濾紙抽出法による大気浮遊粉じん中の 若干の多環芳香族炭化水素の分析法

A Simplified Analysis of Major Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Airborne Particulates

産業医科大学医療技術短期大学

嵐 谷 奎 一・吉 川 正 博

産業医科大学衛生学教室

児 玉 泰

Keiichi Arashidani and Masahiro Yoshikawa

*Section of Occupational Hygiene, School of Medical Technology,
University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu*

Yasushi Kodama

*Department of Environmental Health, School of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu*

A simplified analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates was investigated by direct extraction from a glass fiber filter using organic solvent, followed by high performance liquid chromatography (HPLC). Airborne particulates were collected on a glass fiber filter (20×25, cm) by a Hi-volume air sampler and a part of the filter (diameter, 16 mm) was attached to a cellulose filter by continuous development with ethyl ether for 20 min. The separated PAHs spot on the filter was cut off and put into a small test tube and then redissolved in 1 ml of acetonitrile.

The PAHs in the extracted acetonitrile solution were analyzed by a reversed phase HPLC equipped with a spectrofluorometer.

Recovery rates of PAHs from airborne particulates with the same fluorescence condition (Ex. 368 nm, Em. 406 nm) using HPLC were 98.7 % for benzo [a] pyrene (BaP), 99.3 % for benzo [k] fluoranthene (BkF) and 96.1 % for benzo [ghi] perylene (BghiP).

Extraction rates of PAHs in an airborne particulate by using organic solvents were different. The extractable order was as follows, ether > dichloromethane > acetone > tetrahydrofuran > acetonitrile > benzene > ethanol. Ether solvent thus is superior to other solvents for extraction and volatility. Furthermore, it was also proved that distribution of BaP, BkF and BghiP in the cellulose filter was nearly uniform. A test sample was recovered by removing organic substances in the airborne particulates by the ether development. Recovery rates of PAHs ranged from 98.8 to 100.7 % for BaP, 97.7-99.5 % for BkF and 99.0-103.0 % for BghiP. When this method was applied to the determination of BaP, BkF and BghiP in airborne particulates, the analytical data were in good agreement with those by a conventional method; ultrasonic extraction-HPLC method. In this method, extraction carried out on a cellulose filter could recover PAHs sufficiently and does not extract micro particles, which effects on the separation column, from glass fiber filter collected airborne particulates. Therefore, in this method several kinds of PAHs in airborne particulates including carcinogenic BaP can be analyzed easily and efficiently.

Key words: Polynuclear aromatic hydrocarbons, Airborne particulates, Paper chromatography, Continuous development, High performance liquid chromatography
多環芳香族炭化水素, 大気浮遊粉じん, 濾紙抽出法無限展開, 高速液体クロマトグラフィー

緒 言

環境中には多数の発癌物質が存在し、その中でも多環芳香族炭化水素 (PAH) は強い発癌性物質群に属し、広く測定されてきている¹⁻⁶⁾。

大気浮遊粉じん中の PAH の測定は捕集粉じん中からの PAH の抽出、抽出液中の PAH の分離および機器分析による定量よりなっている。最近、急速に発達した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる定量法⁷⁻¹²⁾が確立されてきて以来、HPLC での定量精度を向上させるため粉じんからの抽出操作に種々の改良が加えられてきている。例えば、真空昇華¹³⁾、液相分配^{14,15)}、塩基性アルミナ¹⁶⁾などの改良法が示されてきているが、操作の簡易性、迅速性など必ずしも満足のいくものとはいえない。そこで、粉じんからの PAH の抽出法について検討を行なった。すなわち、定量用濾紙に粉じん採取フィルターを接触させ、ジエチルエーテルにより、無限展開を行い、濾紙上に抽出された PAH 等をアセトニトリルで溶出し、HPLC で PAH を分離、定量する方法を確立した。その結果についてここに報告する。

