには、6種類から24種類までのPAHが混在しています。この範囲のPAHを分離するために、グラジエントと温度の調節により分離を調整しました。分離にあたっては、さまざまなカラムの中から最適なカラムを選択することが重要です。これにより、分離能や分析時間、検出器の選択肢、サンプル量、システム圧力を最適化し、効率を高めることが可能です。

はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、石炭、ガス、石油、木材などの炭化水素が不完全燃焼する際に生じます。自動車の排気ガス、森林火災でも発生し、肉を焼くとき (焦げや煙) に生じることもあります。通常は混合物として存在し、粒子や煤煙として空气中に拡散します。

PAHには無数の発生源があり、しかも発癌性を持つことから、米国労働安全衛生局 (OSHA) や米国国立労働安全衛生研究所 (NIOSH)、食品に関する欧州連合の科学協議会といった多くの政府機関が、曝露限度を提案または規定しています。これを受けて、PAHを監視するために、HPLCなどの分析手法が改良されています。

PAHはサンプルマトリックスが多様で (空気、水、土壌、食品など)、多数の種類 (化合物100種類以上) が存在することから、さまざまな分析テクニックが必要となります。多数のカラムサイズと優れた拡張性、再現性、寿命を備えたEclipse PAHカラムを使えば、多種のPAHを分析できるHPLCメソッドを開発することができます。HPLCメソッドは、UV/蛍光検出器のUV/蛍光スペクトルにより選択性が高まるため、水素炎イオン化検出器を用いたGCなどの他のテクニックよりもPAH分析に適しています。

代表的なPAHは、EPA 610メソッドで分離される16種類とされています。しかし、食品および環境分析では、これらのPAHや他のPAHのサブセットの分離が求められることがあります。本論文では、食品分析の例として、6種類のPAHのみを分析するスクリーニング手法や、最大18種類のPAHを分析する方法など、5つのPAH混合物の分析例を紹介し、また、16種類から最大24種類のPAHを含む3種類の環境サンプルの分離例も紹介します。



サンプルはすべて、最適な分離能と分析時間が得られるように移動相グラジエントとカラムサイズを変更したうえで、ZORBAX Eclipse PAHカラムを用いて分離しました。すべての分析でアセトニトリル／水の移動相を使用しました。アセトニトリル／水の移動相は、EPA 610やEPA 8330といった多くの標準PAHメソッドに用いられる一般的な移動相です。選択性を調節するために、カラム温度を変更しました。この操作はメソッドの最適化に役立ち、特に食品中に含まれる可能性のあるPAHを分析する複雑なメソッドでは大きな効果が得られます。複数のカラム構成を使用すれば、スピード、分離能、圧力範囲の異なる各種HPLC機器に応じてカラムを選択し、メソッドをカスタマイズすることができます。サンプルのマトリックスやサンプル濃度も、カラムサイズの選択に影響を与える要素となります。

実験手法

ZORBAX Eclipse PAHカラムとAgilent Rapid Resolution 1200シリーズLC (RRLC) システムでPAH分離メソッドを開発しました。システム構成は以下のとおりです：

- G1379デガッサ
- G1312BバイナリポンプSL
 - 移動相チャンネルA：水、B：アセトニトリル。グラジエント条件は図を参照。
 - 内径2.1-mmカラムの使用時には、ポンプを低ディレイボリュームモードに設定し、スタティックミキサとバルブダンプナを迂回しました。低ボリュームおよび標準ボリュームのバイナリポンプ構成の詳細については、参考文献1を参照してください。
- G1367C HiP-ALS SLオートサンブラ
- G1316B TCC SL 温度制御カラムコンパートメント
 - 温度：25 °C
 - 内径2.1-mmカラムの使用時には、内蔵の3- μ Lのものに代わり、低ボリューム (1.6 μ L) 熱交換器 (G1316-8002) を使用しました。
- G1315Cダイオードアレイ検出器SL
 - G1315-60025フローセル (5- μ Lボリューム) により「220 nm、4 nm、参照なし」に設定、反応時間を0.5秒に設定
- G1321A FLD蛍光検出器
- 使用したカラムと他のメソッドパラメータについては図を参照してください。

PAH混合物については、既製の溶液を購入するか、各標準溶液を混合して作成しました。純化合物をトルエンまたは塩化メチレンに溶解し、エタノールで希釈しました。各種のPAHは複数の販売元から入手しました：

