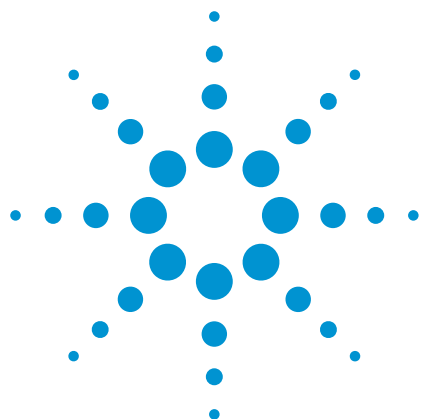




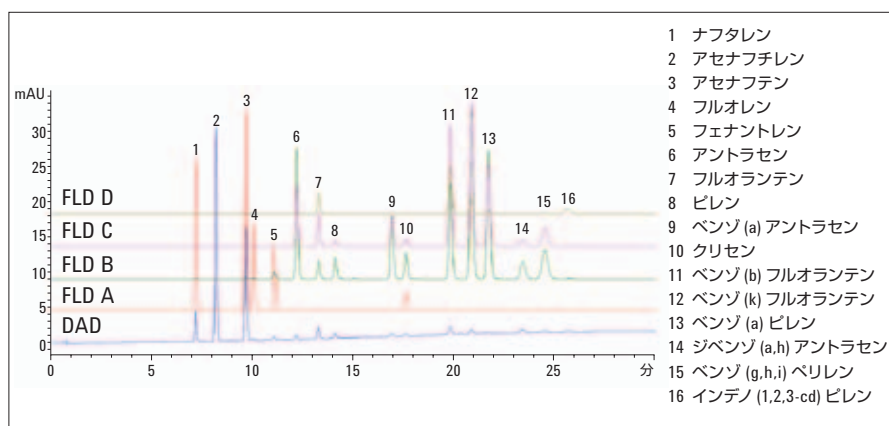
# Agilent アプリケーションソリューション EPA 8310 メソッドに従った UV および多波長蛍光検出による 土壌中 PAH の分析

## アプリケーションノート

環境

### 著者

Sonja Volk  
Angelika Gratzfeld-Huesgen  
Agilent Technologies, Inc.  
Waldbronn, Germany



### 概要

炭素を含む物質を燃やすと、多環芳香族炭化水素 (PAH) を含む多量の煙が放出されます。PAH は、米国環境保護庁 (US EPA) により、発癌性が疑われる重要汚染物質に指定されています。このアプリケーションノートでは、EPA 8310 に従い、土壌中 PAH のサンプル前処理および HPLC 分析をおこなう、再現性の高いメソッドを紹介します。このメソッドでは、規制要件を満たす良好な回収率と検出下限が得られます。

この HPLC メソッドでは、フォトダイオードアレイ検出器 (DAD) と蛍光検出器 (FLD) を用います。Agilent 1260 Infinity LC システムと一般的な 4.6 x 150 mm、5  $\mu$ m カラムを用いてメソッドを開発し、堅牢性試験などのバリデーションをおこないました。その後、この従来メソッドを、UHPLC 用の 2.1 x 50 mm、1.8  $\mu$ m カラムを用いた Agilent 1290 Infinity LC システムへ変換しました。両方のメソッドについて、精度、検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ) を比較しました。



Agilent Technologies

## はじめに

多環構造を含む炭化水素は、多環芳香族炭化水素と総称され、一般には PNA または PAH の略号で表記されます。この種の化合物は、変異原性をもつことが疑われているほか、多くの毒性化学物質が含まれるおそれがあります。発癌性が疑われることから、PAH の環境への放出については、法的な規制が設けられています。PAH は一般に、化石燃料などの有機物の不完全燃焼により生成されます。炭素を含む物質を燃やすと、多環芳香族炭化水素 (PAH) を含む多量の煙が放出されます。また、大気降下によって、工業地帯や空港、高速道路から離れた場所の土壌や堆積物にも到達します。さらに、事故による原油流出や不用意な石油の取り扱いも、汚染の原因になります。

過去数十年で、多くの国が PAH の最大許容値を定めた法律を制定しています。これにより、適切なモニタリングメソッドの必要性も高まっています。

ドイツ・バーデン=ヴュルテンベルク州 (UM & SM BW、1993) の汚染地域に関する指標値は、以下のように定められています。

- **H-値 – 土壌 1 kg 中 1 ~ 3 mg**  
土壌中バックグラウンド PAH の上限値
- **PP-値 – 土壌 1 kg 中 10 mg**  
食用/飼料作物および動物の保護用の土壌における PAH の指標値
- **PM<sub>1</sub>-値 – 土壌 1 kg 中 5 mg**  
子どもの遊び場の土壌における PAH の指標値
- **PM<sub>2</sub>-値 – 土壌 1 kg 中 25 mg**  
住宅地の土壌における PAH の指標値
- **PM<sub>3</sub>-値 – 土壌 1 kg 中 100 mg**  
工業用地の土壌における PAH の指標値