試薬および装置

1. 試薬および抽出紙

標準物質……ベンゾ [a] ピレン (BaP) とベンゾ [ghi] ペリレン (BghiP) は Aldrich chemical 社製、ベンゾ [k] フルオランテン (BkF) は RK chemical 社製をそれぞれ用いた。

抽出紙……定量用濾紙 No 5B (東洋濾紙)。

HPLC 用移動相……アセトニトリル-水 (9 : 1, v/v)、アセトニトリルは液体クロマトグラフ用 (和光純薬社製) と水は蒸留水を用いた。なお、移動相は超音波発生装置内に約 10 分間放置後使用した。

展開剤……ジエチルエーテル (エーテル, 和光純薬社製試薬特級)、その他の溶媒も和光試薬特級を用いた。

HPLC 用カラム……ジャケット付きステンレスカラム (250 mm×4.0 mm, I.D.) に LiChrosorb RP 18, 粒径 5 μm (Merck 社製) をスラリーソルベント法により均一に充填したものを用いた。なお、カラムの温度調整は

循環方式恒温槽 (Haake F3) によって行った。

2. 器具および装置

大気浮遊粉じん捕集……ハイボリュウムエアサンプラー (柴田科学社製) にグラスファイバーフィルター (Type A/E, 20 cm×25 cm, Gelman)、石英フィルター (20 cm×25 cm, Pafillex) を装着したものを用いた。

分離および検出……日立 650-10LC 分光蛍光光度計を装置した日立 638 型高速液体クロマトグラフを用いた。

実 験

1. 抽出

大気浮遊粉じん (採取場所: 北九州市八幡西区医生ヶ丘, 採取日: 昭和 58 年 10 月~59 年 2 月) をハイボリュウムエアサンプラーを用いて、グラスファイバーフィルターおよび石英フィルターに捕集した。抽出操作を Fig. 1 に示す。すなわち、粉じん捕集フィルターを直径 16 mm のベルトポンチで円形に切り抜き、粉じん面を東洋濾紙 No 5B (上底 2 cm, 下底 3 cm, 高さ 7 cm の台形) の下端より約 1.5 cm に中心がくるように接触させた。その上にテフロン板を置きクリップで止めた後、エーテル槽に入れ、20 分間無限展開を行った。エーテル展開と共に、PAH 等は、濾紙の上端に細長く濃縮展開された。その部分を切り取り、共栓付試験管に入れ、アセトニトリル 1 ml で溶出し、これを試料液とした。なお、PAH 量が少ない場合は、切り取った濾紙中の PAH を数 ml のエーテルで抽出後、溶媒を揮発させアセトニトリル 0.5 ml で溶解しこれを試料液とした。

2. HPLC による分離

1 で得られた試料液中の PAH は HPLC で分離定量した。すなわち、充填剤: LiChrosorb RP18 (5 μm, 250 mm×4.0 mm, I.D.), 移動相: アセトニトリル-水 (9 : 1, v/v), 流量: 1.0 ml/min, カラム温度: 30°C, 励起波長: 368 nm, 蛍光測定波長: 406 nm の条件で行った。

3. 同定および定量

HPLC による試料液中の BaP 等の同定は、分析目的のピークの保持時間と、ピーク分取液の励起・蛍光スペクトルを標準 PAH 溶液のそれらと比較することによって行った。PAH の定量は得られたクロマトグラム上の

Fig. 1 Schematic diagram of extraction method.
 A: Toyo paper filter No 5B, B: Low part, sample,
 C: Upper part, teflon plate, D: Clip.