- 図1：PAH混合物 (部品番号 8500-6035)
- 図2：PAH混合物 (部品番号 8500-6035)
 - テルフェニル-d14 (Ultra Scientific PN ATS-160-1)、
 - 1-メチルナフタレン (Ultra Scientific PN EPA-1225)、
 - 2-メチルナフタレン (Ultra Scientific PN SV-200-1)、
 - ベンゾピレン (Accu-Standard H-112S) を混合
- 図3および4：ケバック州環境省PAH混合物 (AccuStandard PN H-QME-01)
- 図5～7：溶液または純PAH化合物から作成。AccuStandardから入手したもの：

ベンゾ[c]フェナントレン	H-244N
トリフェニレン	H-235N
ベンゾ[a]アントラセン	Z-013-04
クリセン	H-115N
ベンゾ[b]フルオラントレン	H-128N
ベンゾ[k]フルオラントレン	H-129N
ベンゾ[a]ピレン	H-169N
ベンゾ[g,h,i]ペリレン	H-103N
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	H-157N
ジベンゾ[a,i]ピレン	H-178N
ジベンゾ[a,h]ピレン	H-177N

Cerilliantから入手したもの：

シクロペンタ[c,d]ピレン	SCC-048
5-メチルクリセン	ERM-028
ベンゾ[j]フルオランテン	ERB-00
ジベンゾ[a,l]ピレン	ERD-051
ジベンゾ[a,h]アントラセン	ERD-052
ジベンゾ[a,e]ピレン	ERD-009

Sigma-Aldrichから入手したもの：

ベンゾ[c]フルオレン	T175560
-------------	---------

結果と考察

実際のPAH分離におけるZORBAX Eclipse PAHカラムの耐久性は、すでに証明されています。長寿命、バッチ間の再現性、3種類の粒子径での一貫した選択性については、EPA優先汚染物質のPAH標準混合物質 (EPA 610) を用いた分析で証明されています[2]。

図1では、蛍光検出器 (FLD) を用いて3種類のサンプルロード量でPAHを分離した結果を示しています。FLDを用いたこの

メソッドの感度(シグナル/ノイズ比 > 10:1)は、ピコグラムレベルです(図1)。UVを用いた検出限界は、それよりも100倍ほど低くなります[3]。16種類のPAHのうち、検出されたのは15種類のみでした。これは、アセナフチレン(ピーク2)が蛍光を発しないためです。光電子増倍管(PMT)設定など、FLDで最適な結果を得るための特別な設定については、クロマトグラム内に示しています。こうした情報は、サンプル注入量10 ngのクロマトグラムに記載してあります。注入量500ピコグラムおよび50ピコグラムで分離をおこなう際には、各クロマトグラムに記載されているとおりに設定を調整しました。

更に複雑なアプリケーションでの分析用に、EPA 610混合物質に4種類のPAHを追加し、20種類の化合物で構成される標準物質を作成しました。EPA 610混合物質に追加したPAHのうち、2種類(1-メチルナフタレンと2-メチルナフタレン)は土壤浄化に関するフロリダ州規制コード17.700章に記載されているPAH混合物質です。あとの2種類はテルフェニルとベンゾ[e]ピレンです。図2のクロマトグラムは、Eclipse PAHカラムで20種類すべてのPAHが分離されたことを示しています。グラジエントについては、追加したPAHに関して最適な分離能

を得るために、16種類のPAHの分離に通常用いられるものを調整しました。

ケベック州環境省PAH混合物はさらに複雑なPAH混合物質で、24種類のPAHを含んでいます。この混合物質の分離結果を図3に示しています。分離にあたっては、Rapid Resolution Eclipse PAH 4.6 mm × 150 mm (3.5- μ m) カラムを使用しました。このRapid Resolution (RR, 3.5 μ m) 構成の利点は、1.8- μ mカラムに比べて圧力が低いことです。動作圧力が40 MPa未満となるため、Agilent 1100などのHPLCシステムで長いRRカラムを使用できます。

それよりも短いRapid Resolution High Throughput (RRHT, 1.8 μ m) 4.6 mm × 100 mmカラムを使用した場合には(図4)、きわめて近接したピーク(ピーク13、14、15)で同様の分離能が得られると同時に、所要時間が大幅に短縮されます。カラム内径は同じなので、カラムの長さ按比例してグラジエント時間が短縮されました。この場合、圧力が40 MPaを超えるため、Agilent 1200 RRLCシステムが必要となります。

