Sep-Pak シリカカートリッジからの多環芳香族炭化水素の溶出特性

横山ひろみ・川田　邦明・森山　登

Elution Patterns of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons from Sep-Pak Silica Cartridge Column

Hiromi Yokoyama, Kuniaki Kawata and Noboru Moriyama

Sep-Pak silica cartridge column chromatography was investigated as a clean-up method for determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment by HPLC. PAHs studied were benzo(e)pyrene (B(e)P), perylene(Per), benzo(b)-fluoranthene (B(b)F), benzo(k)fluoranthene (B(k)F), benzo(a)pyrene (B(a)P) and benzo(ghi)perylene (B(ghi)P). Three eluents, *i. e.* n-hexane, n-hexane/benzene (9/1) and n-hexane/diethyl ether (95/5), were evaluated and the last eluent gave the best results; the 6 PAHs were recovered by the eluent volume of 5ml from the cartridge in the range of 90–105%. The elution patterns from Sep-Pak silica cartridge column were presented under the best conditions for 6 PAHs.

1　は　じ　め　に

物質の燃焼や熱分解によって生成する多環芳香族炭化水素類（PAHs）にはベンゾ(a)ピレンをはじめとして多数の発癌性物質が含まれているが，これらPAHsは，環境中に広く分布していることが知られている[1),2)]．環境中のPAHsの分析法は蛍光分光光度計で測定するものが主流であったが[3),4)]，近年，ガスクロマトグラフ法[5)]，ガスクロマトグラフ質量分析法[6)]，高速液体クロマトグラフ（HPLC）法[7)−15)]による分析例が報告されている．なかでも，HPLC法は化合物により蛍光検出器の波長を設定することで，選択的かつ高感度に検出できることから多くの報告例がある．

一般に，HPLC測定する試料は保持時間や測定値に変動を招く原因となるカラムの目詰まりや劣化を防ぐために何等かのclean-up操作が必要とされており，液々分配[11)]やカラムクロマトグラフィー[11)−13)]等の手法が用いられてきた．しかし，これらの操作は煩雑であり分析精度の低下を招きやすい．また，PAHsは光照射化で容易に分解する[2)]ので，その分析においては，手法の簡略化，迅速化が必要とされる．

そのため，前処理操作を行わず直接HPLCに注入する方法[7),8)]や，従来のカラムクロマトグラフ法に比して操作が簡便で信頼性，再現性が高いとされているミニカートリッジカラムで前処理を行う方法等が報告されている[14),15)]．

著者らは底質をはじめとする環境試料中のPAHsをHPLCにより分析するために，とくにclean-upを行わない吉川ら[7)]，嵐谷ら[8)]の方法を適用してみたところ，試料によっては妨害があったことからclean-upの必要性を認めた．そこで，操作が簡便で，信頼性，再現性が高く，ルーチン分析に適切であると考えられたミニカートリッジカラムによるclean-upを適用するための基礎的検討を行った．ここでは，6種のPAHsについてSep-Pakシリカカートリッジからの溶離特性について検討した結果を報告する．

2　実　験　方　法

2.1　試　薬

ベンゾ(a)ピレン(B(a)P)，ペリレン(Per)，ベンゾ(e)ピレン(B(e)P)，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(ghi)ペリレン(B(ghi)P)は，和光純薬工業㈱製特級試薬を使用した．アセトニトリルは関東化学㈱製HPLC用を用いた．n−ヘキサン，ベンゼン，ジエチルエーテルは和光純薬工業㈱製残留農薬試験用を使用した．その

他の試薬はいずれも特級試薬を用いた.

2.2　器具及び装置

HPLC は日本分光工業㈱製 LC－800 シリーズを用い，検出器には同社製蛍光分光光度計 FP－210を使用した．超音波発生装置は島田理科工業㈱製 EN－20S－1A，ロータリーエバポレーターは柴田化学㈱製RE120を用いた．ミニカートリッジカラムはWates Associates社製Sep-Pakシリカカートリッジを，HPLC用ディスポーザブルフィルターは倉敷紡績㈱製クロマトデスク4Nを使用した.

2.3　HPLC条件

カラムはガスクロ工業社製 Inertsil ODS (150×4.6 mm i.d.) を用いた．ガードカラムには Inertsil ODS を充填したミニガードカラム (10×4 mm i.d.) を使用した．移動相はアセトニトリル／水 (7／3) を流速 1.5 ml／min で溶出を行った．カラム温度40℃，試料注入量10～100μlとした．蛍光分光光度計の励起波長(λex)，蛍光波長 (λem) を Table 1 に示す.