ピークを半値幅法で面積を求めて行った。菅等¹⁷⁾は励起波長370 nm, 蛍光測定波長410 nm の条件で BaP, BkF, BghiP の三成分を同時に定量する方法を報告している。本法による測定条件で三成分が同時に精度よく定量できるか調べた結果, 良好な結果を得た。したがって, 本実験は励起波長368 nm, 蛍光測定波長406 nm にて測定を行った。

結果および考察

1. PAH の同定

Fig. 2 は本法, すなわち浮遊粉じん試料を定量用濾紙に接触させ, エーテルで無限展開後, 濾紙上に分離抽出された PAH 等をアセトニトリルで溶出後, HPLC で分離して得られたクロマトグラムである。実線が粉じんより得られたクロマトグラム, 破線が標準 PAH のそれである。1 試料中の BaP, BkF, BghiP は15分以内で分析できる。破線で示す標準 PAH に対応する実線ピーク液を各々分取して励起・蛍光両スペクトルを測定し, 標準 PAH のそれらと比較した。その結果, BaP, BkF, BghiP の存在を確認した。この同定の例として, Fig. 3 に Fig. 2 のピーク 1, Fig. 4 にピーク 2, Fig. 5 にピーク 3 の場合を示す。ピーク 1 の励起・蛍光両スペクトルと BkF 標準液の両スペクトルはそれぞれ良い一致を示した。また, ピーク 2, ピーク 3 の励起・蛍光両スペクトルはそれぞれ BaP, BghiP のそれらとよい一致を示した。

Fig. 2 Chromatogram of extract from airborne particulate and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Column: LiChrosorb RP 18 (250 mm×4.0 mm, I.D.), Mobile phase: acetonitrile-water (9: 1, v/v), Flow rate: 1.0 ml/min, Temperature: 30°C, —: sample, - - - - -: PAHs (a; benzo[a]pyrene, b; benzo[k]fluoranthene, c; benzo[ghi]perylene).

Fig. 3 Fluorescence and excitation spectra of benzo[k]fluoranthene (BkF) fraction in sample and standard solution. E: excitation, (Ex., Em. 440 nm), F: fluorescence, (Ex. 310 nm, Em.), —: BkF fraction, - - - - -: BkF.

Fig. 4 Fluorescence and excitation spectra of benzo[a]pyrene (BaP) fraction in sample and standard solution. E: excitation, (Ex., Em. 430 nm), F: fluorescence, (Ex. 368 nm, Em.), —: BaP fraction, -----: BaP.

Fig. 5 Fluorescence and excitation spectra of benzo[ghi]perylene (BghiP) fraction in sample and standard solution. E: excitation, (Ex., Em. 420 nm), F: fluorescence, (Ex. 315 nm, Em.), —: BghiP fraction, -----: BghiP.

2. 展開溶媒の選定

エーテル、ベンゼン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、エタノール、アセトンの7種の有機溶媒を展開剤として粉じん中の PAH の抽出率を求めた。抽出は10分間の無限展開方法により行った。その結果を Table 1 に示した。抽出率はエーテル>ジクロロメタン>アセトン>テトラヒドロフラン>アセトニトリル>ベンゼン>エタノールの順であった。また、溶媒の揮発液上に細長く帯状になって濃縮されたものはエーテル、ジクロロメタンであり、抽出物が広くテリングしていたのはベンゼン、テトラヒドロフランであった。抽出率、PAH 等のまとめ、揮発性などのことより展開剤としてエーテルが最も適しているものと判断された。

Table 1 Relationship between extraction rate and developing solvents.

Solvents	A/B×100 (%)			
	Benzo[a]pyrene		Benzo[k]fluoranthene	
	Mean		Mean	
Ether	96.8		98.6	
	97.4	98.8	97.7	97.2
	102.1		95.3	
Dichloromethane	98.6		90.6	
	94.2	95.2	96.1	92.3
	92.8		90.3	
Acetone	89.4		94.4	
	87.9	87.9	91.2	91.6
	86.4		89.2	
Tetrahydrofurane	89.7		92.0	
	83.6	84.9	90.0	92.0
	81.4		94.0	
Acetonitrile	85.5		93.4	
	84.8	83.8	95.6	91.9
	81.1		86.7	
Benzene	70.9		76.8	
	78.4	73.5	73.8	73.3
	71.2		69.2	
Ethanol	53.6		62.5	
	53.7	55.5	63.9	65.1
	59.1		69.0	

A: value obtained by present method, B: value obtained by ultrasonic extraction-HPLC method.