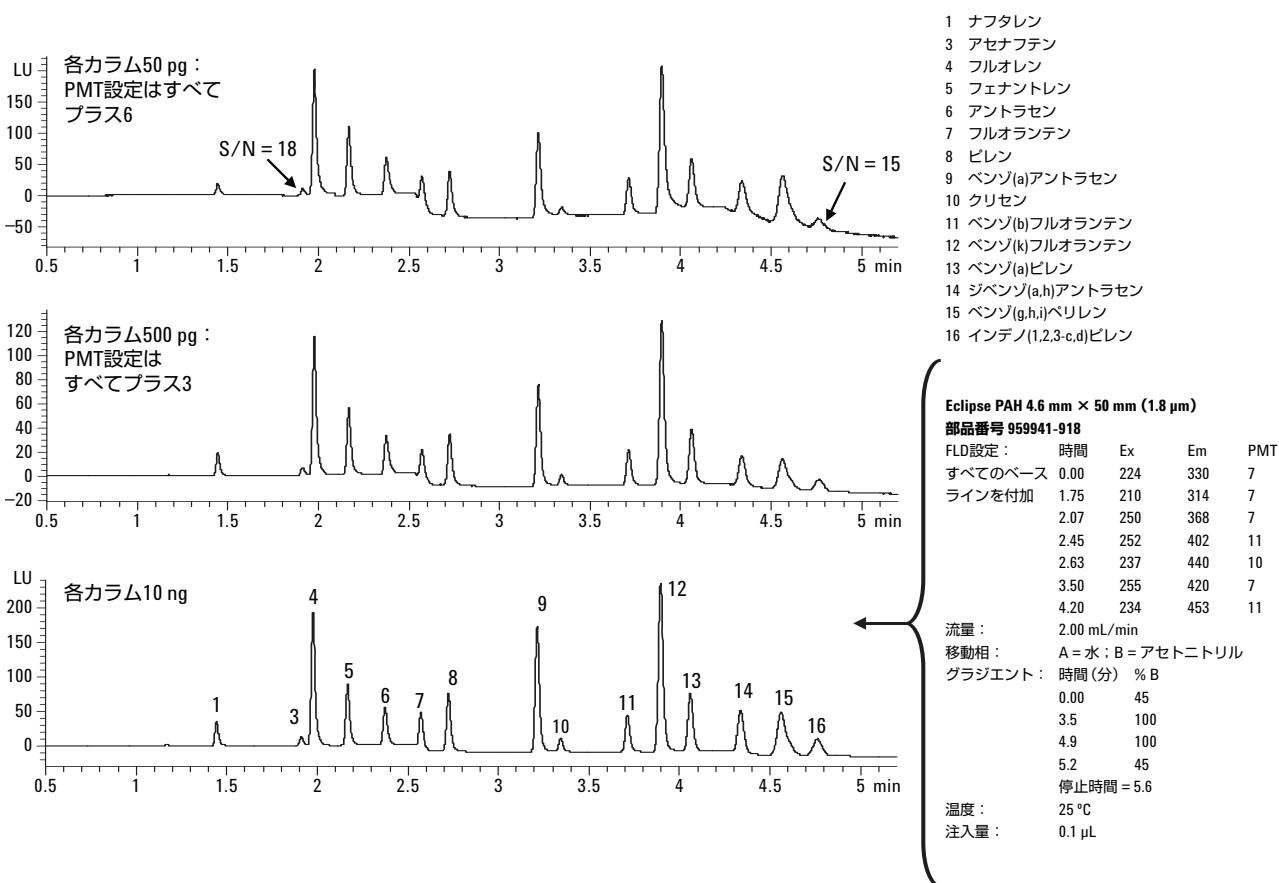


図1. FLD検出の定量的感度: Eclipse PAH 4.6 mm × 50 mm (1.8 μ m)カラムを用いた場合のEPAメソッド610 PAHのシグナル/ノイズ比は、 ≥ 10 です。