液体クロマトグラフィは、複雑なマトリックスに含まれる低濃度物質の検出において、以下のような大きな利点を備えています。

- GC/MS 分析テクニックに比べてサンプル前処理が簡単
- 周囲温度で高分子量物質が分解するリスクが低い
- 連続した蛍光検出と UV 検出の選択性と感度
- 最先端の蛍光検出器を用いたマルチシグナル採取
- 別の波長での非蛍光性化合物 (アセナフチレンなど) や共溶出するピークの定量に対応する、補完的なダイオードアレイ UV 可視吸光検出

## 実験手法

### 機器とソフトウェア

以下のモジュールを搭載した Agilent 1260 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity オートサンブラ (G1329B)
- Agilent 1290 カラムコンパートメント (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212B)、10-mm Max-Light フローセル搭載
- Agilent 1260 Infinity シリーズ蛍光検出器 (G1321B)、標準 FLD フローセル搭載

以下のモジュールを搭載した Agilent 1290 Infinity LC システムを用いて、UHPLC 分析メソッドを開発および実施しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- 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)、10-mm Max-Light フローセル搭載

ソフトウェア:

- Agilent OpenLab ChemStation C.01.03
- Method Translator

## 標準とサンプル

SS EPA 610 PAH ミックスのメタノール/塩化メチレン (1:1) 溶液 (Supelco Analytical)。以下の PAH が含まれます。

ナフタレン  
アセナフチレン  
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  
クリセン

ベンゾ (b) フルオランテン  
ベンゾ (k) フルオランテン  
ベンゾ (a) ピレン  
ジベンゾ (a,h) アントラセン  
ベンゾ (g,h,i) ペリレン  
インデノ (1,2,3-cd) ピレン

ブランクサンプルとして少量汚染土壌を使用

アセトニトリル、ヘキサン、アセトンは LC グレードのものを使用しました。新鮮な超純水を、0.22  $\mu\text{m}$  メンブレンポイントオブユーズカートリッジを備えた Milli-Q インテグラルシステムで用意しました (Millipak)。

## クロマトグラフィ条件

| パラメータ   | Agilent 1260 Infinity LC システム                                                                                                         | Agilent 1290 Infinity LC システム                                                |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 溶媒:     | A: 水、B: アセトニトリル                                                                                                                       | A: 水、B: アセトニトリル                                                              |
| カラム:    | Agilent ZORBAX Eclipse PAH、4.6 x 150 mm、5 $\mu\text{m}$                                                                               | Agilent ZORBAX Eclipse PAH Rapid Resolution HT、2.1 x 50 mm、1.8 $\mu\text{m}$ |
| グラジエント: | 0 分 – 40 % B、20 分 – 95 % B                                                                                                            | 0 分 – 40 % B、4 分 – 95 % B                                                    |
| 流速:     | 1.5 mL/min                                                                                                                            | 0.85 mL/min                                                                  |
| 注入量:    | 3 $\mu\text{L}$                                                                                                                       | 0.3 $\mu\text{L}$                                                            |
| DAD:    | Sig = 230 nm、Ref = 400 nm                                                                                                             |                                                                              |
| FLD:    | マルチシグナル採取、 $\lambda_{\text{ex}}$ = 260 nm および $\lambda_{\text{em}}$ = 350 nm (FLD A)、420 nm (FLD B)、440 nm (FLD C)、500 nm (FLD D) で設定 |                                                                              |

## サンプル前処理 – 土壌サンプル

ホモジナイズした土壌 5 g に、アセトニトリル 2 mL で希釈した 4 種類の量の PAH 標準混合液を添加しました:

- 0  $\mu\text{g}$  PAH 標準 (ブランク)
- 5  $\mu\text{g}$  PAH 標準 (土壌 1 kg 中 1 mg に相当する低濃度添加)
- 50  $\mu\text{g}$  PAH 標準 (土壌 1 kg 中 10 mg に相当する中濃度添加)
- 500  $\mu\text{g}$  PAH 標準 (土壌 1 kg 中 100 mg に相当する高濃度添加)

## EPA 3550C に従った 従来の抽出メソッド

PAH の抽出にあたっては、ヘキサン/アセトン (4:1) 15 mL を添加し、超音波分解を 3 分間おこないました (この手順を 3 回繰り返す)。抽出液をひとつにまとめ、4,000 rpm で 5 分間、遠心分離しました。サンプルを濃縮し、ロータリーエバポレーターによりアセトニトリルと交換し、総体積を 5 mL としたのち、HPLC/UHPLC で分析しました。ブランクと低濃度添加サンプルは直接分析しましたが、中濃度添加お

よび高濃度添加サンプルについては、HPLC 測定に先立ち、それぞれ 1:10 および 1:100 に希釈する必要がありました。これにより、ピーク強度が検量線内に収まり、正確に定量できるようになりました。