3. 展開時間

エーテルを用いた無限展開による展開時間と BaP,

BkFの抽出率との関係を Table 2 に示した。なお、抽出率は超音波抽出—HPLCの組み合わせにより測定された BaP, BkF の値を100として求めた。展開時間が増すことによって抽出率は良くなり、15分展開でほぼ100%となった。このことより、無限展開時間は20分程度で行えば充分であると判断された。

Table 2 Relationship between developing time by ether and extraction rate of benzo[a]pyrene (BaP) and benzo[k]fluoranthene (BkF).

Developing time (min)	A/B×100 (%)			
	BaP		BkF	
	Mean		Mean	
5	72.6		67.3	
	76.9	76.7	74.6	70.8
	80.6		70.5	
10	102.2		101.8	
	96.8	98.7	89.3	96.1
	97.0		97.3	
15	99.0		101.8	
	99.3	99.9	95.2	97.8
	101.3		96.5	
20	95.3		106.6	
	95.5	97.3	95.2	99.0
	101.2		95.2	
30	97.2		104.4	
	98.1	98.3	95.2	98.5
	99.7		95.9	

A: value obtained present method, B: value obtained by ultrasonic extraction-HPLC method.

4. PAH の回収率

台形に切った濾紙に粉じん試料(直径16 mm)を接触させ、エーテルで無限展開を数回繰り返す、エーテルの最先端に蛍光が無くなったことを確認した。その粉じん試料に BaP, BkF, BghiP を均一に 1 ng, 10 ng, 100 ng をそれぞれ添加し、溶媒を揮発させた後、再び濾紙に接触させ、テフロン板を乗せ、クリップで止めた後、エーテルを用いて20分間無限展開を行い PAH の回収率を求めた結果を Table 3 に示した。なお、粉じん試料は採取日を異にする 3 種を用いた。BaP の回収率は 98.8 ~100.7%, BkF のそれは 97.7~99.5%, BghiP のそれは 99.0~97.7%を得、添加量と良く一致することを認めた。したがって、幅広い濃度範囲で用いられることを示唆している。

Table 3 Recovery of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from airborne particulates by the present method.

Sample	PAHs added (ng)	Recovery of PAHs (%)		
		BaP	BkF	BghiP
A	1.0	97.2	99.0	100.0
B	1.0	101.0	99.9	98.3
C	1.0	103.4	99.5	99.3
	Mean	100.7	99.5	99.2
A	10.0	99.8	99.1	98.4
B	10.0	97.3	102.8	101.3
C	10.0	99.5	96.6	97.2
	Mean	98.9	99.5	99.0
A	100	96.4	96.1	100.0
B	100	99.6	98.5	101.9
C	100	100.5	98.5	97.7
	Mean	98.8	97.7	99.9

BaP; Benzo[a]pyrene, BkF; Benzo[k]fluoranthene, BghiP; Benzo[ghi]perylene.

真空昇華抽出法は特異的に PAH を抽出する能力に優れているが、抽出操作に30分以上、また操作に熟練を要し、再現性にも問題を有している。薄層クロマトグラフィーでは展開に約60分を要し、薄層からの抽出操作の複雑などがある。これらの方法に比べて、本抽出法は簡易で、抽出率もよく、短時間に多数の試料処理ができる。

5. 本法と超音波抽出法との比較

本法の信頼性を確認するため、同一浮遊粉じん試料を、本法と既に確立されている超音波抽出—HPLC 法¹⁶⁾により比較検討した。その結果を Table 5 に示した。なお、試料 1~25までがガラスファイバーフィルター、26~45までが石英フィルターによる測定値である。超音波抽出—HPLC 法で得られた BaP の測定値を100としたとき、本法で得られた BaP の測定値の平均は98.5、変動係数は4.60%となり、両分析法は良好な一致を示すことが分かった。なお、両フィルターでの違いは認められなかった。なお回帰式は $Y=1.020X-0.042$ (Y: 本法による測定値, X: 超音波抽出—HPLC 法による測定値) となり、相関係数は0.998と算出された。BkF, BghiP についても同様な結果を得た。

