報 文

大気粉じん中多環芳香族炭化水素類の多成分同時抽出 における超臨界流体抽出法の適用

小 田 淳 子*

Application of supercritical fluid extraction for the analysis of
polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates

Junko ODA*

* Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health, 739-1, Uchio, Okayama
701-0212

(Received 13 January 1999, Accepted 26 February 1999)

An extraction and separation method using supercritical fluid extraction (SFE) has been investigated for the pretreatment of PAHs as well as benzo[*a*]pyrene (BaP) in airborne particulates, which is estimated to be one of the so-called endocrine disruptors. The instrumental parameters of SFE were considered for the quantitative SFE of 30 PAHs spiked in airborne particulates. The extraction efficiency of SFE with the optimized operating conditions was compared to that of the classical method using sonication extraction to be applied to real sample analysis. The extraction efficiencies for 30 representative PAHs were influenced by such factors as the extraction temperature, density of the extraction fluid, volume of the extraction fluid, the extraction time, elute solvent from an analyte trap and the extraction size of samples. It was shown that the combination of three different conditions of SFE and the use of 5% methanol-modified supercritical carbon dioxide lead to more efficient recoveries of PAHs from airborne particulates. The SFE recoveries for higher molecular-weight PAHs (>178 amu) than phenanthrene ranged from 70.3 to 103%, while those with sonication extraction ranged from 67.8 to 99.5%. The SFE results obtained from 31 samples of native particulates in air were also comparable to the sonication values in terms of the BaP concentrations and its correlation coefficient. The average of the SFE recoveries for the BaP concentrations was 120%, and the correlation coefficient was 1.00 versus to their values certified, respectively, with sonication procedure. The results of this work indicate that the proposed method with SFE is useful for the rapid and effective pretreatment of airborne particulates. The SFE condition optimized from the experimental results was as follows. Step-1: extraction fluid, pure CO₂; extraction temperature, 60°C; density, 0.65 g/ml; static/dynamic extraction time, 2/10 min; extract trap temperature, -5°C; rinse trap temperature, 30°C; trap rinse, 1.6 ml of acetone. Step-2: extraction fluid, 5% methanol-modified CO₂; extraction temperature, 80°C; density, 0.65 g/ml; static/dynamic extraction time, 2/20 min; extract trap temperature, 80°C. Step-3: extraction fluid, pure CO₂; extraction temperature, 80°C; density, 0.35 g/ml; static/dynamic extraction time, 2/5 min; extract trap temperature, 80°C; rinse trap temperature, 40°C; trap rinse, 1.6 ml of acetone.

Keywords : polycyclic aromatic hydrocarbon; supercritical fluid extraction; airborne particulate; extraction and separation; extraction efficiency.

1 緒 言

ベンゾ[*a*]ピレン (BaP) をはじめとする多環芳香族炭化水素類 (PAHs) は大気汚染物質として良く知られており、その多くはディーゼル車の排ガスに含まれている。また、生物学的には変異原性や発がん性を示すものが明らかにされている。近年のディーゼル車増加による大気汚染状況の悪化はこれら PAHs が原因物質となって肺がんの高い死亡率に影響を与えているとの指摘がある¹⁾²⁾。

一方最近では、外因性内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) によるヒトや生物への影響が取り上げられ、日本及び世界で大きな社会問題になっている^{3)~8)}。環境庁は1998年5月、「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPED '98」を公表し、67物質 (群) を発表した⁹⁾。様々な物質についてその作用が疑われている。この中には、ダイオキシン類、ビスフェノール、BaP等のPAHsも含まれている。現在、環境ホルモンに関する調査研究は国内外で急速に進められている^{10)~14)}。そこで、BaPをはじめとするPAHsの生体への影響評価において、PAHsによる環境汚染の実態を早急に明らかにする必要があり、そのためには多数の環境試料を迅速に前処理できる方法が求められている。

従来、大気粉じんからのPAHsの抽出はソックスレー又は超音波による固液抽出法がはん用されてきた^{15)~24)}。これらの方法では、PAHsの微量分析における同定及び定量精度を高めるため固相材やカラムクロマトグラフィーを用いたクリーンアップ操作を加えることが多く、一連の操作は数時間から数日間かかる場合がある。PAHsによる環境汚染実態を的確に解明する上で、多種類のPAHsの同時分析が重要であるが、従来法を用いて多成分同時分析法を検討する場合は、繰り返し操作に多大の時間がかかり、また多くの試料に適用して迅速なPAHsの抽出を行うことは困難である。したがって、多くの試料が迅速に抽出できる新たな抽出法の開発が必要と考えられる。また、従来の有機溶媒を用いる抽出法は溶媒の毒性や廃棄処理、コスト面等において課題がある。ジクロロメタン、ベンゼン等の有機溶媒は大気汚染防止法の

改正により1996年2月から有害大気汚染物質に指定され²⁵⁾、環境庁は環境への放出や発生量を抑えるための対策に優先的に取り組んでいるところである。

現在、有機溶媒を使用しない試料の抽出法として超臨界流体抽出法 (SFE) が注目されており、食品の成分抽出や一部の環境分析に利用されている^{26)~39)}。超臨界流体は液体の高い溶解力と気体の高拡散性の特性とを併せ持ち、分離・抽出の媒体として好ましい性質を有している。特に、超臨界CO₂は低い臨界点と低毒性、安価等の利点があり^{40)~42)}、有機溶媒を使用しないため環境化学分野におけるSFEの利用価値は極めて高い。SFE装置の利用は抽出操作の自動化を図ることができるため、処理時間の大幅な短縮が期待される。そこで、環境大気粉じんからのPAHsの抽出において、従来の超音波抽出法に代わる迅速かつ自動処理が可能な抽出法を開発するため、CO₂を超臨界流体とするSFE法を用いて、その適用を検討することにした。SFE法の特徴は装置パラメーター条件の選定が抽出能力の変化に重要な意味を持つことである⁴⁰⁾。設定したパラメーター条件の内容は目的物質の抽出効率を左右するため、条件の選択は極めて重要である。SFE法を用いて大気粉じんのPAHs抽出を標準的に行うためには、PAHsの抽出効率に影響する様々な要因の解明と実験技術の構築が必要である。本研究では、大気粉じんからのPAHs多成分の同時抽出におけるSFEの最適化を目的として、密度、温度、修飾剤添加等の装置パラメーターと抽出効率との関係について検討した。得られたSFE条件を実際に環境大気粉じんのPAHsの抽出・分離に適用してSFE法の有用性を明らかにした。