## 結果と考察

### 直線性

標準 PAH 混合物のアセトニトリル溶液を希釈した一連のサンプルを分析し、直線性と精度を測定しました。PAH

の総濃度を、8 段階希釈 (1:3 希釈) で 19.3 ng/μL~8.8 pg/μL としました。広い濃度範囲をカバーするために、8 つの PAH 濃度の希釈液を ACN 中で調製し、Agilent 1260 Infinity LC システムを用いて HPLC で分析しました。

図 1 は、希釈連続分析の相関曲線を示しています。5 つの測定シグナルのうち、4 つのシグナルを図 1 の FLD1 A、FLD1 B、FLD1 C、DAD1 A で表示しています。すべての相関曲線で良好な直線性が得られ、相関係数は 0.9999 を上回りました。

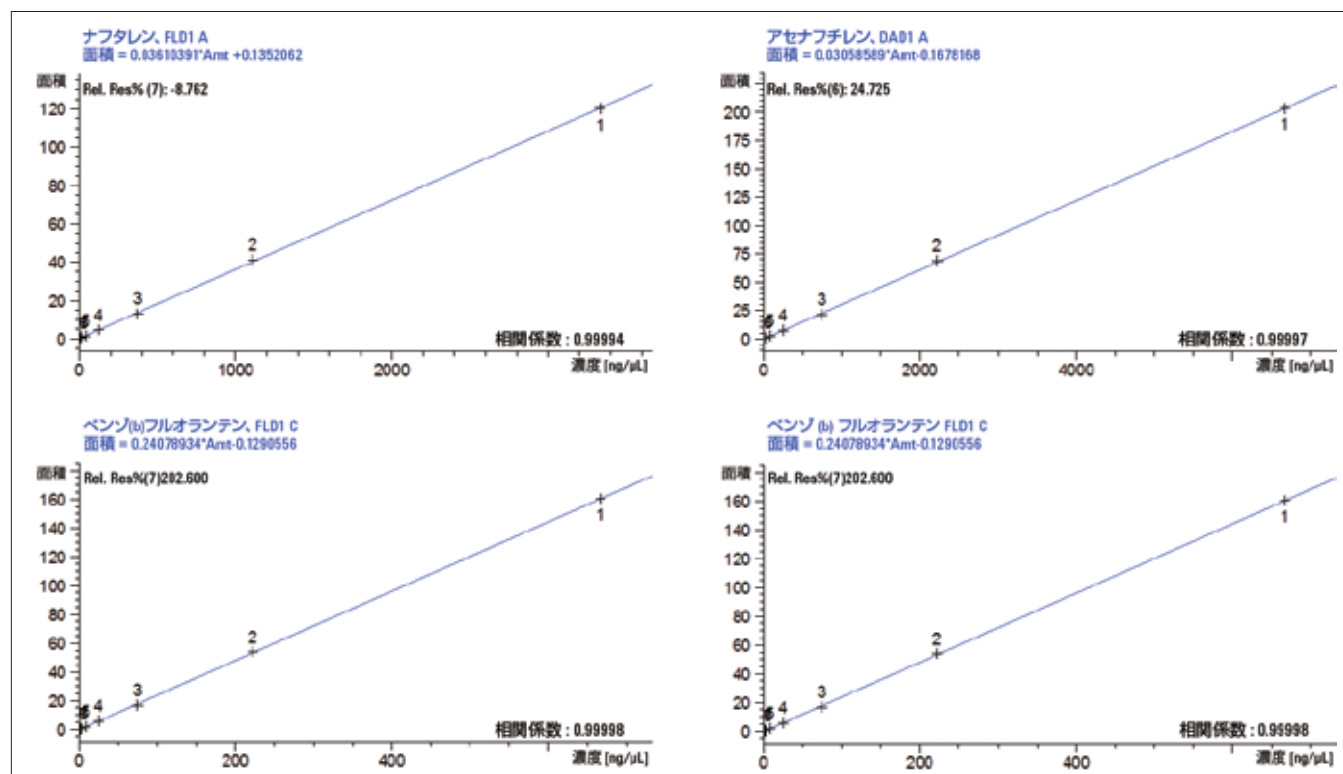


図 1  
PAH 分析における Agilent 1260 Infinity LC システムの直線性。次の 4 つのシグナルを表示: FLD1 A、FLD1 B、FLD1 C、DAD1 A