図5には、18種類のPAHを分離したもう1つの複雑な分析の結果を示しています。このサンプルは、EUの「15+1」PAH（食品に関する欧州連合（EU）の科学協議会（SCF）が監視を推奨する15種類のPAHと、2005年にFAO/WHO合同食品添加物専門家委員会（JECFA）により追加されたベンゾ[c]フルオレン）に、2種類のPAH（トリフェニレンとベンゾ[c]フェナントレン）を混合したものです。Eclipse PAHカラム（2.1mm × 50mm、1.8 μm）で18種類すべてが分離され、グラジエント時間は9分未満でした。ここではRRHT（1.8-μm）カラムも選択しましたが、カラムの短さと使用した移動相の影響で、圧力が40 MPaを超えませんでした。

温度の調節は選択性を変えるために役立ちます。図5の近接した1組のピーク（ピーク2と3）の分離係数が、25℃で1.44である点に注目してください。PAHカラムに使用されるポリメリック結合相では、多くの場合、温度を下げると分離能が向上します。この例でも、その手法でピーク2と3の分離能が向上しました。図6では、3種類の温度（25、20、15℃）での分離結果を重ねて表示しています。ピーク2と3の分離係数は、1.44から2.01、2.52に向上しています。しかし、ピーク13と14は、温度が下がるほど溶出時間が近づいています。この両

方のペアで満足できる分離能を得るための妥協案は、温度を20℃にすることです。温度を数度変えるだけでクロマトグラフィ結果に顕著な違いが出るということは、分析時に温度を慎重に管理しなければならないことを示しています。特に周囲温度での分析の場合は、ラボ内で室温が変動することがあるため、注意が必要です。Eclipse PAHの最高動作温度は60℃ですが（pH 6未満）、このカラムを用いたほとんどのPAH分離は、15～35℃でおこなわれます。

本論文の最後の例は、飲料水に関する欧州委員会指令80/778/EECに関連するものです。この例では、アイソクラティック分析により、PAHを含む水サンプルを高速でスクリーニングする必要があります。短いカラムとアイソクラティック移動相を用いてスループットを高め、グラジエントの再平衡時間を省きました。RRカラム構成（3.5 μm）のサンプル分離時間は約4分です。RRHTカラム（1.8 μm）を使えば、分離能を損なわずに、時間を2分にまで短縮できます（図7）。カラムが短く、アセトニトリル濃度が高いため、いずれのカラムについても、高流速を使用しても高い圧力が問題になることはありません。