2 実 験

2・1 試薬及び試料

対象としたPAHsはアメリカ環境保護局 (EPA) メソッドTO13と環境庁プライオリティリストを参考にし、parent PAHsとその構造異性体及び複素環PAHs (チオフェン類) の30種類を選定した。PAHsの物質名を分子量順に番号を付けてTable 3に示す。これらは東京化成製及びシグマアルドリッチジャパン製を購入した。内標準のフルオランテン-*d*₁₀、*n*-エイコサン-*d*₄₂ (C₂₀D₄₂)、*n*-テトラコサン-*d*₅₀ (C₂₄D₅₀)、*n*-ドリアコンタン-*d*₆₆ (C₃₂D₆₆) 及び外標準の14種類の重水素置換型PAHsは

* 岡山県環境保健センター: 701-0212 岡山県岡山市内尾 739-1

CIL ジャパン製を購入した。溶出溶媒及び修飾剤用溶媒は関東化学又は和光純薬製の HPLC 用ヘキサン、アセトン、ジクロロメタン、ベンゼン、テトラヒドロフラン及びメタノールを使用した。超臨界流体用 CO_2 は昭和炭酸製の液体 CO_2 (99.9990 vol.%以上)、ポンプ及びトラップ冷却用 CO_2 は大同ホクサン製の液体 CO_2 (99.99%) を使用した。検量線標準溶液は各 PAHs の 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 標準原液を作製した後、30 種類の標準原液を濃度 0.001~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように混合希釈し、内標準溶液フルオランテン- d_{10} (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1 ml を加えて全量を 10 ml に調製した。添加回収試験用の粉じん汚紙は紀本工業製ハイボリュームエアサンプラー Model-120F を用いて、流量 1500 l/min で 24 時間大気 2160 m^3 を Pallflex 製の石英繊維汚紙 2500QAT-UP に採取し、これを 45 mm ϕ の円形 (大気約 86 m^3 中の粉じんを吸引) に切断して使用した。実試料測定用の大気粉じんは同方法を用いて岡山県内の環境 5 地点で採取した。

2・2 SFE 装置及び抽出方法

SFE 装置は Hewlett-Packard 製の SFE 7680T を使用した。装置は Fig. 1 に示すように送液ポンプ部 (1~8)、試料の抽出部 (9~13)、抽出物の一時捕集部 (14~16)、抽出物の溶出液捕集部 (17~20) で構成される。送液ポンプ部は超臨界 CO_2 の試料抽出部への流入段階で少量の溶媒 (修飾剤) を添加するため、2 台の送液ポンプからなる。試料抽出部は 15 ml のステンレス製抽出管 8 本からなり、試料の連続自動抽出ができる。7680T 装置では、抽出温度 40~120 $^{\circ}\text{C}$ 、抽出密度 0.2~0.87 g/ml の範囲で抽出条件を設定できるが、抽出温度と密度の入力値から圧力を換算してその圧力が 38 MPa を超えない設計になっている。一時捕集部は固相材を充填したトラップ管とその両側にリストリクターと呼ばれるキャピラリー管が接続する。最終の溶出液捕集部は分析物を含む溶出液を捕集するバイアル瓶 21 個からなる。SFE 7680T による抽出では、はじめに試料の入った試料容器内に超臨界 CO_2 を臨界圧力以上に加圧導入した後、容器出口のバルブを閉じて試料を一定時間超臨界流体中に静置させる静的抽出 (スタティック) を行い、次いで臨界圧力以上に加圧した抽出溶媒を連続して試料容器に一定流量で流し、試料の動的抽出 (ダイナミック) を行った。この間、 CO_2 ガスとともに放出された抽出物を持った冷却したトラップ管に吸着捕集し、 CO_2 ガスと分離した。本実験のトラップ材はオクタデシルシラン (ODS) を使用した。次にトラップ管内の溶出物を少量の溶媒で溶出させ、その溶液をバイアル瓶に捕集した。

Fig. 1 Extractor plumbing of the SFE instrument with considerable hardware

1: CO_2 ; 2: modifier; 3: high-pressure pump for CO_2 ; 4: high-pressure pump for modifier; 5: pump check valves; 6: pulse damper; 7: overpressure transducer; 8: prefilter; 9: bypass valve; 10: chamber valve; 11: preheater; 12: chamber; 13: control pressure transducer; 14: pressure isolation valve; 15: prenozzle filter; 16: analyte trap and nozzle; 17: rinse solvent select valves of solvent A and B; 18: rinse pump active inlet valve; 19: rinse solvent pump; 20: tray with vials valve

SFE 7680T は上記の一連の操作を 1 段階の抽出条件として定め、同一試料に対して 20 段階の抽出条件が設定できる。本実験では、装置パラメーターの影響特性の検討は 1 段階抽出で行い、従来法との比較検討は 1~3 段階の抽出で行った。

2・3 実験方法

2・3・1 超音波抽出 細切した粉じん汚紙 1 枚を 10 ml 試験管に入れ、ベンゼン-エタノール混液 (4:1) 5 ml を加えて 20 分間超音波装置 (超音波工業製 UC-30F28-45A20) 中で抽出を行った。抽出液 2 ml を分取し、5% 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml を加えて 1 分間振り混ぜかくはんの後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。次いでベンゼン相 1 ml を分取し、pH 2 のリン酸緩衝液 1 ml を加えて 1 分間振り混ぜかくはんの後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。ベンゼン相に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、5% 含水シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップを行い¹⁶⁾,

