高速液体クロマトグラフィーによる貝類、底質及び 海水中の多環芳香族炭化水素類の分析

(昭和 59 年 8 月 10 日受理)

辻 功^{*1} 小出 圭子^{*1} 森山 秀樹^{*1}
田 辺 潔^{*2} 松下 秀鶴^{*2}

Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Shellfishes, Seabottom Sediments and Sea Water by High Performance Liquid Chromatography

Isao TSUJI^{*1}, Keiko KOIDE^{*1}, Hideki MORIYAMA^{*1}, Kiyoshi TANABE^{*2}
and Hidetsuru MATSUSHITA^{*2}

(^{*1}Kumamoto Prefectural Institute of Public Health: 4-33, Minamisendanbata-machi, Kumamoto, Japan; ^{*2}Department of Community Environmental Sciences, National Institute of Public Health: 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, Japan)

A simple method for the determination of 10 polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), i.e., anthracene (An), fluoranthene (Flu), pyrene (Py), benzo(a)anthracene (B(a)A), benzo(e)pyrene (B(e)P), perylene (Per), benzo(k)fluoranthene (B(k)F), benzo(a)pyrene (B(a)P), dibenz(a,h)anthracene (diB(a,h)A) and benzo(ghi)perylene (B(ghi)Per), in shellfish by high performance liquid chromatography (HPLC) has been developed. The method consists of alkali cleavage of the sample, extraction with *n*-hexane, clean-up by SEP-PAK Silica Cartridge column chromatography and determination by HPLC.

Recoveries of 10 PAHs added to 20 g of short-necked clams at levels of 100-400 ng ranged from 92.3 to 99.6%. The present method was applied for the determination of PAHs in shellfishes, seabottom sediments and sea water, and correlations between concentrations of PAHs in the samples were investigated. Close correlations were found between concentrations of PAHs in the sample groups except for sea water.

(Received August, 10, 1984)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 貝類 shellfish; 多環芳香族炭化水素 polynuclear aromatic hydrocarbon

はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、廃棄物、工場排水、大気粉じんの降下などに伴って海に流入する。このため、海水、底質が PAH で汚染され、ひいては魚介類を

はじめとする海産食品の汚染が懸念されているが、その実態は明らかではない。そこで貝類中の PAH の簡易分析法として、アルカリ分解→*n*-ヘキサン抽出→SEP-PAK シリカカートリッジクリーンアップ→高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による多成分分析という手順で分析する方法を開発し、得られた分析法を用いて

^{*1} 熊本県衛生公害研究所: 熊本市南千反畑町 4-33

^{*2} 国立公衆衛生院: 東京都港 4-6-1

貝中のアントラセン (An), フルオランテン (Flu), ビレン (Py), ベンゾ (a) アントラセン (B(a)A), ベンゾ (e) ビレン (B(e)P), ペリレン (Per), ベンゾ (k) フルオランテン (B(k)F), ベンゾ (a) ビレン (B(a)P), ジベンゾ (a,h) アントラセン (diB(a,h)A), ベンゾ (ghi) ペリレン (B(ghi)Per) の分析を行った。同時に、貝の棲息水域の底質、海水についても分析を行い、貝、底質、海水の間での PAH 濃度の相関性などを検討した。

実験方法

1. 試薬

PAH 標準試薬: An, Py, B(a)P は和光純薬工業(株)製, Flu, B(a)A, diB(a,h)A は東京化成工業(株)製, B(k)F は R. K. Chemical 社製, その他の PAH は Aldrich Chemical 社製を使用した。これらの試薬を目的にあわせてそれぞれベンゼン, *n*-ヘキサン, アセトニトリルに溶解して標準溶液を調製した。

アセトニトリル, エタノール: HPLC 用 (和光純薬工業(株)製)

n-ヘキサン, ベンゼン, エチルエーテル, 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬試験用 (和光純薬工業(株)製)

硫酸: 精密分析用 (和光純薬工業(株)製)

水酸化カリウム: 特級 (和光純薬工業(株)製)

水: イオン交換蒸留水

シリカゲルカラム: SEP-PAK シリカ カートリッジ (Waters Associates 社製)

2. 器具及び装置

HPLC: 日立 635 型 (検出器は日立 204-S 型蛍光分光光度計)

超音波発生装置: 超音波洗浄器 (28 KHz, 600 W: シャープ社製)

ホモジナイザー: ポリトロン (キネマチカ社製)

濃縮器: ロータリーエバポレーター (柴田科学(株)製)