## リテンションタイム (RT) と面積の 精度

相対標準偏差 (%) として表されるリテンションタイム精度を、図 2 に示しています。すべての RSD 値が 0.2 % を下回りました。

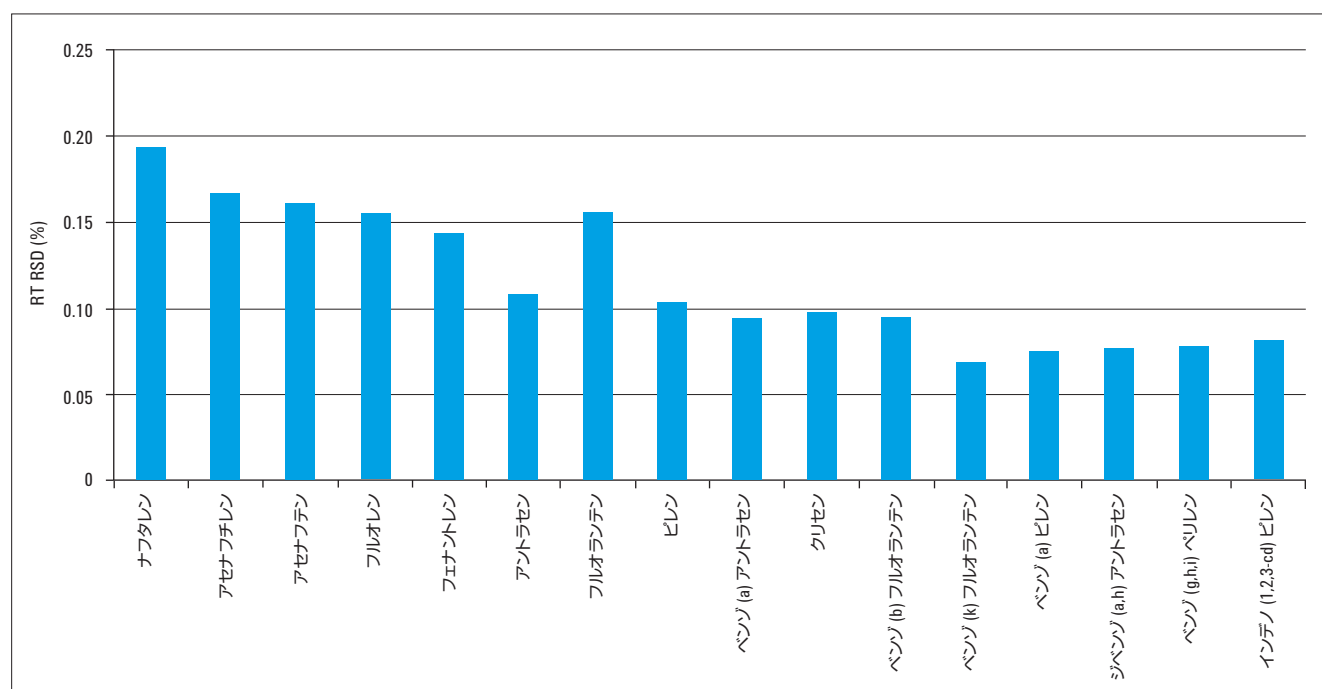


図 2  
各 PAH 化合物のリテンションタイムの精度、相対標準偏差 (RSD) として表示、Agilent 1260 Infinity LC システムを使用

相対標準偏差 (%) として表される面積精度は、図 3 に示すように、4 つの高濃度希釈液で 2 % を下回りました。

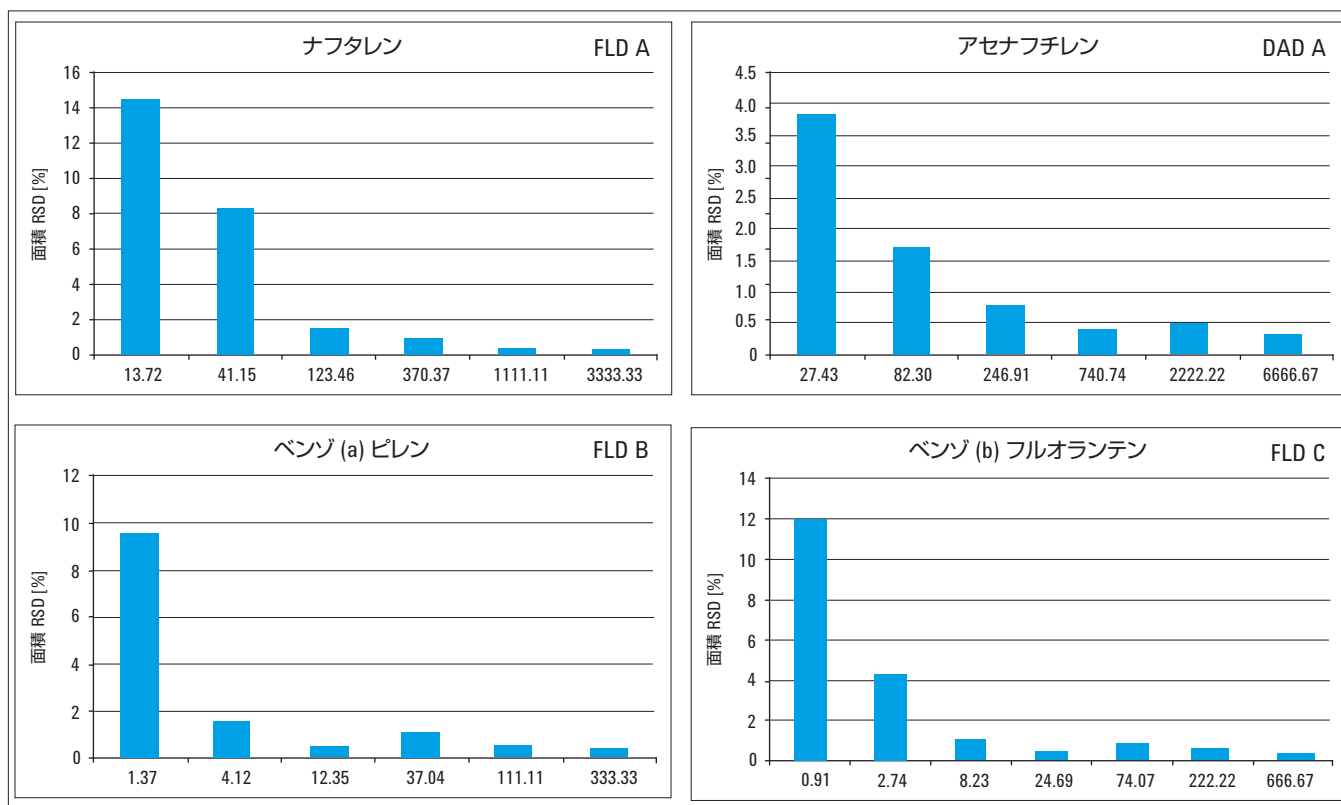


図 3  
面積精度、Agilent 1260 Infinity LC システムを使用

## 検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、分離能

検出下限と定量下限については、シグナル/ノイズ比がそれぞれ 3 および 10 となるのに必要な PAH 濃度として評価しました。各ピークを効率的に分離するためには、2.0 以上の分離能が必要と評価されました。

## 堅牢性

一連の濃度のうち、最高濃度のサンプル (19.3 ng/μL) を用いて、堅牢性を評価しました。リテンションタイムと総量の変動の限界値を 5 % としました。Agilent 1260 Infinity LC メソッドの堅牢性の評価により、この濃度のサンプルを測定するためには、注入量とグラジエント勾配のパラメータが重要であることが明らかになりました。表 2 に、ナフタレンおよびベンゾ (a) アントラセンの堅牢性試験の結果を例示しています。限界値を超えた値を赤で表示しています。

| RT    | シグナル  | 化合物                 | Lvl | LOD [pg/μL] | LOQ [pg/μL] | 分離能   |
|-------|-------|---------------------|-----|-------------|-------------|-------|
| 7.24  | FLD A | ナフタレン               | 7   | 17.29       | 51.86       | 7.41  |
| 8.24  | DAD A | アセナフチレン             | 6   | 50.29       | 150.86      | 6.32  |