超音波抽出法は広く用いられているが、通常の遠心分離操作では完全に微細粒子が除去されない。しかし、本法は濾紙上に PAH を抽出するため、この様な難点を取り除くことができることを認めた。

Table 4 Comparison of benzo[a]pyrene (BaP) in airborne particulates in Yahata district by two methods.

Sample number	Concentration of BaP (μg per 1000 m ³ air)		A/B $\times$ 100 (%)	Sample number	Concentration of BaP (μg per 1000 m ³ air)		A/B $\times$ 100 (%)
	(A)	(B)			(A)	(B)	
1	1.46	1.44	101.4	32	3.94	3.82	103.1
2	2.01	2.04	98.5	33	2.28	2.36	96.6
3	1.49	1.43	104.2	34	2.43	2.36	103.0
4	1.38	1.40	98.6	35	1.22	1.27	96.1
5	0.53	0.53	100.0	36	0.61	0.63	96.8
6	0.67	0.72	93.1	37	0.48	0.46	104.3
7	2.14	2.19	97.7	38	1.28	1.33	96.2
8	4.31	4.09	105.4	39	2.74	2.73	100.4
9	3.48	3.49	99.7	40	3.56	5.43	103.8
10	0.20	0.21	95.2	41	3.39	3.30	102.7
11	0.06	0.06	100.0	42	2.93	2.88	101.7
12	0.67	0.72	93.1	43	1.33	1.37	97.1
13	1.89	1.90	99.5	44	0.39	0.40	97.5
14	1.03	1.06	97.2	45	0.99	1.02	97.1
15	1.30	1.28	101.6	46	1.89	1.79	105.6
16	1.47	1.46	100.7	47	1.14	1.14	100.0
17	2.20	2.13	103.3	48	2.26	2.30	98.3
18	2.46	2.46	100.0	49	0.86	0.90	95.6
19	0.52	0.52	100.0	50	1.18	1.21	97.5
20	2.90	2.87	101.0	51	0.96	0.89	107.9
21	3.52	3.56	98.9	52	2.21	2.34	94.4
22	2.38	2.41	98.8	53	3.19	3.84	83.1
23	2.61	2.78	93.9	54	1.44	1.50	96.0
24	1.07	1.12	95.5	55	1.33	1.35	98.5
25	0.92	0.89	103.4	56	0.37	0.40	92.5
26	0.69	0.72	95.8	57	0.49	0.49	100.0
27	1.24	1.30	95.4	58	1.92	2.20	95.0
28	0.47	0.49	95.9	59	0.43	0.41	104.9
29	2.57	2.67	96.3	60	0.87	0.82	106.1
30	1.07	1.26	84.9	61	1.26	1.32	95.4
31	1.61	1.72	93.6				Mean 98.5
							C.V. 4.60
							(%)

C.V.: Coefficient of variation, (A): Paper chromatography; HPLC using fluorescence detection, (B): Ultrasonic extraction and clean-up by alumina; HPLC using fluorescence detection.