3. HPLC の条件

カラムは LiChrosorb RP-18 (5 μ m) を均一に充てんした内径 4 mm, 長さ 50 mm のガードカラム及び内径 4 mm, 長さ 250 mm の分離カラムを用いた。移動相はアセトニトリル-水 (3:1) を用い, 試料注入量 50 μ l, 流速 1.4 ml/min, カラム温度 45° で溶出を行った。検出器は励起光及び蛍光のスリット幅を 10 nm に設定し, Fig. 1 に示した波長プログラムにより操作した。

4. 試料の採取

昭和58年 8~9 月の期間に、熊本県内の 5 地点において、アサリ及びアサリの棲息する周辺の底質と海水を採取した。また 1 地点についてはハマグリ、赤貝、イガイを同時に採取した。

5. 試料の調製

貝類は可食部をポリトロンでホモジナイズしたものを試料とした。底質は実験室で風乾後 30 メッシュのふるい

Fig. 1. Wavelength program and retention time of 10 PAHs

にかけて粗大粒子を除き、試料とした。海水はロ紙 (東洋濾紙 No. 7) で浮遊物質をろ過し、そのろ液を試料とした。

6. 抽出及びクリーンアップ

貝類、底質及び海水の分析法を Scheme 1 に示す。

貝類: 試料 20 g に 2 N 水酸化カリウム-エタノール溶液 100 ml を加えて 2 時間加熱還流し, アルカリ分解した。分解液に少量の分解残留物が残ることがあるので, これをろ過 (東洋濾紙 No. 7) し除去した。またフラスコ及びロ紙を *n*-ヘキサン-エタノール混液 (1:1) 10 ml で 2 回洗浄し, 洗液をろ液と合わせた。この溶液に水 100 ml, *n*-ヘキサン 100 ml を加えて液-液分配を行い, PAH 類を *n*-ヘキサン層に抽出した。この *n*-ヘキサン抽出をさらに 2 回行い, *n*-ヘキサン抽出液を一つに合わせ, 10% 硫酸 50 ml で 1 回, 水 100 ml で 2 回洗浄した後, 無水硫酸ナトリウム 30 g で脱水した。これをロータリーエバポレーターで約 4 ml に減圧濃縮し, 濃縮液を SEP-PAK シリカカートリッジ上に移し, *n*-ヘキサン-ベンゼン混液 (9:1) 混合溶媒 10 ml で溶出を行った。溶出液を減圧濃縮し, さらに窒素気流下で乾固した後, 残留物をアセトニトリル 2 ml に溶解して HPLC の検液とした。

底質: 試料 4 g にエタノール 4 ml を加えて試料を十分湿らせ, 次いでベンゼン 16 ml を加え, 15 分間超音波抽出^{1),2)}を行った。抽出液を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上澄液 10 ml を分取して減圧濃縮し, さらに窒素気流下で乾固した後, 残留物を *n*-ヘキサン 4 ml に溶解した。この *n*-ヘキサン溶液を SEP-PAK シリカカートリッジ上に移し, 以下, 貝類の場合と同様の手順で HPLC 検液を調製した。

海水: 試料 1 L を *n*-ヘキサン 100 ml で 3 回抽出し

Shellfish (20 g)	Seabottom sediment (4 g)	Sea water (1,000 ml)
add 2 N KOH-EtOH (100 ml) reflux (2 hr) filtration	add EtOH (4 ml) and benzene (16 ml) extract by ultrasonics (15 min) centrifuge (3,000 rpm × 10 min)	extract with <i>n</i> -hexane (100 ml × 3)
Filtrate	Supernatant (10 ml)	<i>n</i> -hexane layer wash with 10% H ₂ SO ₄ (50 ml × 1) wash with H ₂ O (100 ml × 2) dehydrate with anhydrous Na ₂ SO ₄ evaporate to 2~4 ml
add H ₂ O (100 ml) extract with <i>n</i> -hexane (100 ml × 3)	evaporate and dry-up in N ₂ stream dissolve to <i>n</i> -hexane (2~4 ml)	
<i>n</i> -Hexane layer		
wash with 10% H ₂ SO ₄ (50 ml × 1) wash with H ₂ O (100 ml × 2) dehydrate with anhydrous Na ₂ SO ₄ evaporate to 2~4 ml		
SEP-PAK Silica Cartridge ←		
elute with <i>n</i> -hexane-benzene (9:1) (10 ml) evaporate and dry-up with N ₂ stream dissolve to CH ₃ CN (2 ml)		

HPLC

Scheme 1. Procedures for the analyses of PAHs in shellfish, seabottom sediment and sea water