Table 1 SFE condition for GC/MS analysis of representative 30 PAHs

Parameter	Values		
	Step 1 condition for low PAHs	Step 2 condition for high PAHs	Step 3 condition for high PAHs
Extraction conditions			
Extraction fluid	CO ₂	CO ₂ + 5% MeOH	CO ₂
Temperature	60°C	80°C	80°C
Density	0.65 g/ml	0.65 g/ml	0.35 g/ml
Pressure	16.5 MPa (2390 psi)	22.7 MPa (3295 psi)	13.2 MPa (1916 psi)
Flow rate of CO ₂	2.0 ml/min	2.0 ml/min	2.0 ml/min
Static time	2 min	2 min	2 min
Dynamic time	10 min	20 min	5 min
Trap conditions			
Solid trap	ODS 30 ~ 50 µm	ODS 30 ~ 50 µm	ODS 30 ~ 50 µm
Extract nozzle temp	80°C	80°C	80°C
Extract trap temp	-5°C	80°C	80°C
Reconstitution			
Rinse solvent	acetone	none	acetone
Rinse flow rate	1.0 ml/min (1.6 ml)		1.0 ml/min (1.6 ml)
Rinse nozzle temp	20°C		30°C
Rinse trap temp	30°C		40°C

窒素ガスを吹き付けて 0.5 ml に濃縮した。この溶液に内標準溶液フルオランテン-*d*₁₀を加えて全量を 1 ml にし、GC/MS 選択イオン検出 (SIM) 法で定量した。

2・3・2 抽出効率に影響を与える要因の検討 抽出時の温度、超臨界流体の密度、抽出モード、抽出流量、トラップからの溶出溶媒及び溶出量を装置パラメーターとして、各パラメーターの抽出効率に与える影響特性を検討した。各パラメーターにおける PAHs の添加回収実験は、標準品の混合ヘキサン溶液 (10 µg/ml) 0.4 ml を大気粉じん汙紙に添加し、SFE で抽出した。PAHs を添加しない粉じん汙紙を同条件で抽出し、粉じん中の PAHs のバックグラウンド値を求めた。各パラメーターでの回収率は抽出液中に回収された PAHs 量の添加量に対する割合から求めた。同一条件での実験・測定は 3 回行い、平均値で評価した。また、試料量の影響の検討は 4.0, 1.0, 0.1 µg の PAHs を添加した 3 種類の粉じんと、PAHs を添加しない大気粉じん 45 検体を用いて SFE と超音波法により抽出した。各抽出物を含む溶出液に内標準フルオランテン-*d*₁₀を加えて GC/MS で分析した。

2・3・3 複数の SFE 条件による抽出 30 種類の PAHs が高抽出率で回収できる SFE 条件を求めるため、4 µg の PAHs を添加した粉じん汙紙に 2 段階の抽出条件を組み合わせた SFE 条件を設定した。1 段目の抽出条件は超臨界 CO₂、抽出温度 60°C、流体密度 0.35 g/ml、

溶出溶媒アセトン 1.6 ml とし、2 段目の抽出条件は超臨界 CO₂、抽出温度 80°C、流体密度 0.65 g/ml、溶出溶媒アセトン 1.6 ml とした。

2・3・4 同位体希釈法による回収率補正 SFE による PAHs の回収率のばらつきを補正するため、同位体希釈 (サロゲート) 法⁴³⁾の補正効果を検討した。4 又は 0.1 µg の PAHs を添加した粉じん汙紙に対し、サロゲートとして 14 種類の *d*-PAHs 4 µg を添加して SFE で抽出した。用いたサロゲートはフルオレン-*d*₁₀、ジベンゾチオフェン-*d*₈、フェナントレン-*d*₁₀、アントラセン-*d*₁₀、フルオランテン-*d*₁₀、ベンズ[*a*]アントラセン-*d*₁₂、クリセン-*d*₁₂、ベンゾ[*e*]ピレン-*d*₁₂、ベンゾ[*a*]ピレン-*d*₁₂、ペリレン-*d*₁₂、インデノ[1,2,3-*cd*]ピレン-*d*₁₂、ジベンズ[*a,h*]アントラセン-*d*₁₄、ベンゾ[*ghi*]ペリレン-*d*₁₂、コロネン-*d*₁₂であった。抽出液 1.6 ml に対して C₂₀D₄₂、C₂₄D₅₀ 及び C₃₂D₆₆ の内標準混合溶液を濃度 0.2 µg/ml になるよう加え GC/MS で分析した。

2・3・5 修飾剤添加 CO₂ による抽出試験 超臨界 CO₂ に修飾剤と呼ばれる少量の有機溶媒を添加し、4 µg の PAHs を添加した粉じんを抽出した。ここでは、アセトン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノールの 4 種類を検討した。修飾剤の添加濃度は 1, 2, 5, 10%v/v の報告例がある²⁸⁾³⁴⁾³⁹⁾なかで、効果の見られた 5%v/v 添加濃度を採用した。抽出条件は Table 1 に示すように抽出温度、密度を変えて同一試料に対し 3 段で行い、

修飾剤は2段目の抽出に添加し、3段目で抽出経路における修飾剤の除去を行った。

2・3・6 SFE法と超音波抽出法による添加回収率試験の比較 添加回収におけるSFEの抽出効率を検討するため、Table 1に示す3段階のSFE条件と超音波抽出法を用いて4 μ gのPAHs添加粉じんを抽出した。SFEによる1試料当たりの抽出時間は約1.5時間とし、添加試験は繰り返し3回行った。

2・3・7 実大気粉じんのSFE法と超音波抽出法による抽出効率の比較 実際の大気粉じん試料におけるPAHsの抽出効率を評価するため、Table 1に示したSFE法と超音波抽出法により大気粉じん31検体を抽出した。粉じん濾紙は超音波抽出法で1枚、SFE法では4枚を使用した。試料抽出液を4mlに定容し、内標準フルオランテン- d_{10} を濃度0.1 μ g/mlになるよう加えてGC/MS分析した。