| 9.72  | FLD A | アセナフテン              | 7   | 15.83       | 47.49       | 14.50 |
| 10.10 | FLD A | フルオレン               | 6   | 8.39        | 25.17       | 2.05  |
| 11.11 | FLD A | フェナントレン             | 6   | 6.25        | 18.76       | 5.19  |
| 12.22 | FLD B | アントラセン              | 7   | 0.97        | 2.91        | 2.62  |
| 13.34 | FLD C | フルオランテン             | 6   | 7.82        | 23.47       | 5.00  |
| 14.16 | FLD B | ピレン                 | 5   | 10.10       | 30.29       | 3.44  |
| 16.95 | FLD B | ベンゾ (a) アントラセン      | 6   | 2.97        | 8.90        | 4.83  |
| 17.63 | FLD B | クリセン                | 5   | 7.25        | 21.74       | 2.57  |
| 19.82 | FLD C | ベンゾ (b) フルオランテン     | 7   | 2.26        | 6.77        | 7.77  |
| 20.86 | FLD B | ベンゾ (k) フルオランテン     | 7   | 0.82        | 2.47        | 3.53  |
| 21.68 | FLD B | ベンゾ (a) ピレン         | 6   | 1.74        | 5.23        | 2.69  |
| 23.37 | FLD B | ジベンゾ (a,h) アントラセン   | 5   | 21.68       | 65.05       | 4.34  |
| 24.47 | FLD B | ベンゾ (g,h,i) ペリレン    | 5   | 18.83       | 56.49       | 2.20  |
| 25.75 | FLD D | インデノ (1,2,3-cd) ピレン | 3   | 25.10       | 75.29       | 1.96  |