た。抽出液を 10% 硫酸 50 ml で 1 回、水 100 ml で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウム 30 g で脱水し減圧濃縮した。この濃縮液を SEP-PAK シリカカートリッジ上に移し、以下、貝類の場合と同様の手順で HPLC 検液を調製した。

7. 同定及び定量

3. HPLC の条件で述べた方法により操作し、同定及び定量を行った。同定は分析目的ピークの保持時間及び分析目的ピークの励起、蛍光スペクトルを HPLC のフローを止めて測定し、これと標準物質のスペクトルとを比較することにより行った。定量はピーク高さを測定し、検量線から算出した。

結果及び考察

1. PAH の測定波長

PAH を感度よく検出するには各 PAH に最適な測定波長を用いなければならないが、各 PAH ごとに測定波長を切り換えることは煩雑であり、また保持時間の近接した PAH では波長切り換えは困難である。そこで数種の PAH を同一波長で測定することにより波長切り換えを少なくし能率的に 10 種の PAH を検出することを試み、個々の PAH の励起及び蛍光スペクトルや文献値^{9)~12)}等を参考にして、多くの測定波長での各 PAH の感度の変化を検討した結果、5 つの測定波長グループ (An, Py, B(a)A, B(e)P: $\lambda_{ex} = 334 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$; diB(a,h)A: 300, 393; Flu: 345, 445; B(k)F, B(a)P, B(ghi)Per: 382, 407; Per: 440, 475) で測定することとした。また B(e)P, Per, B(k)F は今回用いた

HPLC の分離条件では保持時間がそれぞれ 13, 13.1, 13.2 分となり分離しないが、本測定波長では相互に影響を受けることなく選択的に検出することが可能であった。すなわち、一つの検出器を使用するときは、試料を 3 回注入することによりこれら 3 種の PAH を測定することができる。以上のことから検出器の波長プログラムを Fig. 1 に示すように設定した。本測定条件での各 PAH の検出下限 (S/N=3) は B(a)P が 0.02 ng と最も良くついで B(k)F が 0.03 ng, Py, diB(a,h)A が 0.04 ng, Per が 0.05 ng, An, Flu, B(a)A, B(ghi)Per が 0.1 ng, B(e)P が 0.2 ng といずれも良好であった。

2. 試料のクリーンアップ

2.1 液-液分配

貝類の *n*-ヘキサン抽出液は、まず 10% 硫酸 50 ml で 1 回洗浄し、塩基性物質を除いた。海水試料は、*n*-ヘキサン抽出液を直接水洗するとエマルジョンが生じることがあったが 10% 硫酸で洗浄することによりこれを防止することができた。

2.2 SEP-PAK シリカカートリッジを用いたクリーンアップ

液-液分配クリーンアップだけを行った貝類試料にあつては、An, Py, Flu 測定時にベースラインの上昇や複雑ピークがみられ、特に Flu のピークと妨害ピークが重なり定量できなかった。そこで操作が簡単であり溶離液も少なくすむ SEP-PAK シリカカートリッジによるクリーンアップを検討した。3~6 環系 PAH として

Table 1. Recovery of PAHs Added to Short-necked Clam by the Present Method*

Compound	Amount added (ng)	Found (ng)		Recovery (%)	C.V. (%)
		Blank** (n=2)	Added (n=4)		
An	200	7.1	194	93.6	1.0
Flu	400	59	439	99.6	1.7
Py	100	41	133	92.3	7.6
B(a)A	200	7.4	199	95.8	1.5
B(e)P	400	n.d.	382	95.5	2.2
Per	200	5.3	194	94.1	3.6
B(k)F	100	0.35	97.2	96.8	3.6
B(a)P	100	5.7	101	95.7	6.0
diB(a, h)A	100	n.d.	93.3	93.3	2.1
B(ghi)Per	400	4.7	384	94.8	4.1

n.d., not detected

* see scheme 1

** sample without addition of PAHs

Table 2. Concentrations of PAHs in Shellfishes, Seabottom Sediments and Sea waters