結 語

本分析法の特徴は次のように要約できる。

1. 濾紙展開法を用いる本法は、抽出と Clean-up が同時にでき、また、濾紙上に展開された PAH はエーテルで溶出することによって、簡易に濃縮できる。また、簡単な濾紙法のため、多数試料の処理ができる。

2. 超音波抽出法を用いると、HPLC において必ずカラムフィルターの目詰まりを生じてくる。しかし、本抽出法では粒子の混入がまったく無いため、HPLC において長時間にわたって安定した測定ができる。

3. 逆相型カラムを用いる HPLC は薄層クロマトグラフィーに劣らない分離能を有し、かつ蛍光検出器を装置しているため、定量が同時にできる利点を有している。

以上のことより、本分析法は大気浮遊粉じん中の BaP, BkF, BghiP のルーチン分析に有用な手法となるものと考えられる。

本研究の要旨は第55回日本衛生学会総会（1985）で発表した。

文 献

- 1) Waller, R.E.: The benzo(a)pyrene content of town air, *Brit. J. Cancer*, **6**, 8-21 (1952).
- 2) 鈴木 昭：発癌性炭化水素，特に 3 : 4 benzo(a)pyrene による都市の大気汚染に関する研究，*北方産業衛生*, **18**, 49-72 (1958).
- 3) Sawicki, E., Elbert, W.C., Hauser, T.R., Fox, F.T. and Stanley, T.W.: Benzo(a)pyrene content of the air of American communities, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 443-451 (1960).
- 4) 児玉 泰，石西 伸：大気中の Benzo(a)pyrene 分布，*大気汚染研究*, **10**, 732-741 (1976).
- 5) 富田絹子：大阪市の大気中多環炭化水素量，*大気汚染研究*, **10**, 742-744 (1976).
- 6) 児玉 泰，嵐谷奎一，吉川正博，松野康二，福長将仁：北九州市八幡西区における大気汚染状況，*産業医科大学雑誌*, **5**, 449-460 (1983).
- 7) Dong, M., Locke, D.C. and Fenand, E.: High pressure liquid chromatographic method for routine analysis of major parent polycyclic hydrocarbons in suspended particulate matter, *Anal. Chem.*, **48**, 368-372 (1976).
- 8) Fox, M.A. and Stanley, S.W.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by high pressure liquid chromatography coupled with fluorescence techniques, *Anal. Chem.*, **48**, 992-998 (1976).
- 9) Krstulovic, A.M., Rosie, D.M. and Brown, P.R.: Selective monitoring of polynuclear aromatic hydrocarbons by high pressure liquid chromatography with a variable wavelength detector, *Anal. Chem.*, **48**, 1383-1386 (1976).
- 10) Das, B. S. and Thomas, G.H.: Fluorescence detection in high performance liquid chromatographic determination of polynuclear aromatic hydrocarbons, *Anal. Chem.*, **50**, 967-973 (1978).
- 11) Durand, J.P. and Petroff, N.: Determination of benzo(a)pyrene and other polyaromatic hydrocarbons in petroleum oils direct liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **188**, 85-95 (1979).
- 12) Ogan, K. and Katz, E.: Retention characteristics of several polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr.*, **188**, 115-127 (1979).
- 13) 松下秀鶴，小谷野道子：環境空気中のベンゾ (a) ピレンの高速液体クロマトグラフによる簡易分析法，*産業医学*, **22**, 392-393 (1980).
- 14) 松下秀鶴，塩崎卓哉，加藤幸彦，後藤純雄：高速液体クロマトグラフィーによる大気浮遊粉じん中のベンゾ(a)ピレン簡易分析法，*分析化学*, **30**, 362-368 (1981).
- 15) 塩崎卓哉，田辺 潔，松下秀鶴：高速液体クロマトグラフィーによる大気浮遊粉じん中多環芳香族炭化水素多成分分析，*大気汚染学会誌*, **19**, 300-307 (1984).
- 16) Kodama, K., Arashidani, K. and Yoshikawa, M.: A simplified analysis of benzo(a) pyrene in airborne particulates by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **216**, 103-110 (1983).
- 17) 菅 邦子，石黒辰吉，松下秀鶴：高速液体クロマトグラフィーによる大気浮遊粉じん中の多環芳香族炭化水素の迅速分析法，*大気汚染学会誌*, **17**(2), 117-125 (1982).

(受付 1985年11月11日 受理 1986年5月19日)