Fig. 2 Effect of extraction temperature on the recoveries of PAHs, relative to the spiking level, at 0.35 g/ml (A) and 0.65 g/ml (B) of density 4 μ g of PAHs was spiked in the airborne particulates on a quartz fiber filter. The Arabic numerals indicate the PAHs numbers in Table 3. SFE condition: extraction fluid, pure CO₂; trap, ODS; rinse solvent, 1.6 ml of acetone

2.4 GC/MS 装置及び分析条件

GC/MS 装置: 日本電子製 JEOL JMS-DX303, ガスクロマトグラフ: HP5890J, GC カラム: Methyl Siloxane (Supelco, SPB-1) i.d. 0.25 mm, length 15 m, 0.25 μ m film, カラム温度: 50 $^{\circ}$ C (2 min hold) $\rightarrow$ (20 $^{\circ}$ C/min) $\rightarrow$ 160 $^{\circ}$ C- (5 $^{\circ}$ C/min) $\rightarrow$ 210 $^{\circ}$ C- (10 $^{\circ}$ C/min) $\rightarrow$ 300 $^{\circ}$ C, 注入口温度: 270 $^{\circ}$ C, 注入方法: スプリットレス, キャリヤーガス: ヘリウム 50 kPa (線速度 71 cm/s), イオン源温度: 230 $^{\circ}$ C, インターフェース温度: 300 $^{\circ}$ C, イオン化電圧: 70 eV, 加速電圧: 3 kV, イオン化電流: 300 μ A. GC/MS による定量はそれぞれの PAHs の分子イオンを定量モニターイオンに設定し SIM 法で行った.

3 結果及び考察

3.1 回収率に影響を与える要因

3.1.1 温度, 密度の影響 流体密度 0.35 又は 0.65 g/ml の一定条件下で, 抽出温度を変えたときの PAHs の回収率を Fig. 2 に示す. 流体密度 0.35 g/ml (A) では, 抽出温度 100 $^{\circ}$ C (圧力 15.5 MPa) で回収率がピークを示し, 120 $^{\circ}$ C (圧力 17.8 MPa) では減少した. 流体密度 0.65 g/ml (B) では, 抽出温度 40 $\sim$ 80 $^{\circ}$ C (圧力 10.4 $\sim$ 22.7 MPa) における平均回収率は 58 $\sim$ 64% で抽出温度の効果は小さかった. 分子量の大きい PAHs は流体密度 0.35, 0.65 g/ml の両方で温度の効果が明りよう

に認められた. SFE では一定密度の下で温度を高くすると圧力が増加し, これが溶解度及び抽出効率を高めることにつながる. しかし, 圧力増加に依存する抽出効率の上昇はすべての PAHs で見られたわけではなく, 温度の影響は明確に現れなかった. 抽出温度 60 $^{\circ}$ C の一定条件下で, 流体密度を 0.35, 0.55, 0.65, 0.75 g/ml (圧力 10.8, 13.8, 16.5, 21.8 MPa) に変化させたときの回収率を Fig. 3 に示す. 30 PAHs の平均回収率は 33, 61, 63, 66% であり, 流体密度 0.55 g/ml (13.8 MPa) 以上で回収率の大きく向上した PAHs が多かった. 一定温度の下で流体密度を高めて圧力を増加させることは溶解度を高くする方向にあり, 本実験では密度の影響が明りように見られた. しかし, 圧力 21.8 MPa において 6 種類の低分子量 PAHs (ナフタレン, 1-ベンゾチオフェン, 2-メチルナフタレン, 1-メチルナフタレン, アセナフチレン, アセナフテン) と 3 種類の中高分子量 PAHs (ナフタセン, コロネン, 3,4:8,9-ジベンゾピレン) は 60% 以下であった. SFE は流体密度と抽出温度の設定が重要であるが, 本実験では圧力の増大と回収率は必ずしも比例しなかった. これは物質に依存して抽出効率の高くなる特定の圧力が存在するため⁴⁾と考えられ, PAHs 多成分の同時抽出には各目的物質の溶解度が全体に高まる方向で抽出条件の設定が必要であることが示唆された.

Fig. 3 Effect of CO₂ density on the recoveries of PAHs, relative to the spiking level, at 60 $^{\circ}$ C of extraction temperature

4 μ g of PAHs was spiked in the airborne particulates on a quartz fiber filter. The Arabic numerals indicate the PAHs numbers in Table 3. SFE condition: extraction fluid, pure CO₂; trap, ODS; rinse solvent, 1.6 ml of acetone

Fig. 4 Effect of static and dynamic extraction on the recoveries of PAHs

4 μg of PAHs was spiked on a blank quartz fiber filter. The list of investigated PAHs was shown in Table 3. SFE condition: extraction fluid, pure CO_2 ; extraction temperature, 60°C ; density, 0.65 g/ml (pressure, 16.5 MPa); trap, ODS; rinse solvent, 1.6 ml of tetrahydrofuran

3・1・2 抽出モードの時間と抽出流量の影響 抽出モードの時間と抽出流量がSFEの抽出の進行にどのように影響を与えるかを検討することは重要である。抽出流量や抽出時間をいわずに大きくすることは抽出物を捕集する際の損失を招き、また短時間での抽出が行えなくなる。そこで、抽出温度 60°C 、流体密度 0.65 g/ml の条件でスタティック/ダイナミック抽出時間に4種類の設定 (2 min/2 min, 20 min/10 min, 2 min/20 min, 2 min/10 min) を行い、それぞれの条件で得られたPAHsの平均回収率をFig. 4に示す。4条件の平均回収率は11.5, 20.4, 29.1, 53.9%であり、2 min/10 minの条件が最も良かった。そこで、スタティック/ダイナミック抽出時間を一定の2 min/10 minに保ち、抽出温度 60°C 、流体密度 0.65 g/ml の条件で CO_2 の流量を $0.5 \sim 4.0\text{ ml/min}$ に変化させたときの30 PAHsの平均回収率をFig. 5に示す。抽出流量の増大に伴い回収率は上昇し、 CO_2 流量が $2.0 \sim 4.0\text{ ml/min}$ 、トータル CO_2 量に換算して $20 \sim 40\text{ ml}$ を流したとき上昇が緩やかになった。したがってPAHsの添加回収試験では、2 min/10 minのスタティック/ダイナミック抽出時間、 2.0 ml/min の流量が適切と考えられた。