Sample	Sampling point*	Concentration (ppb)							
		An	Flu	Py	B(a)A	Per	B(k)F	B(a)P	B(ghi)Per
Short-necked clam	A	0.24	2.4	2.1	0.76	1.1	0.27	0.38	0.42
	B	0.23	2.5	2.7	0.56	1.1	0.26	0.30	0.41
	C	0.48	4.0	2.7	0.76	0.21	0.27	0.38	0.42
	D	0.64	6.4	7.2	2.2	0.44	0.92	1.5	0.95
	E	<0.10	1.6	1.3	0.23	0.10	0.12	0.17	0.23
Clam	A'	0.14	1.4	1.6	0.16	1.4	0.24	0.41	0.52
Blood	A'	0.27	1.5	1.7	0.32	1.2	0.31	0.48	0.83
Mussel	A'	0.41	1.8	1.8	0.16	1.8	0.27	0.37	0.48
Seabottom sediment	A	1.2	4.7	5.3	2.9	3.7	2.7	4.4	3.8
	B	2.0	17	19	6.7	13	4.9	11	7.6
	C	<1.0	4.7	4.7	<2.0	0.50	0.58	1.1	<3.0
	D	4.0	45	52	18	8.5	14	27	19
	E	<1.0	9.3	12	3.8	1.5	2.7	5.0	3.8
	A'	<1.0	3.7	4.7	<2.0	2.4	0.89	1.9	<3.0
Sea water	A	<0.004	0.11	0.07	<0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.006
	B	<0.004	0.03	0.02	<0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.006
	C	<0.004	0.03	0.02	<0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.006
	D	<0.004	0.03	0.02	<0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.006
	E	<0.004	0.02	0.01	<0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.006

*A: the mouth of Shira river; Oshima-machi, Kumamoto

B: the mouth of Tsuboi river; Matsuo-machi, Kumamoto

C: Yanai, Oyano-machi, Amakusa-gun

D: Kodomari, Oyano-machi, Amakusa-gun

E: Ryugatake-machi, Amakusa-gun

A': 100 m offshore from point A

Table 3. Coefficients of Correlations among PAHs Concentrations in Shellfishes and in Seabottom Sediments

		Shellfish (n=8)							
		An	Flu	Py	B(a)A	Per	B(k)F	B(a)P	B(ghi)Per
Seabottom sediment (n=6)	An		0.826**	0.777	0.742	−0.717	0.784	0.751	0.638
	Flu	0.962**		0.949*	0.959*	−0.501	0.874*	0.851**	0.522
	Py	0.954**	0.999*		0.974*	−0.337	0.969*	0.950*	0.669
	B(a)A	0.971**	0.992*	0.992*		−0.431	0.932*	0.915*	0.615
	Per	0.708	0.595	0.580	0.615		−0.188	−0.197	0.115
	B(k)F	0.976*	0.990*	0.990*	0.998*	0.595		0.995*	0.812
	B(a)P	0.981*	0.993*	0.992*	0.998*	0.647	0.997*		0.825**
	B(ghi)Per	0.980*	0.986*	0.985*	0.999*	0.641	0.997*	0.997*	

* level of significance: 1%

** level of significance: 2%

An, B(a)A, B(a)P, B(ghi)Per の4種 (An, B(a)A, B(a)P, B(ghi)Per が 50, 50, 25, 100 ppb の混合 *n*-ヘキサン溶液) を選び、溶離液として、*n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン-ベンゼン (9:1 及び 1:1)、*n*-ヘキサン-エチルエーテル (9:1) の4種を用いて溶出挙動の検討を行った結果、試料の液量にかかわらず、それぞれ 20, 10, 5, 5 ml の溶離液で大部分の PAH の溶出が完了した。次にこの溶出条件における 10 種の PAH (Py, diB(a,h)A, B(k)F, B(a)P: 25 ppb; An, B(a)A, Per: 50 ppb; Flu, B(e)P, B(ghi)Per: 100 ppb の混合 *n*-ヘキサン溶液) の回収率を検討した。*n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン-ベンゼン (9:1)、*n*-ヘキサン-ベンゼン (1:1)、*n*-ヘキサン-エチルエーテル (9:1) 溶離液での回収率はそれぞれ 81~104, 92~105, 95~104, 88~104% であった。また貝類試料のアルカリ分解 *n*-ヘキサン抽出液は着色しているが、*n*-ヘキサンを溶離液とした場合、この着色物質は除去された。しかし、溶離液に、ベンゼン、エチルエーテルなどが加わると着色物質は完全には除去されないが、それでも *n*-ヘキサン-ベンゼン (9:1) 溶離液では大部分の着色物質は除去され、*n*-ヘキサン溶離液と比較して回収率、溶離液量で有利であり、また HPLC による PAH 分析において、SEP-PAK シリカカートリッジを使用しないときにみられた An, Py, Flu 測定時のベースラインの上昇、夾雑ピーク、Flu 測定時の妨害ピークなどもみられず、十分なクリーンアップ効果があった。そこで、溶出は *n*-ヘキサン-ベンゼン (9:1) 溶離液 10 ml で行うことにした。なお、底質及び海水試料についても本クリーンアップ操作を行うことによりきれいなクロマトグラムが得られた。