表 1  
16 種類の PAH の LOD、LOQ、分離能

| 変更したパラメータ       | 変更                             | RT の変動 %<br>ナフタレン | RT の変動 %<br>ベンゾ (a) アントラセン | 変動 %<br>限界値 | 総量の変動 %<br>ナフタレン | 総量の変動 %<br>ベンゾ (a) アントラセン | 変動 %<br>限界値 |
|-----------------|--------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------|------------------|---------------------------|-------------|
| 流速 ± 2 %        | 高 : 1.53 mL/min                | 1.3               | 0.7                        | 5%          | 3.8              | 3.1                       | 5%          |
| 標準 : 1.5 mL/min | 低 : 1.47 mL/min                | 1.4               | 0.7                        | 5%          | 0.6              | 0.8                       | 5%          |
| TCC ± 5 %       | 高 : 26.25 °C                   | 1.0               | 1.5                        | 5%          | 1.4              | 0.4                       | 5%          |
| 標準 : 25 °C      | 低 : 23.75 °C                   | 0.9               | 1.6                        | 5%          | 2.9              | 4.0                       |             |
| 注入量 ± 5 %       | 高 : 3.15 μL                    | 0.1               | 0.01                       | 5%          | 4.2              | 3.4                       | 5%          |
| 標準 : 3 μL       | 低 : 2.85 μL                    | 0.1               | 0.04                       | 5%          | 6.2              | 7.0                       | 5%          |
| グラジエント勾配 ± 10 % | + 10 %                         | 3.6               | 6.9                        | 5%          | 1.7              | 2.8                       | 5%          |
|                 | - 10 %                         | 0.3               | 0.6                        | 5%          | 1.5              | 2.2                       | 5%          |
| 波長 ± 3 nm       | DAD - 233 nm<br>FLDex - 263 nm | 0.02              | 0.11                       | 5%          | 3.6              | 0.9                       | 5%          |
|                 | DAD - 227 nm<br>FLDex - 257 nm | 0.03              | 0.08                       | 5%          | 1.9              | 2.6                       | 5%          |

表 2  
ナフタレンとベンゾ (a) アントラセンの堅牢性試験

## UHPLC へのメソッド変換

Agilent 1260 Infinity LC システムで実行した HPLC メソッドを、Method Translator 1.0 を用いて、Agilent 1290 Infinity LC システムに変換しました。分離能とスピードについては、メソッドを手動で最適化しました。図 4 は、PAH 標準混合物の UHPLC 分析のクロマトグラムを示しています。UHPLC グラジエントはわずか 4 分で、総分析時間は 6 分でした。これにより、Agilent 1260 Infinity LC システムを用いた通常の HPLC に比べて、時間を 5 分の 1 以下、溶媒使用量を 10 分の 1 近くに削減できました。

### ピーク番号

- 1 ナフタレン
- 2 アセナフチレン
- 3 アセナフテン
- 4 フルオレン
- 5 フェナントレン
- 6 アントラセン
- 7 フルオランテン
- 8 ビレン
- 9 ベンゾ (a) アントラセン
- 10 クリセン
- 11 ベンゾ (b) フルオランテン
- 12 ベンゾ (k) フルオランテン
- 13 ベンゾ (a) ビレン
- 14 ジベンゾ (a,h) アントラセン
- 15 ベンゾ (g,h,i) ペリレン
- 16 インデノ (1,2,3-cd) ビレン