Fig. 5 Effect of extraction volume of supercritical extraction fluid on the recoveries of PAHs

4 μg of PAHs was spiked in the airborne particulates on a quartz fiber filter. SFE condition: extraction fluid, pure CO_2 ; extraction temperature, 60°C ; density, 0.65 g/ml (pressure, 16.5 MPa); trap, ODS; rinse solvent, 1.6 ml of tetrahydrofuran

3・1・3 トラップからの溶出溶媒の影響 アセトン、ベンゼン、ジクロロメタン、ヘキサン、テトラヒドロフラン、トルエンのそれぞれ 1.6 ml (1バイアル容量に相当) を用いて、トラップから30種類のPAHsを溶出した場合の平均回収率をTable 2に示す。ヘキサン以外の5溶媒による平均回収率は62~68%であった。1-メチルナフタレン以下の分子量の小さいPAHsとナフタセン、コロネン及び3,4:8,9-ジベンゾピレンの回収率はいずれの溶媒でも60%以下であった。溶出量を3.2, 4.8, 6.4, 8.0 ml に増やしたときの回収率の増加は3.2 mlで5%以内にとどまり、溶出量増加の効果は認められなかった。SFEの抽出効率はトラップの溶出溶媒や溶出量より、PAHsの物性や他の抽出要因の影響が大きいと考えられた。本実験では、トラップの溶出溶媒は有害性の少ないアセトン 1.6 ml を用いることにした。

3・1・4 試料量の影響と抽出精度 試料に含まれる測定物質が微量であると試料からの抽出効率は一般に低くなるため、なるべく多量の試料を必要とする。大気粉じん汚紙1枚に4.0, 1.0, $0.1\text{ }\mu\text{g}$ のPAHsを添加し抽出温度 60°C 、密度 0.65 g/ml で抽出を行った結果、平均回収率は62, 56, 47%, 相対標準偏差の平均は5.4, 6.5, 47.2%であった。BaPでは添加量が減少するに従い回収率が84, 73, 56%に低下し、標準偏差は57.2%に増大した。また、実際の大気粉じん試料45検体についてTable 1のSFE条件と超音波抽出法で処理したときのBaP濃度の関係をFig. 6に示す。両者には良い直

Table 2 Effect of rinse solvent from the analyte trap on the recoveries of 30 PAHs

Rinse solvent	Spiked on airborne particulates	
	Recovery, % [†] Average of triplicate	RSD, %
Acetone	67.8	0.5-13.7
Benzene	65.2	6.3-15.4
Tetrahydrofuran	65.9	0.7-27.3
Dichloromethane	66.3	0.2-28.4
Toluene	61.6	0.4-35.5
hexane	47.3	0.6-20.0

[†]: Recovery means the relative mass to the spiking level (4 µg) into an airborne particulate. SFE condition is shown as follows. Pure CO₂ was used as extraction fluid. CO₂ flow rate: 2 min/min; Static/dynamic extraction time: 2/10 min; Extraction temperature: 60°C; Density: 0.65 g/ml (pressure, 16.5 MPa); ODS temperature: -5°C; 1.6 ml of solvent volume is used, respectively.

Fig. 6 Relationship between the SFE method and the sonication extraction method on recoveries of benzo(a)pyrene from 45 native particulates in air

SFE condition: extraction fluid, pure CO₂; flow rate, 2 ml/min; static/dynamic extraction time, 2/10 min; extraction temperature, 60°C; density, 0.65 g/ml (pressure, 16.5 MPa); extract trap temperature, -5°C; rinse solvent, 1.6 ml of acetone

線関係 ($y = 0.6804x$) が認められたが、SFE の抽出効率は超音波抽出法の約 70% であった。特に、超音波抽出法での BaP 濃度が 4 ng/m³ 以下の試料では、SFE での BaP 濃度プロットが回帰直線から下に位置しており、SFE の抽出効率は低濃度域の試料で低下することが明らかになった。環境庁が 1998 年 7 月 16 日付で報道発表した「平成 9 年度有害大気汚染物質モニタリング調査結果について」によると、全国 12 か所の国設大気環境測定所における BaP 濃度は平均 0.66 ng/m³ であった。SFE を用いて高い抽出効率を得るためには、実際の大气濃度から換算して少なくとも 45 mmφ の汙紙 4 枚を抽

出する必要があると考えられた。

3・2 多成分抽出における SFE 条件の最適化

3・2・1 多段の抽出条件の組み合わせ効果

環境分析では多成分の PAHs を同時分析する必要性が高いため、30 種類の PAHs を高回収率で同時抽出できる SFE 条件の設定が重要である。しかし、これまでに検討した 1 段の SFE 条件はいずれも 30 PAHs すべてを抽出するには不十分であった。そこで、流体密度と抽出温度を変えた二つの SFE 条件を同一試料に適用し、得られた回収率の合計を Fig. 7 に示す。1 段目の SFE 条件は主に低～中分子量の PAHs (MW 128～228) の抽出を目的とし、2 段目の SFE 条件は試料中に残る中～高分子量の PAHs (MW 228～302) の抽出を目的とした。フルオレン以上の分子量を有する PAHs は 60% 以上の回収率を示した。このことから、物性の異なる多種類の PAHs を抽出する場合は複数の抽出条件を組み合わせると抽出効率の向上が期待できることが明らかになった。