2.4　PAHsの定量

PAHsの定量は，ピーク高さ及び面積を測定し，別に作成した検量線から算出することにより行った.

2.5　試料液の作成及び Sep－Pak シリカカートリッジによる clean-up

試料は 0.5μg/g 相当の6種の PAHs を添加した底質を使用した．試料からの抽出は辻ら[14]の方法に準じた．clean-up を行わず HPLC 試料液とする場合は，得られた抽出液を乾固後，アセトニトリルを用いて超音波抽出し，アセトニトリル試料液とした．Sep-Pak シリカカートリッジを用いて clean-up を行う場合は同様の操作でn－ヘキサン試料液とし，以下の操作を行った.

n－ヘキサン試料液を Sep-Pak シリカカートリッジに移し，溶離液で溶出を行った．得られた溶出液は，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し，さらに窒素気流下で乾固した後，残留物を超音波抽出にてアセトニトリルに溶解し，HPLC 用試料液とした．HPLC 用試料液は，いずれも，ディスポーザブルフィルターでろ過し，懸濁物等を除去した.

Table 1　Wavelengths for spectrofluorometric detection

Detection wavelength (nm) λex[a]	λem[b]	PAHs
288	378	B(e)P
365	410	B(b)F, B(k)F, B(a)P, B(ghi)P
440	475	Per

a) Excitation wavelength.
b) Emission wavelength.

3　結果と考察

3.1　HPLCによる分離条件の検討

PAHs を ODS 系のカラムを用いた逆相クロマトグラフィーで分析する場合，移動相に単一組成液を用いる溶離では，PAHs の構成炭素数と保持時間の対数の間に相関関係があることから，構成炭素数が等しい PAHsはクロマトグラム上の近接した位置に出現し，時には重なり合うことが知られている[16]．対象とした6種のPAHsのうち B(ghi)P を除く5種は構成炭素数が等しい化合物であるため，これらの化合物を分離定量できるHPLC条件を検討した．その結果，2.3に示した条件で最も良好な分離が得られた.

λex 365 nm，λem 410 nm で検出した場合の感度を，Table 2 に，また，クロマトグラムを Fig. 1 に示した．この測定条件では，B(b)F，B(k)F，B(a)P及び B(ghi)P が検出される．B(k)F と B(a)P のピークは若干の重なりをみるものの分離定量は充分可能であった.

Per，B(e)P は保持時間が等しいが，それぞれ，λex 440 nm，λem 475 nm及び λex 288 nm，λem 378 nmで測定することにより選択的に定量できることを確認した.

3.2　ガードカラム装着の効果

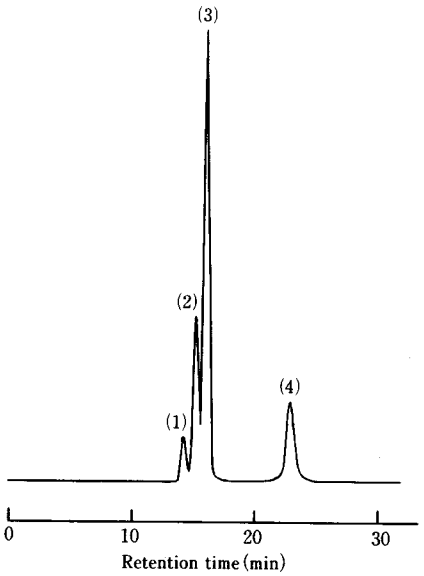
2.5で得られたアセトニトリル試料液を，吉川ら[7]の方法に準じて clean－up 操作を行わず直接HPLCに注入した．このとき試料液は褐色に着色していた．また，λex 365 nm，λem 410 nmにおけるクロマトグラムはベースラインの上昇やB(a)P ピーク前後に夾雑ピークがみられピークの同定や定量に弊害となることがわかった.

そこでガードカラムを装着し，その効果について検討を行ったが，ベースラインの上昇や，夾雑ピークの妨害を防ぐことはできなかった．また，ガードカラムを装着しないときに比べて分離能が低下し，近接しているB(b)F，B(k)F，B(a)Pの三本のピークを識別するのが困難であった．以上のことから，注入前の前処理として何等かの clean-up 操作が必要であることがわかった.

Table 2　Retention times and fluorescence intensity of polynuclear aromatic hydrocarbons

PAHs	Retention time (min)	Relative fluorescence intensity[a]
B(b)F	18.19	0.0741
B(k)F	19.04	0.1983
B(a)P	19.87	1.0
B(ghi)P	29.12	0.3885

a) λex : 365 nm ; λem : 410 nm.