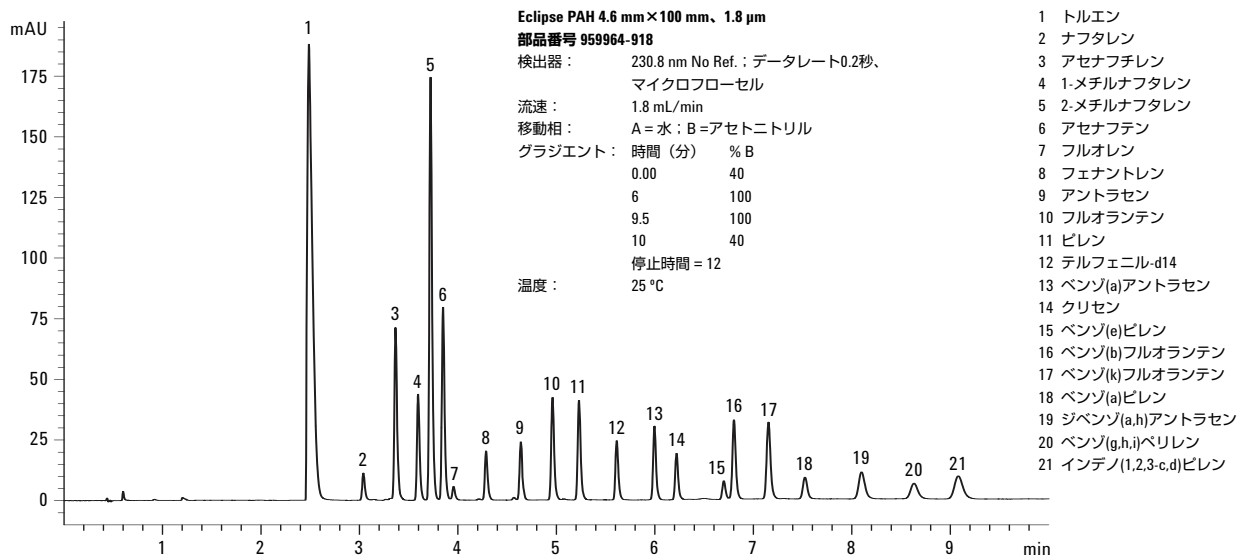


図2. フロリダ州規制コード17.000に2種類のPAHを加えたサンプルのRRHT分析

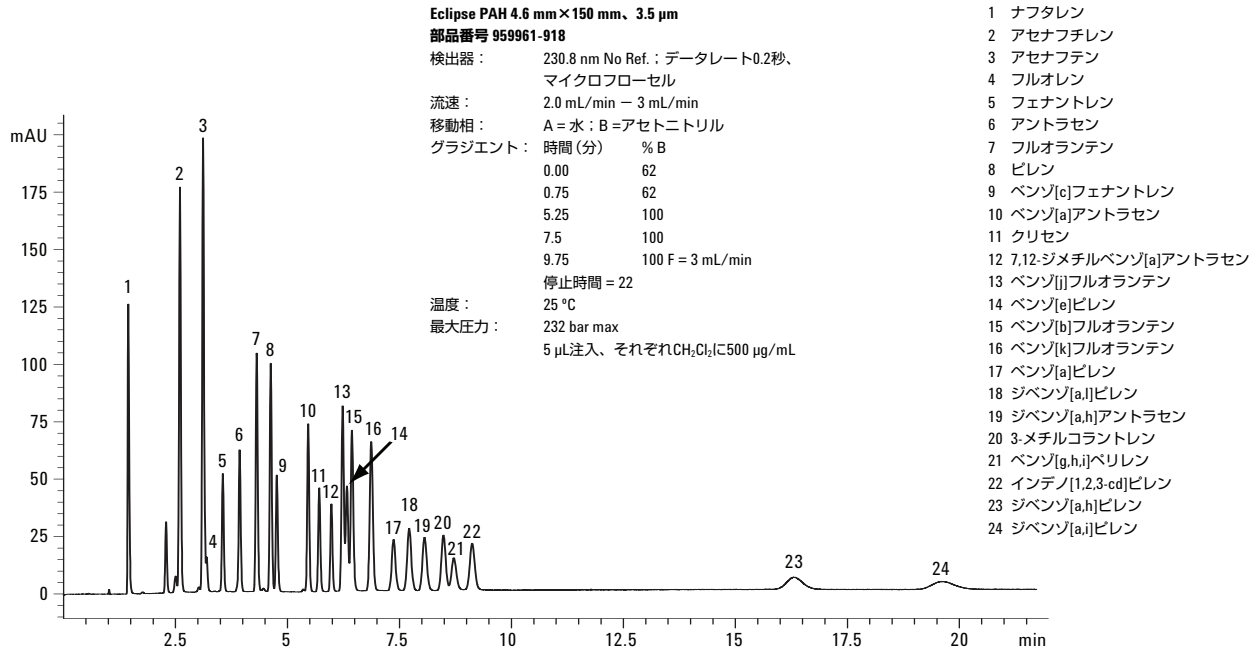


図3. ケベック州環境省PAH標準物質のRR分析