3・2・2 サロゲート法による抽出効率の補正効果

これまでの検討で、試料中の PAHs 濃度が低い場合は SFE の抽出効率が低下することを明らかにした。このような微量物質の環境分析では、抽出・分離操作で生じる回収率のばらつきや低回収率を補正するため、抽出の段階からサロゲートと呼ばれる同位体物質をあらかじめ試料に添加して同時抽出を行い、サロゲートを外標準にして目的物質を定量する方法 (同位体希釈法又はサロゲート法)⁴³⁾ が採用されている。そこで、4.0 又は 0.1 µg の PAHs とサロゲートを添加した粉じんを SFE で抽出し、PAHs の絶対回収率と同位体希釈法により求めた相対回収率を Fig. 8 に示す。4 µg の添加量では、同位体希釈

Fig. 7 Effect of consecutive SFE on the recovery of PAHs

The list of investigated PAHs was shown in Table 3. 4 µg of PAHs was spiked in the airborne particulates on a quartz fiber filter. SFE condition of step-1: extraction fluid, pure CO₂; extraction temperature, 80°C; density, 0.65 g/ml (pressure, 22.7 MPa); flow rate, 2 ml/min; static/dynamic extraction time, 2/10 min; trap temperature, -5°C; trap rinse, 1.6 ml of acetone. SFE condition of step-2: extraction fluid, pure CO₂; extraction temperature, 60°C; density, 0.35 g/ml (pressure, 10.8 MPa); flow rate, 2 ml/min; static/dynamic extraction time, 2/10 min; extract trap temperature, -5°C; trap rinse, 1.6 ml of acetone

法が80%を示し、絶対平均回収率の62%を上回った。0.1 µgの添加量では、絶対回収率の59%に対し同位体希釈法の相対回収率は66%であり、低濃度のPAHsを含む大気粉じんはサロゲート法での補正の効果が小さいことが分かった。これは添加したサロゲート量に比べて低濃度領域のPAHsの絶対回収率が極めて悪いために、補正効果が明確に現れなかったためと考えられた。

3・2・3 抽出流体への修飾剤添加の効果 超臨界CO₂は無極性溶媒としての性状を示すため、抽出対象物質の持つ極性によっては抽出が困難な場合が生じる。そこで、修飾剤を少量添加して抽出流体の極性を上げる手法が多くのSFE法に用いられている²⁷⁾²⁸⁾³⁴⁾³⁹⁾。Fig 7に見るとおり、2段の抽出条件を同一試料に適用した場合は1段抽出に比べて回収率の改善が認められたが、70%の回収率を示すPAHsは18種類にとどまった。そこで、超臨界CO₂に5 v/v%濃度の修飾剤（アセトン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノール）を添加し、粉じん抽出を行ったときの回収率をTable 3に示す。5 v/v%メタノールを修飾剤としたときの平均回収率は70%で、最も高い値を得た。このことから、粉じん試料からのPAHs多成分同時抽出では、CO₂に極性を持た

せるために5 v/v%メタノールの添加が有効であることが示唆された。

3・3 SFE法と従来法による抽出効率の比較

3・3・1 添加したPAHsの回収率比較 超音波抽出法とTable 1に示す3段階のSFE条件を用いて、大気粉じん3検体に添加した4 µgのPAHsの平均回収率を比較したところ、超音波抽出法の71.3%に対しSFEは69.5%であり、両者の違いは見られなかった。フェナントレンからコロネンまでの回収率はSFE法で70%以上であったが、分子量の小さいほかのPAHsは低回収率を示した。これは低沸点PAHsでは捕集時の揮散を生じやすく、トラップ温度が-5°Cの設定にあっても連続抽出によるトラップからの損失があると考えられた。しかし、ハイボリュームエアーサンプラーを用いる捕集法は、大気中の低沸点PAHsには適さないことが既に明らかにされており、大気粉じんを採取した濾紙からのPAHs抽出にSFEの抽出特性を適用することは問題がないと判断された。有害大気汚染物質測定マニュアルに採用されているBaPの抽出法はジクロロメタンを用いる超音波抽出である⁴¹⁾。本実験から求めたSFEの抽出条

Fig. 8 Effect of revision with the surrogate method and the internal standard method on the recovery of the executive PAHs

4.0 µg or 0.1 µg of PAHs were spiked in the airborne particulates on a quartz fiber filter. SFE condition: extraction fluid, pure CO₂; extraction temperature, 60°C; density, 0.65 g/ml (pressure, 16.5 MPa); flow rate, 2 ml/min; static/dynamic extraction time, 2/10 min; extract trap temperature, -5°C; trap rinse, 1.6 ml of acetone

件は超音波抽出法に匹敵する抽出効率を示したことから、溶媒抽出に代わる新たな抽出法としてSFEの有用性が明らかになった。

3・3・2 実試料からの抽出における比較 添加回収試験より得られたSFEの最適化条件 (Table 1) を用いて、実試料レベルにおけるSFEの抽出効率を評価した。超音波抽出法とSFE法により実大気粉じん31試料中のPAHs濃度を求め、超音波抽出法に対するSFEの相関係数と回帰式を算出した。ナフタレン、1-ベンゾチオフェン、アセナフテン、ナフタセンを除くPAHsの相関係数は0.79~1.0で両者に直線関係があり、その傾きはフルオレン以上のPAHsで0.64~1.8であった。両抽出法によるBaP濃度の比較結果をFig. 9に示す。超音波抽出法に対してSFE法で求めたBaPの平均濃度は1.2倍、相関係数は1.0を示して、両者に極めて良い一致が認められた。SFEの抽出効率は添加回収試験のみでなく実試料のPAHsの抽出においても超音波抽出法と良い相関を示したことから、大気粉じんのPAHs抽出法として有用であることが明らかになった。

Fig. 9 Relationship between the SFE method and the sonication extraction method on recoveries of benzo[*a*]pyrene from 31 native particulates in air. SFE condition was shown in Table 1.