Flg.1 The high-performance liquid chromatogram of polynuclear aromatic hydorocarbons with fluorescence detection.

Chromatographic condition, column：150mm×4.6mm i.d. Inertsil ODS column, eluent：7/3 (v/v) CH_3CN/H_2O, column temperature：40°C, flow rate：0.75ml/min, injection volume：50μl, fluorescence detection condition：λ ex 365nm, λ em 410nm. (1)B(b)F 0.5ng (2)B(k)F 0.5ng (3)B(a)P 0.5ng (4)B(ghi)P 0.5ng

3.3　Sep-Pak シリカカートリッジの clean-up 効果

n-ヘキサン試料液を Sep-Pak シリカカートリッジに移し，n-ヘキサン／ベンゼン（9／1）10mlで溶出を行った[14]ところ，2～3ml程度の溶出の比較的初期から着色物質の溶出がみられた．そして，溶出液を乾固後，アセトニトリルに溶かしたHPLC用試料液は微黄色に着色していた．本法では試料中の着色成分を完全に除去することはできなかった．

そこで，玉川ら[15]の方法に従ってn-ヘキサン25mlを溶出液とする方法について検討した．玉川らは，食品試料の場合 n-ヘキサン／ベンゼン（9／1）10mlより，n-ヘキサン25mlを溶離液とする方が clean-up効果が高いとしている．しかし，底質試料に試みたところ，溶出量が少量の時は着色物質の溶出が見られなかったが溶出量が増すにつれて着色物質が溶出し，25ml溶出後，乾固し，アセトニトリルに転溶した試料液はn-ヘキサン／ベンゼン（9／1）10mlで溶出した試料液と同程度の微黄色の着色が見られた．

HPLC で測定したクロマトグラムでは溶離液に n-ヘキサン／ベンゼン（9／1）10mlまたはn-ヘキサン25mlを用いる2法とも Sep-Pak シリカカートリッジによる clean-up を行わない時に見られたベースラインの上昇や夾雑ピークはいずれも減少し，十分な clean-up 効果が認められた．

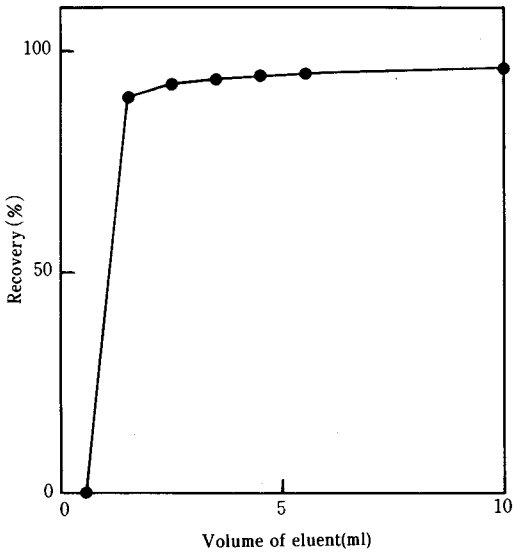


Fig.2 Elution pattern of B(a)P from Sep-Pak silica cartrige

そこで，さらに溶離効果を高めるため溶離液としてn-ヘキサン／ジエチルエーテル（95／5）を用いその適用を検討した．

まず，この溶離液を用いB(a)Pの溶出分画を調べた．得られた溶出パターンをFig. 2 に示した．この溶離液5mlでB(a)Pは完全に溶出することができた．

次に前記した2法と同様に clean-up 効果について検討した．その結果，clean-up 効果の相違は，試料の外観からも，HPLC のクロマトグラムからも認められなかった．すなわち，抽出液5mlをとり，乾固，アセトニトリルに溶解させたHPLC試料液はヘキサン25mlで得られたそれに遜色ないものであった．

HPLC 測定のための十分な clean-up 効果が認められれば，操作の簡便性，迅速性を考えた場合，小容量の溶媒で溶出が終了したほうが有利である．さらに，健康上の配慮等を考え合わせると，溶離液にはヘキサン／ジエチルエーテル（95／5）5mlを適用することが最適と考えられた．

3.4　Sep-Pak シリカカートリッジからの他のPAHsの溶出パターン

溶離液にn-ヘキサン／ジエチルエーテル（95／5）を用いたときのB(a)P以外のPAHs の溶出特性を調べた．結果を Table 3 及び Fig. 3 に示した．

いずれのPAHsも5mlの溶離液で94～106％が溶出した．したがって，n-ヘキサン／ジエチルエーテル(95／5)

Table 3　Recoveries of PAHs from Sep-Pak silica cartridge[a)]

PAHs	Recovery (%) 5 ml[b)]	10 ml[b)]
Per	105	107
B(e)P	90.1	91.2
B(b)F	106	106
B(k)F	94.0	95.0
B(ghi)P	98.0	99.2

a) Eluent : n-hexane／diethyl ether (95／5).
b) Volume of eluent.