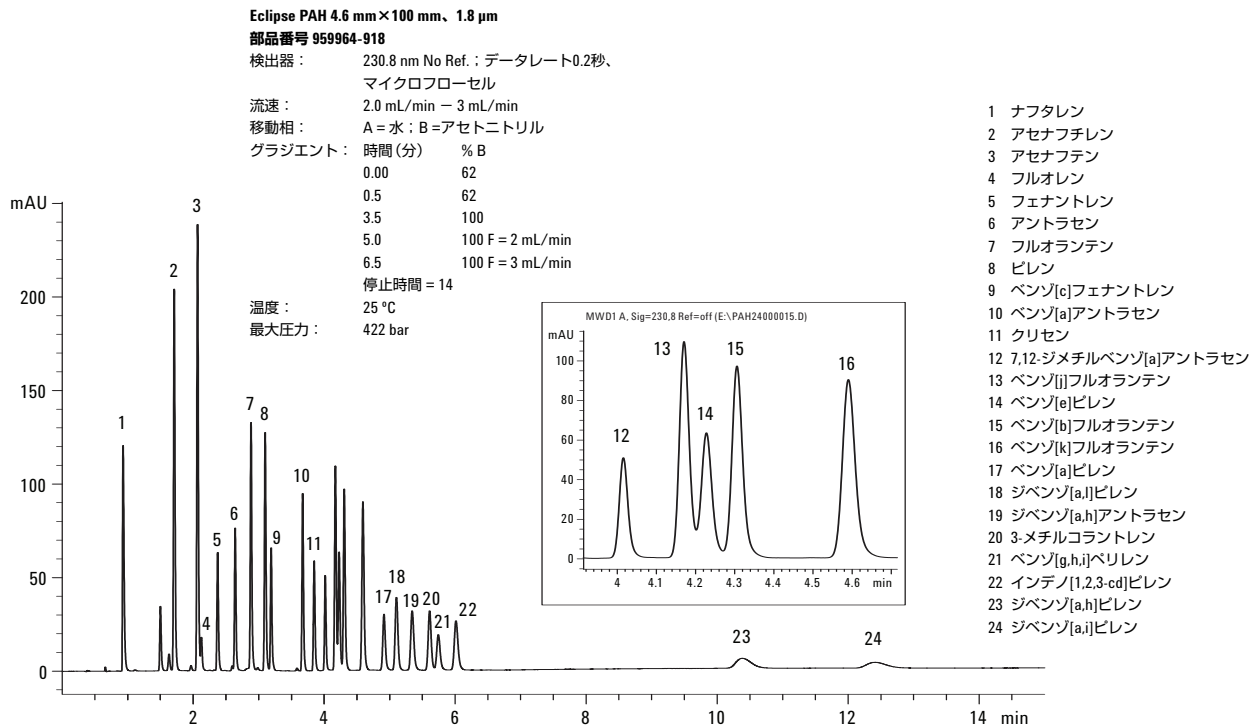


図4. ケベック州環境省PAH標準物質のRRHT分析

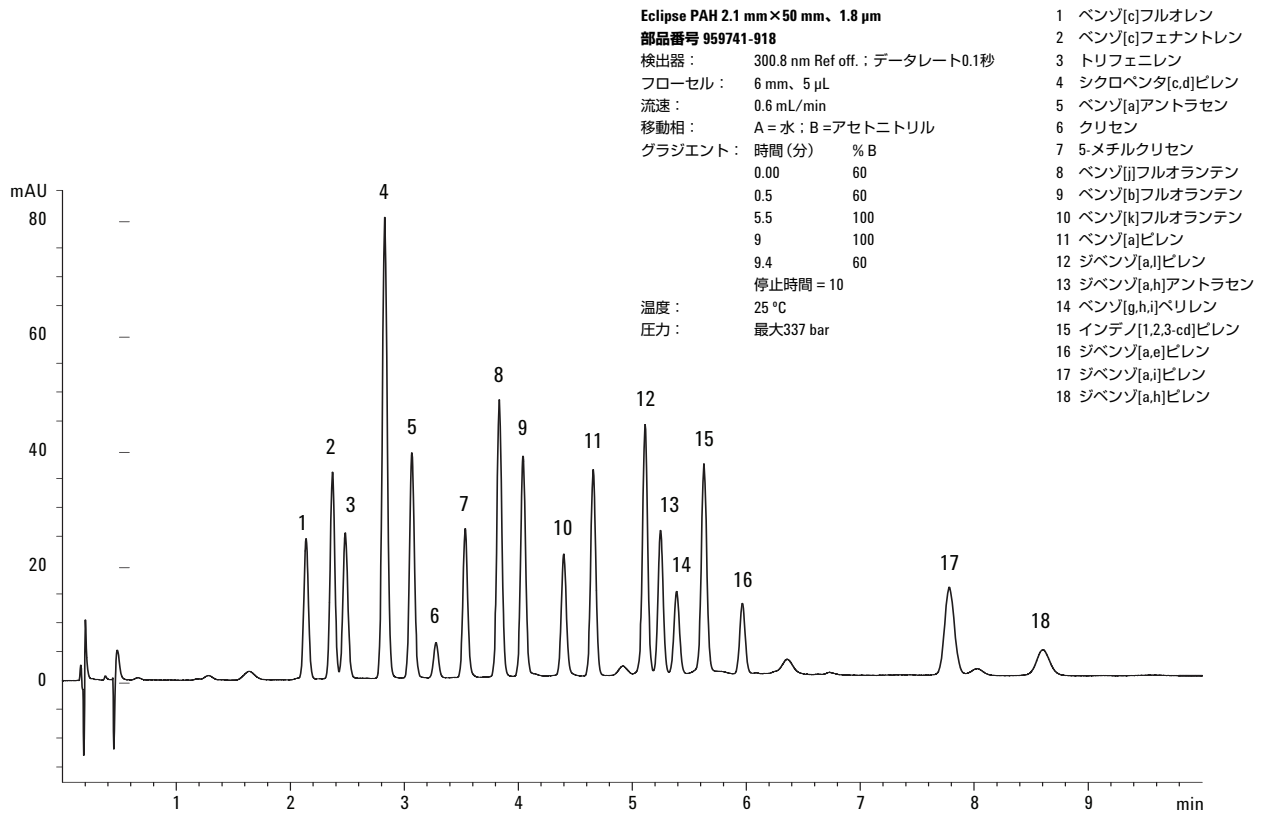


図5. EUのSCFおよびJECFAの「15+1