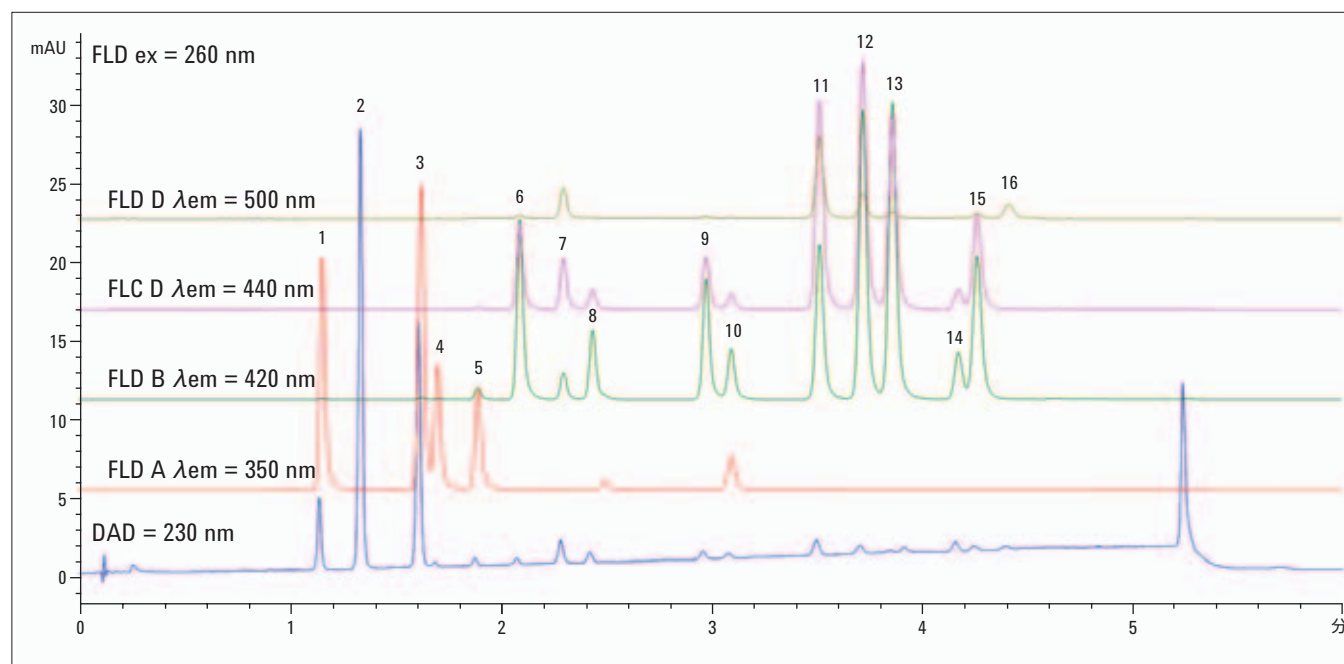


図 4  
Agilent 1260 Infinity LC システムを用いた PAH 標準混合物の UHPLC 分析



表 3 に、UHPLC メソッドの LOD、LOQ、分離能、リテンションタイムおよび面積の RSD (%) を示しています。LOD と LOQ は、標準 HPLC メソッドの値よりも向上しています。分離能は、ほとんどの化合物で 2 を上回りました。フルオレン、クリセン、ベンゾ (g,h,i) ペリレンについては、分離能は 1~2 でした。UHPLC メソッドでは、すべての PAH できわめて高い精度が得られ、リテンションタイムと面積の相対標準偏差は、0.05 % 未満というきわめて優れた値でした。したがって、UHPLC への変換が可能だけでなく、LOD と LOQ が向上した、より感度と再現性の高いメソッドが実現すると結論づけることができます。感度はすべての PAH で 6 倍以上向上しています。UHPLC メソッドの再現性は、最大で 100 倍向上しています。

| RT   | シグナル   | 化合物                 | Lvl | LOD<br>[pg/μL] | LOQ<br>[pg/μL] | 分離能  | RSD<br>(%) RT | RSD<br>(%) 面積 |
|------|--------|---------------------|-----|----------------|----------------|------|---------------|---------------|
| 1.64 | FLD1 A | ナフタレン               | 4   | 6.00           | 18.01          | n.a. | 0.0561        | 0.02          |
| 1.35 | DAD1 A | アセナフチレン             | 4   | 36.70          | 110.11         | 5.59 | 0.0005        | 0.04          |
| 2.10 | FLD1 A | アセナフテン              | 4   | 0.70           | 2.10           | 9.43 | 0.0006        | 0.02          |
| 2.99 | FLD1 A | フルオレン               | 4   | 1.04           | 3.12           | 1.50 | 0.0007        | 0.05          |
| 3.87 | FLD1 A | フェナントレン             | 4   | 0.84           | 2.51           | 3.48 | 0.0006        | 0.03          |
| 3.53 | FLD1 B | アントラセン              | 4   | 0.70           | 2.09           | 2.31 | 0.0007        | 0.02          |
| 4.28 | FLD1 C | フルオランテン             | 4   | 1.71           | 5.14           | 3.68 | 0.0008        | 0.01          |
| 3.73 | FLD1 B | ピレン                 | 4   | 0.43           | 1.30           | 6.04 | 0.0006        | 0.02          |
| 3.11 | FLD1 B | ベンゾ (a) アントラセン      | 4   | 2.45           | 7.34           | 8.99 | 0.0004        | 0.00          |
| 4.19 | FLD1 B | クリセン                | 4   | 5.27           | 15.81          | 1.91 | 0.0006        | 0.01          |
| 2.31 | FLD1 C | ベンゾ (b) フルオランテン     | 4   | 5.58           | 16.74          | 6.27 | 0.0003        | 0.02          |
| 1.71 | FLD1 B | ベンゾ (k) フルオランテン     | 4   | 2.77           | 8.31           | 3.02 | 0.0004        | 0.01          |
| 4.41 | FLD1 B | ベンゾ (a) ピレン         | 4   | 13.02          | 39.07          | 2.03 | 0.0005        | 0.03          |
| 1.17 | FLD1 B | ジベンゾ (a,h) アントラセン   | 4   | 7.79           | 23.36          | 4.44 | 0.0005        | 0.01          |
| 1.90 | FLD1 B | ベンゾ (g,h,i) ペリレン    | 4   | 1.78           | 5.34           | 1.20 | 0.0005        | 0.02          |
| 2.45 | FLD1 D | インデノ (1,2,3-cd) ピレン | 4   | 1.80           | 5.41           | 3.07 | 0.0053        | 0.40          |

**表 3**  
Agilent 1260 Infinity LC システムを用いた UHPLC メソッドのまとめ

## 土壌サンプル

地元の郊外または村で得られた低濃度汚染土壌をサンプルとして、PAH 分析をおこないました。土壌に 3 つの濃度の PAH ミックスを添加しました (土壌 1 kg 中 1 mg、10 mg、100 mg)。添加濃度は、汚染されていない地域で土壌 1 kg 中の土壌中バックグラウンド PAH が 1~3 mg、工業用地で土壌 1 kg 中最大 100 mg というバーデン=ヴェルテンベルク州の汚染地域に関する指

標値をもとに選択しました。PAH を添加していないブランク土壌を分析したバックグラウンドを図 5 に示しています。揮発性 PAH のほとんどを除き、未添加ブランクサンプルでは、すべての PAH がすでに検出可能な濃度で存在しています。このブランク土壌サンプルでは、土壌 1 kg 中の総 PAH 濃度は 0.63 mg でした。このことは、PAH 汚染レベルがきわめて低いことを示しています。