5 mlを溶離液とするSep-Pakシリカカートリッジによるclean-upはB(a)Pのみでなく，これらのPAHsの測定にも適用できるものと考えられる．

4　おわりに

Per，B(e)P，B(b)F，B(k)F，B(a)P，B(ghi)PのSep-Pakシリカカートリッジカラムからの溶出特性を検討したところ，n－ヘキサン／ジエチルエーテル（95／5）5 mlで良好な溶出率を得た．また，この条件で底質試料にSep-Pakシリカカートリッジによるclean-up法を用いることにより，HPLC測定におけるベースラインの上昇，夾雑ピークの除去等に十分な効果が認められた．さらに，他のPAHsについても適用を検討中である．

謝　辞

B(k)Fの標準品を提供していただいた新潟市衛生試験所磯野博氏ならびに山田耕嗣氏に深く感謝いたします．

5　参考文献

1）松下秀鶴：多環芳香族炭化水素．環境汚染物質と毒性　有機物質編（化学の領域増刊号），南江堂，p.115, 1980.
2）J. W. Anderson, J. W. Blaylock, J. Barwell-Clarke : Environ. Sci. Technol., **12**, 832 (1978).
3）松下秀鶴，江角凱夫，鈴木　彰，半田　隆：分析化学，**21**，1471 (1972).
4）松下秀鶴，加藤幸彦，久松由東：大気汚染学会誌，**15**，348 (1980).
5）R. F. Lee, W. S. Gardner, J. W. Anderson, J. W. Blaylock : Bull. Environ. Contam. Toxicol., **22**, 653 (1979).
6）H. Matsushima : Agric. Biol. Chem., **43**, 1447 (1979).
7）吉川サナエ，佐野　仁，頭本藤雄，森田昌敏：水質汚濁研究，**5**，49 (1982).
8）嵐谷奎一，吉川正博，児玉　泰：衛生化学，**31**，24 (1985).
9）松下秀鶴，塩崎卓哉，加藤幸彦，後藤純雄：分析化学，**30**，362 (1981).
10）塩崎卓哉，田辺　潔，松下秀鶴：大気汚染学会誌，**19**，300 (1984).
11）岡本　寛，土屋悦輝，西垣　進：昭和57年度化学物質分析法開発調査報告書，環境庁環境保健部保健調査室 (1983).
12）角脇　怜，山本　甫，森田祐三：愛知県公害センター所報，**12**，8 (1984).
13）嵐谷奎一，吉川正博，児玉　泰：産業医科大学雑誌，**3**，403 (1981).
14）辻　功，小出圭子，森山秀樹，田辺　潔，松下秀鶴：食品衛生学会誌，**26**，50 (1985).
15）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 (1986).
16）原　昭二，辻　章夫編：最新液体クロマトグラフィー，南山堂，p. 275 (1978).

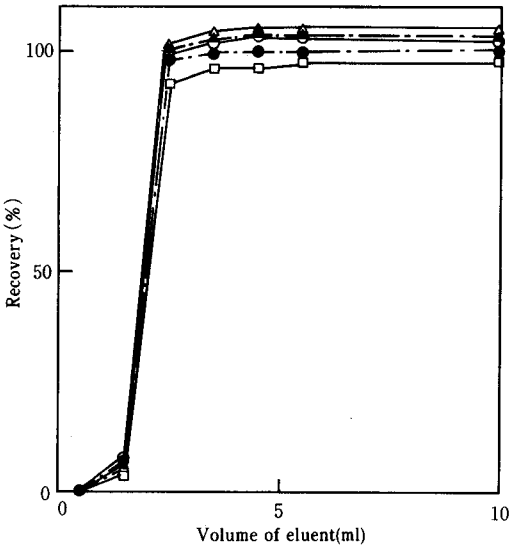


Fig.3　Elution patterns of PAHs from Sep-Pak sllica cartrige
△：Per　□：B(e)P　▲：B(b)F　●：B(k)F　○：B(ghi)P