」に2種類のPAHを加えたサンプルの分析

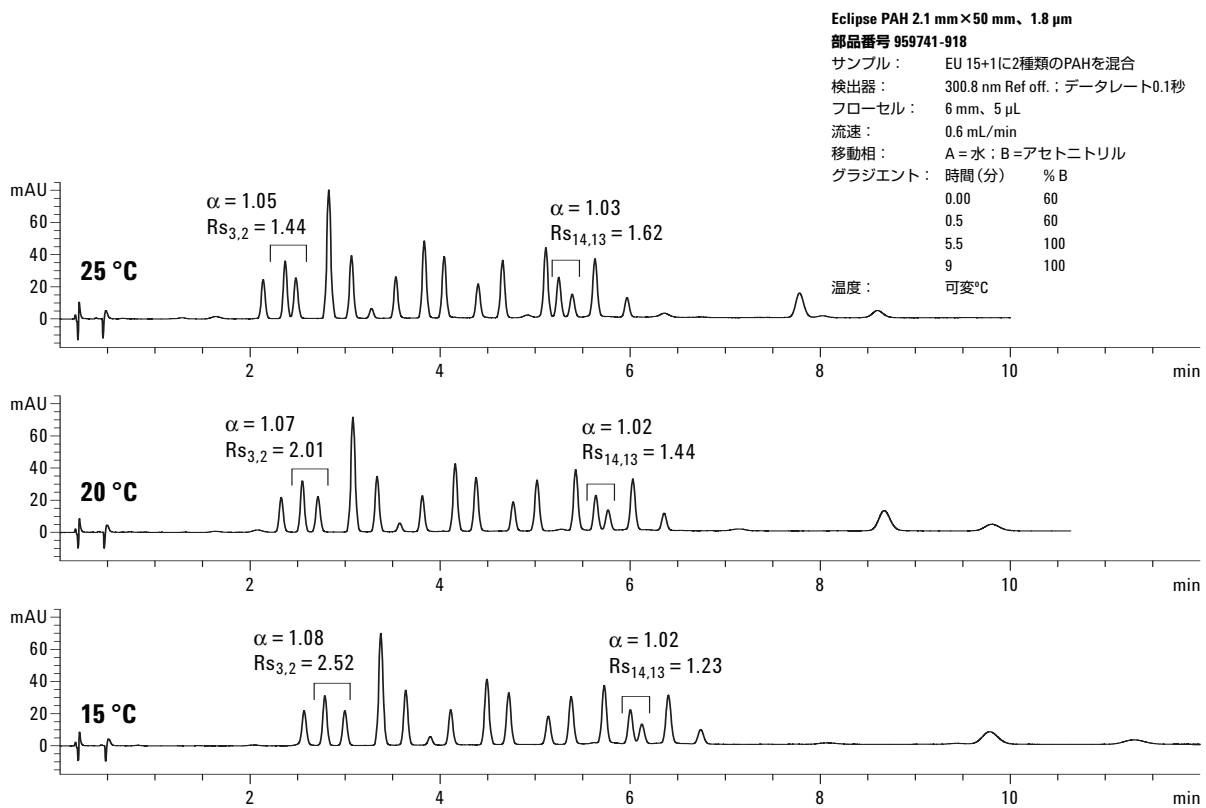
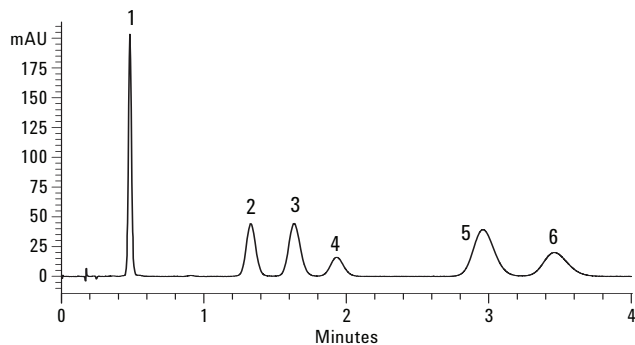
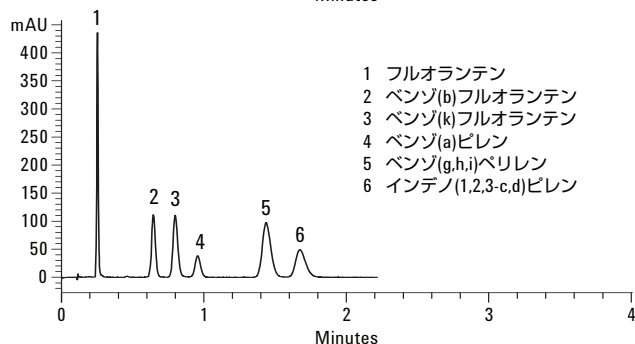