## ピーク番号

- 1 ナフタレン
- 2 アセナフチレン
- 3 アセナフテン
- 4 フルオレン
- 5 フェナントレン
- 6 アントラセン
- 7 フルオランテン
- 8 ビレン
- 9 ベンゾ (a) アントラセン
- 10 クリセン
- 11 ベンゾ (b) フルオランテン
- 12 ベンゾ (k) フルオランテン
- 13 ベンゾ (a) ビレン
- 14 ジベンゾ (a,h) アントラセン
- 15 ベンゾ (g,h,i) ペリレン
- 16 インデノ (1,2,3-cd) ビレン

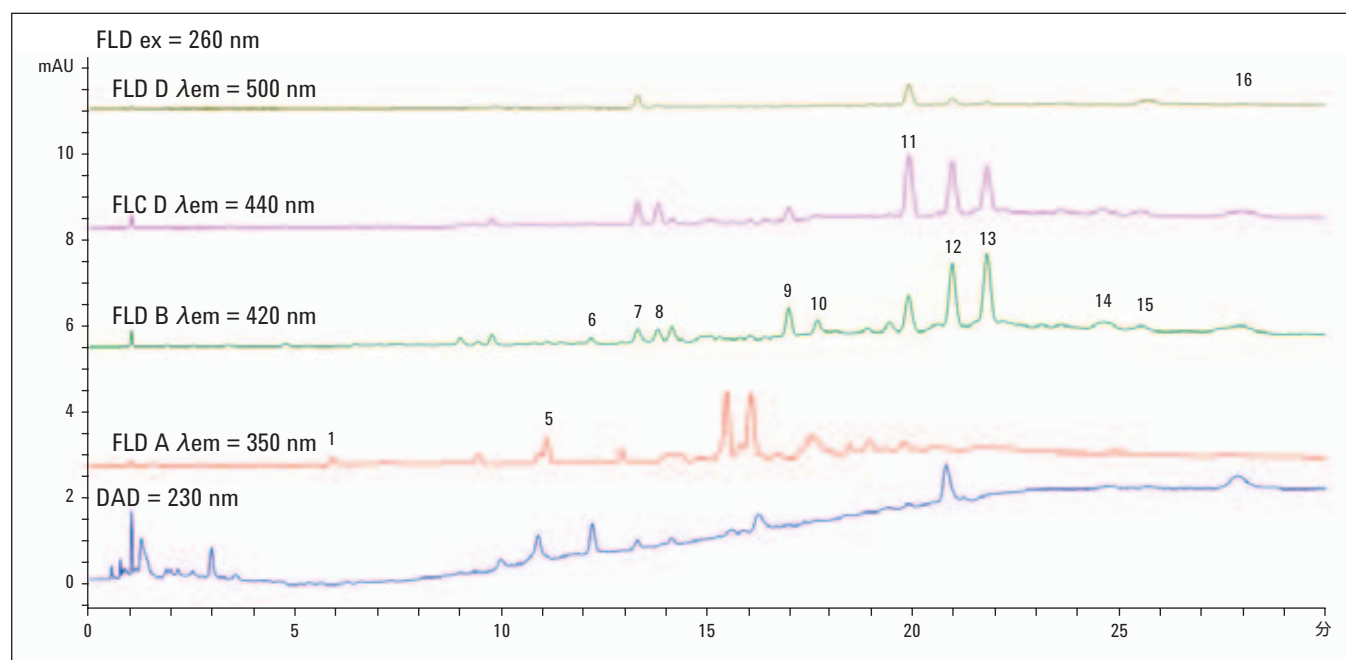


図 5  
土壌中のブランク PAH バックグラウンド

3 種類の添加サンプルのすべてにおいて、抽出手順後の回収率は 85 % 前後でした (表 4 参照)。15 % のロスは、おもにナフタレン、アセナフチレン、アセナフテンなどの揮発性化合物や小型の PAH 化合物の蒸発によるものと考えられます。

| 添加濃度      | 回収率  |
|-----------|------|
| 1 mg/kg   | 87 % |
| 10 mg/kg  | 85 % |
| 100 mg/kg | 84 % |

表 4  
土壌から抽出した PAH の回収率

## 結論

このアプリケーションノートでは、PAH 分析における Agilent 1260 および 1290 Infinity LC システムの適用可能性を実証しています。EPA 3550C に従ったサンプル前処理 (抽出とロータリーエバポレーターを用いた濃縮を含む) では、85 % の回収率を得られました。Infinity LC システムの優れた直線性と精度により、土壌中 PAH の正確な定量が実現します。

## 参考文献

1. Stoffverhalten von Gaswerkspezifischen Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe (1997).
2. K. Theo von der Trenck, Joachim Ruf und Manfred Flittner, gGuide values for contaminated sites in Baden-Württemberg h, ESPR – Environ. Sci. & Pollut. Res. 1 (4) 253-261 (1994).

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc., 2011  
Published in Japan, September 1, 2011  
Publication Number 5990-8414JAJP



**Agilent Technologies**