3. 添加回収試験

アサリ、底質、海水に 10 種の PAH (Py, B(k)F, B(a)P, diB(a,h)A: 100 ppb; An, B(a)A, Per: 200 ppb; Flu, B(e)P, B(ghi)Per: 400 ppb の混合アセット

ニトリル溶液をアサリには 1 ml、底質及び海水には 0.5 ml) を添加し、Scheme 1 に従って分析を行い、添加回収率を求めた。また魚についても本分析法が適用可能であることを確認するため、アジを用いてアサリと同様に添加回収試験を行った。アサリに関する結果を Table 1 に示す。Table 1 に示したとおり、回収率 (92.3~99.6%) 再現性 (変動係数 1.0~7.6%) とも満足すべき値が得られた。また底質、海水、アジに関しても、それぞれ 74.8~99.9%, 94.8~98.6%, 94.8~99.8% と良好な回収率が得られた。

4. 貝類、底質、海水の PAH 含有量

本分析法を用いて、熊本県沿岸で採取した貝類及びその貝類が棲息する周辺の底質、海水試料を分析した。その結果を Table 2 に示す。なお、B(e)P, diB(a,h)A については、貝類、底質、海水のすべての試料とも検出下限 (貝類、底質、海水で B(e)P がそれぞれ 0.4, 4.0, 0.01 ppb, diB(a,h)A が 0.07, 0.7, 0.001 ppb) 以下であった。試料の採取地点付近には特定の PAH 汚染源はないので、本分析値は熊本県の一般海域における PAH のバックグランド値に近いと推察する。

5. 貝類及び底質中の PAH 濃度間の相関性

4. で得られた分析値 (Table 2) を用いて PAH 濃度間の相関について検討した。貝類及び底質のそれぞれの PAH 濃度間の相関係数を Table 3 に示す。この結果から、貝については Py, B(a)A, B(k)F, B(a)P の濃度間の相関係数が、0.874~0.995 (n=8)、底質については Flu, Py, B(a)A, B(k)F, B(a)P, B(ghi)Per の濃度間の相関係数が 0.976~0.999 (n=6) であり、危険率 1% で相関が認められた。また海水については、検出された PAH が Flu と Py だけでありその濃度も低いいため、相関については検討するにいたらなかったが、Py 濃度が高いと Flu 濃度も高い傾向が認められた。近年 B(a)P は PAH による環境汚染の 1 指標として分

析されることが多いが、Table 3 にみられるように、貝類、底質試料いずれにおいても B(a)P 濃度と他の PAH 濃度との間の高い相関は B(a)P の指標物質としての妥当性を支持するものであると考える。なお、試料数が少ないため、貝と底質中の PAH 濃度間の相関関係は明らかにすることができなかった。このことに関しては今後さらに検討する予定である。

ま と め

貝類中の PAH の分析法として、試料のアルカリ分解→*n*-ヘキサン抽出→SEP-PAK シリカカートリッジクリーンアップ→HPLC による多成分分析という簡易分析法を作成した。本法は簡便、迅速であり、回収率、再現性などの点でも優れており、底質、海水試料の分析にも適用可能であった。この分析法を用いて試料中の PAH を分析し、PAH 濃度間の相関を検討したところ、同種の試料中の各 PAH 濃度間には相関関係が認められ、特に底質では高い相関が認められた。

なお、本研究の費用の一部は文部省環境科学特別研究補助金及び厚生省がん研究助成金によってまかなわれ

た。関係各位に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 松下秀鶴, 塩崎卓哉, 加藤幸彦, 後藤純雄: 分析化学, **30**, 362~368 (1981).
- 2) 吉川サナエ, 佐野 仁, 頭本藤雄, 森田昌敏: 水質汚濁研究, **5**, 49~53 (1982).
- 3) Hanus, J. P., Guerrero, H., Biehl, E. R., Kenner, C. T.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **62**, 29~35 (1979).
- 4) Obana, H., Hori, S., Kashimoto, T.: Bull. Environm. Contam. Toxicol., **26**, 613~620 (1981).
- 5) Das, B. S., Thomas, G. H.: Anal. Chem., **50**, 967~973 (1978).
- 6) Ogan, K., Katz, E., Slavin, W.: Anal. Chem., **51**, 1315~1320 (1979).
- 7) 原 昭二, 辻 章夫編: “最新液体クロマトグラフィ” p. 275~285 (1978) 南山堂.