大気粉じんからのPAHs多成分の同時抽出において、有機溶媒を用いない新たな抽出方法の確立を目的とし、超臨界CO₂を抽出溶媒とするSFE法を標準的に大気粉じんの抽出に適用するため、その方法の構築と有用性を

Table 3 Effect of modifier addition to supercritical CO₂ for the recoveries of 4 µg of PAHs spiked in the airborne particulates

No.	PAHs	molecular weight	Recovery, % of PAHs with SFE ^{a)}				
			Extraction fluid (CO ₂ + 5% modifier)				
			CO ₂	CO ₂ Acetone	CO ₂ Benzene	CO ₂ DCM ^{b)}	CO ₂ Methanol
1	Naphthalene	128	0	0	0	0	0
2	1-Benzothiophene	134	0	0	0	0	0
3	2-Methylnaphthalene	142	0	0.2	0	0	0.1
4	1-Methylnaphthalene	142	0	0.3	0	0	0.1
5	Acenaphthylene	152	3	25	9	20	22
6	Acenaphthene	154	5	28	13	22	25
7	Fluorene	166	37	58	48	56	58
8	Phenanthrene	178	74	77	80	81	84
9	Anthracene	178	72	73	77	79	82
10	Dibenzothiophene	184	69	75	75	78	81
11	Fluoranthene	202	92	90	91	92	96
12	Pyrene	202	93	92	93	93	98
13	2,3-Benzofluorene	216	99	99	94	97	103
14	Benz[<i>a</i>]anthracene	228	89	88	97	89	86
15, 16	Triphenylene/Chrysene ^{c)}	228	90	88	97	87	87
17	Naphthacene	228	69	73	69	68	70
18, 19	Benzo[<i>a</i>]fluoranthene ^{d)}	252	82	83	86	90	92
20	Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	252	79	76	84	91	94
21	Benzo[<i>e</i>]pyrene	252	82	81	88	91	93
22	Benzo[<i>a</i>]pyrene	252	81	83	85	94	94
23	Perylene	252	81	81	84	91	91
24	3-Methylcholanthrene	268	78	87	85	98	92
25	Indeno [1,2,3- <i>cd</i>] pyrene	276	92	91	89	97	100
26	Benzo [ghi] perylene	276	83	78	86	89	93
27, 28	Dibenzanthracenes ^{e)}	278	81	81	82	92	93
29	Coronene	300	75	67	82	69	83
30	3,4 : 8,9-Dibenzopyrene	302	60	62	50	60	62
Average recovery ^{f)} (%)			62	64	65	68	70

a) SFE conditions with combinations of 3 steps are shown in Table 1. b) DCM means dichloromethane. c) Triphenylene and chrysene were measured jointly. d) Benzo[*b*]fluoranthene and benzo[*j*]fluoranthene were measured jointly. e) 1,2 : 5,6-Dibenzanthracene and 1,2 : 3,4-dibenzanthracene were measured jointly. f) Average value was calculated using overall recoveries of PAHs.

明らかにした。

超臨界流体の圧力を増加する方向での抽出温度や流体密度の設定、適切な抽出時間、抽出量の設定、試料量の増加、修飾剤の添加は PAHs の抽出効率を高める傾向にあった。しかし、多成分の PAHs を一つの SFE 条件で同時抽出することは困難であった。そこで、抽出試料として 45 mmφ の汙紙 4 枚分を使用すること、5v/v% 濃度のメタノールを修飾剤として超臨界 CO₂ に添加すること、同一試料に対して 3 段階の SFE 条件を設定した抽出を行えば良いことが分かった。

大気粉じんからの PAHs 添加回収試験及び実試料の抽

出試験から、以下の条件を用いた SFE は従来の超音波抽出法と同等以上の抽出効率を得ることができ、最適条件と考えられた。

ステップ 1; 超臨界流体: CO₂, 抽出温度: 60℃, 流体密度: 0.65 g/ml (圧力: 16.5 MPa), 流量: 2 ml/min, スタティック/ダイナミック抽出時間: 2/10 min, 抽出トラップ温度: -5℃, 溶出トラップ温度: 30℃, トラップの溶出溶媒: アセトン 1.6 ml.

ステップ 2; 超臨界流体: CO₂ + 5% メタノール, 抽出温度: 80℃, 流体密度: 0.65 g/ml (圧力: 22.7 MPa), 流量: 2 ml/min, スタティック/ダイナミック抽出時

間: 2/20 min, 抽出トラップ温度: 80℃.

ステップ 3; 超臨界流体: CO₂, 抽出温度: 80℃, 流体密度: 0.35 g/ml (圧力: 13.2 MPa), 流量: 2 ml/min, スタティック/ダイナミック抽出時間: 2/5 min, 抽出トラップ温度: 80℃, 溶出トラップ温度: 40℃, トラップの溶出溶媒: アセトン 1.6 ml.

最適化条件による 1 試料当たりの抽出時間は 1.5 時間であり, 抽出に要する時間を大幅に短縮できた. 操作の自動化によって大気粉じんに含まれる多成分の PAHs を迅速に同時抽出することができるため, SFE 法は PAHs の多成分同時分析の抽出法として有用であることが示された.