図6. PAHバンド幅における温度の影響



Eclipse PAH、4.6 mm×50 mm、3.5 μm
 部品番号 959943-918
 検出器： 220.4 nm
 流速： 2.5 mL/min
 チャンネル： A = 水； B = アセトニトリル
 移動相： 92% B
 温度： 20 °C、低ボリュウムヒートシンク
 圧力： 105 bar



- 1 フルオランテン
- 2 ベンゾ(b)フルオランテン
- 3 ベンゾ(k)フルオランテン
- 4 ベンゾ(a)ピレン
- 5 ベンゾ(g,h,i)ペリレン
- 6 インデノ(1,2,3-c,d)ピレン

Eclipse PAH、4.6 mm×30 mm、1.8 μm
 部品番号 959931-918
 検出器： 220.4 nm
 流速： 2.5 mL/min
 チャンネル： A = 水； B = アセトニトリル
 移動相： 95% B
 温度： 20 °C、低ボリュウムヒートシンク
 圧力： 147 bar

図7：高速分離PAHスクリーニングカラムによる欧州委員会指令80/778/EEC関連分析

まとめ

安定性に定評のあるZORBAX Eclipse PAHカラムは、空気、水、土壌、食品などのマトリックス中に存在するさまざまなPAHサンプルの分析に理想的なカラムです。

環境および食品安全業界で使用されるPAH混合物質のうち、6種類から24種類までのPAHを含む複雑性の異なる5タイプの

サンプルを、サイズの異なるEclipse PAHカラムで良好に分離できました。メソッド開発やメソッドの最適化にあたっては、グラジエント組成、温度、カラムサイズを容易に操作することができました。多様なカラム構成を誇るEclipse PAHカラムなら、スピードや分離能のカスタマイズが可能のほか、さまざまなサンプルマトリックスやサンプル濃度、検出器に対応できます。

• 最適なEclipse PAHカラムをお選びください：

- 959764-918 Eclipse PAH,
2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm
- 959793-918 Eclipse PAH,
2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm
- 959763-918 Eclipse PAH,
2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm
- 959701-918 Eclipse PAH,
2.1 mm × 150 mm, 5 μm
- 959790-918 Eclipse PAH,
2.1 mm × 250 mm, 5 μm
- 959741-918 Eclipse PAH,
2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm
- 959990-318 Eclipse PAH,
3.0 mm × 250 mm, 5 μm
- 959964-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm
- 959961-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm
- 959996-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 100 mm, 5 μm
- 959963-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm
- 959993-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 150 mm, 5 μm
- 959990-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 250 mm, 5 μm
- 959931-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 30 mm, 1.8 μm
- 959941-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm
- 959943-918 Eclipse PAH,
4.6 mm × 50 mm, 3.5 μm

参考文献

1. 「ディレイボリユームの低減によるハイスループットグラジェントの最適化」資料番号 5989-6665JAJP (2007)
2. 「多環芳香族炭化水素のHPLC分析におけるEclipse PAHカラムの堅牢性」資料番号 5989-7828JAJP (2008)
3. 「水サンプルに含まれる多核芳香族炭化水素 (PAH) の ZORBAX Eclipse PAHカラムによる分析」資料番号 5989-7953JAJP (2008)
4. “Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in food and the environment needed for new food legislation in the European Union,” *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 7, 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 29, 2008
5989-7968JAJP