(1996 年 11 月, 1996 機器分析)
(東京討論会において一部発表)

文 献

- 1) H. L. Liber, B. M. Andon, R. A. Hites, W. G. Thilly: *Environ. Int.*, **5**, 281 (1981).
- 2) M. -L Yu, R. A. Hites: *Anal. Chem.*, **53**, 951 (1981).
- 3) T. Colborn, D. Dumanoski, J. P. Myers: "Our Stolen Future", p. 306 (1996), (Dutton, New York).
- 4) A. Soto, C. Sonnenschein, T. Colborn: *Comments Toxicol.*, **5**, 315 (1996).
- 5) 日本公衆衛生協会: "外因性内分泌攪乱化学物質に関する研究班中間報告", (1997).
- 6) 長谷川隆一: *ファルマシア*, **12**, 1333 (1997).
- 7) 井口泰泉: "生殖異常, 環境ホルモンの反逆", p. 51 (1998), (かもがわ出版).
- 8) J. H. Clemons, L. M. Allan, C. H. Marvin, Z. Wu, B. E. Mccarry, D. W. Bryant, T. R. Zacharewski: *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1853 (1998).
- 9) 日本環境化学会: 第 24 回日本環境化学会講演資料集, p. 資料 1 (1998).
- 10) T. Iguchi, H. A. Bern: *Comments Toxicol.*, **5**, 367 (1996).
- 11) N. Nishimura, Y. Fukazawa, H. Uchiyama, T. Iguchi: *J. Exp. Zool.*, **278**, 221 (1997).
- 12) T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, M. Morita: *J. Mar. Biol. Assoc.*, **74**, 651 (1994).
- 13) T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, M. Morita: *Environ. Pollu.*, **95**, 85 (1997).
- 14) 山本貴士, 安原昭夫: 第 7 回環境化学討論会講演要旨集, p. 121 (1998).
- 15) 児玉 泰: 大気汚染学会誌, **26**, 105 (1991).
- 16) 小田淳子, 市川吾省, 森 忠繁: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 825 (1996).
- 17) 嵐谷けい一, 古川一海正博, 李 忠民, 児玉泰: 大気汚染学会誌, **26**, 23 (1991).
- 18) A. H. Miguel, J. B. Andre: *J. Environ. Anal. Chem.*, **35**, 35 (1989).
- 19) 新井 実: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 157 (1994).
- 20) W. Maher, F. Pellegrino, J. Forlonger: *Microchem. J.*, **393**, 160 (1989).
- 21) C. H. Risner, J. M. Conner: *Liq. Chromatogr.*, **14**, 437 (1991).
- 22) H. Takada, T. Onoda, N. Ogura: *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1179 (1990).
- 23) 小田淳子, 安原昭夫, 松永和義, 斎藤 寛: 衛生化学, **44**, 334 (1998).
- 24) J. Oda, I. Maeda, T. Mori, A. Yasuhara, Y. Saito: *Environ. Technol.*, **19**, 961 (1998).
- 25) 環境庁大気保全局大気規制課編: "有害大気汚染物質測定マニュアル", p. 13 (1998).
- 26) J. R. Dean: *Analyst* (London), **121**, 85R (1998).
- 27) H. -B. Lee, T. E. Peart, R. L. H. -You, D. R. Gere: *J. Chromatogr. A*, **653**, 83 (1993).
- 28) Y. Yang, A. Gharaibeh, S. B. Hawthorne, D. J. Miller: *Anal. Chem.*, **67**, 641 (1995).
- 29) Y. Yang, W. Baumann: *Analyst* (London), **120**, 243 (1995).
- 30) M. L. Lee, K. E. Markides: Chromatography Conferences, Inc., ; Provo, UT, p. 99 (1990).
- 31) M. Ellen, P. McNally: *J. AOAC International*, **79**, 380 (1996).
- 32) T. S. Oostdyk, R. L. Grob, J. L. Snyder, M. E. McNally: *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 177 (1993).
- 33) M. E. McNally, J. R. Wheeler: *J. Chromatogr.*, **447**, 53 (1988).
- 34) V. L-Avila, R. Young, N. Teplitsky: *J. AOAC International*, **79**, 142 (1996).
- 35) J. L. Snyder, R. L. Grob, M. E. McNally, T. S. Oostdyk: *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 183 (1993).
- 36) D. J. Callahan, R. Marsill: *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 422 (1993).
- 37) J. Terani: *Am. Lab.*, **2**, 40 HH (1993).
- 38) T. L. Chester, J. D. Pinkston, D. E. Raynie: *Anal. Chem.*, **70**, 301R (1998).
- 39) J. J. Langenfeld, S. B. Hawthorne, D. J. Miller, J. Pawlczyn: *Anal. Chem.*, **66**, 909 (1994).
- 40) 阿尻雅文: 粉体工学会誌, **35**, 371 (1998).
- 41) 川本克也: 環境化学, **6**, 1 (1996).
- 42) C. A. Eckert, B. L. Knutson, P. G. Debenedett: *Nature* (London), **383**, 313 (1996).
- 43) 環境庁保健調査室編: "ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた最新微量物質分析マニュアル", p. 121 (1991), (公害対策技術同友会).

要 旨

ベンゾ[*a*]ピレン (BaP) 等の多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の多くは変異原性と発がん性を有することが良く知られており、最近、内分泌攪乱化学物質として疑われている。大気粉じんからの PAHs の抽出・分離を迅速に行うため、超臨界流体抽出 (SFE) を用いてその適用について検討した。30 種類の PAHs を添加した大気粉じんについて SFE による抽出を行い、PAHs の定量性に及ぼす SFE の装置パラメーターを明らかにした。SFE の抽出効率を従来の超音波抽出法と比較し、実試料分析への適用を検討した。PAHs の抽出効率は抽出温度、流体密度、流体量、抽出時間、溶出溶媒及び試料濃度により影響された。一方、SFE 条件の 3 段階組み合わせや超臨界 CO₂ への 5% メタノール添加による修飾剤の使用は回収率の向上に効果を示した。フェナントレン (M.W. 178) より大きい分子量を持つ PAHs の添加回収率は超音波抽出法の 67.8 ~ 99.5% に対して SFE 法で 70.3 ~ 103% であり、SFE の抽出効率は超音波抽出法と同等以上であることが分かった。両抽出法を用いた大気粉じん 31 試料中の BaP 測定において、SFE は超音波抽出法の平均濃度の 1.2 倍、相関係数は 1.0 で両者に良い一致が認められた。以上の結果から SFE の最適抽出条件を得ることができ、SFE 法は大気粉じん中の PAHs 多成分同時分析に迅速な抽出法として有用であることを明らかにした。