

IX. HPLC を用いた大気浮遊粉じん中多環芳香族炭化水素測定手法

■1995.1～1995.3, タイ王国, タイ王国研究研修センタープロジェクト, 短期派遣

雨谷敬史

1. 技術概要

本技術は、大気中の浮遊粉じん (airborne particulates) をエアサンプラー (air sampler) を用いてグラスファイバーフィルター (glass fiber filter) 上に採取し、その中の多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs) を溶媒抽出し、高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いて分離分析するものである。

1.1 ハイボリュームエアサンプラーを用いた大気浮遊粉じんの捕集

ハイボリュームエアサンプラー (high-volume air sampler) は一分間に約 1m³ の空気を吸引しうるサンプラーである。このサンプラーに、あらかじめ 24 時間相対湿度 50% のデシケーターで恒湿化して重量を測定したグラスファイバーフィルターを装着し、一定時間大気中の浮遊粉じんを捕集した。あまり長い時間捕集しつづけると粉じん上の PAH は揮散するので注意が必要である。捕集後は直ちにアルミホイルで包み、ビニール袋に入れ、氷を入れたクーラーボックス (発泡スチロールの箱が良い) に入れて輸送し、-80 度のディープフリーザー中に保存した。

1.2 アンダーセンサンプラー (air sampler, Andersen type) を用いた大気浮遊粉じんの捕集

ここではローボリュームアンダーセンサンプラー (low-volume air sampler, Andersen type) を用いた。これは、1 分間に 28.3L の流速で空気を吸引し、大気浮遊粉じんを粒径別に捕集するサンプラーである。1-1 と同様にフィルターを装着し、一定時間空気を吸引する。捕集後のフィルターに関しては 1-1 に準じる。

1.3 PAH の抽出と HPLC による分離分析

PAH はジクロロメタンを抽出溶媒として超音波抽出 (ultrasonic extraction) した。得られた抽出液はアセトニトリルに溶媒転換し、HPLC で分離分析した。検出器は分光蛍光検

出器 (spectrofluorometer)を用いた。タイ王国 ERTC の分光蛍光検出器は波長固定式なので、感度良く分析しうる PAH は以下の 8 種類であった。ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(e)ピレン、ジベンゾ(a,c)アントラセン、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(ghi)ペリレン、3-メチルコラントレン。

2. 導入目的

タイ王国は、近年産業の急速な工業化と経済発展に従って自動車の数も急増し、これらに伴う大気汚染は深刻化している。大気汚染のモニタリングに関してはすでに浮遊粒子状物質濃度、一酸化炭素および鉛濃度について行われているが、化学物質の健康影響を考えた場合、より多くの大気汚染物質についての知見が必要である。そこで大気中の主要な発ガン物質群であり、不完全燃焼により発生するため自動車をはじめとして数多い発生源が知られており、環境中に広く存在する PAH に焦点を当ててその濃度のモニタリングを行ない、測定値をもとに健康対策へとつなげていくことを目的とする。また、この技術移転の後、水中あるいは底質 (sediment) 中の PAH 濃度の測定を行ない、PAH の循環や蓄積などについても調べていく予定である。

この第一歩として、PAH の分析に関して最も高感度な方法である HPLC-分光蛍光検出法の技術移転を行ない、あわせて再現性 (repeatability and reproducibility)、添加回収率 (recovery)、標準物質を用いた正確度検定 (accuracy test using standard reference materials) などの分析の信頼性の検討を行なった。さらに、バンコク市内でハイボリュームエアサンプラーおよびローボリュームアンダーセンサンプラーを用いて大気浮遊粉じんの捕集を行ない、その中の PAH の定量を行なった。

3. 導入方法

まず、日本にいる間に現地の専門家と連絡を取り、現地にある試薬や器具の確認、装置やそのオプションについての詳細、使用状況などを聞いた。これをもとに携行機材のリストを作成し、再度現地の専門家にチェックしてもらった。今回は機材等が大幅に不足しており、予算の関係上新規購入は難しいとのことだったので、この時点で当初の計画を練り直し、受入先 (この場合 ERTC) と再度協議した。さらに、派遣前にこの分野の専門の先生にお話をお伺いし、計画を立てる場合の参考とした。この事前計画は、もし現地にある機材がまったく使えなかった場合でもある程度の仕事ができるように作成することが望ましい。また、溶媒や試薬なども純度の高いものが手に入らない場合を考える必要がある。

この中でも蒸留水は純度の高いものを手に入れるのが難しい上、HPLC 分離分析においてトラブルの原因となりやすいので日本から持っていくことにした。

現地では、まず実験計画を立て、この計画に関してカウンターパートと十分に議論するところから始めた。このためには、あらかじめ英文の実験計画書を作成しておく必要がある。次に、カウンターパートと必要な試薬類や器具・装置の確認を行なった。この時、他に支障がなければ、できるだけ試薬・器具・装置類は手元に集めておいたほうがスムーズに実験が進められると思われる。これらと平行して装置の組み立て、配線、配管等を行なう。装置類は必ずしも使える状態ではない上に、その他の壊れてしまった器具、装置類の修理を必ず頼まれるので、装置のメンテナンスに関してある程度しらべておくか、マニュアル等を用意しておくとうい。今回は、HPLC の組み立て以外にも、容量の狂ってしまったマイクロピペットの修理とその検定などを頼まれた。しかし、信頼関係を築くには良い機会と思われる。通常はここまでで一週間以上かかる。とくに修理品が多い場合はより長い期間かかるので、実験計画はかなり余裕を見て立案するべきである。

今回の目標の一つである HPLC を用いた PAH の分離分析法に関しては、EPA 法とか JIS 法にとらわれずに、科学的に正確で精度の良い手法とするために、以下のような検討を行なった。すなわち、標準試料を用いた HPLC 分離分析の再現性 (repeatability) や実試料を用いた分析の再現性 (reproducibility) や添加回収率、米国 NBS 製の標準物質を用いた正確度の検定を行ない信頼性の高い手法とするとともに、これらの分析の信頼性を自分達の手で常時確認・点検しうるようにした。この考え方はそのまま品質保証、品質管理 (Quality Assurance & Quality Control: QAQC) にもつながって行くため、とくに長い時間かけて議論した。このため質問が夜半までつづくことがあり、週に 2 回ぐらいのペースで ERTC の研修生用ドミトリに宿泊することとなった。

検量線の作成等はコンピューターを用いたため、コンピューターの使用法に関する教育も行なった。なお、ERTC ではマッキントッシュとウインドウズの両方が使われているため、どちらでも使える Excel などのソフトウェアを用いるとういと思われる。また、このような研究所においては、今後ますますパーソナルコンピュータの重要性は増してくると考えられるので、ハードウェアの導入・更新とそれに関わる技術移転にも力を入れることが望まれる。特に、近年のパソコンの進歩は激しいため、ほんの数年のうちに例えば MS-DOS から Windows 3.1, Windows 95, Windows98 とどんどん移り変わっており、すぐに“時代遅れの技術”となってしまうことが予想されるので、気をつける必要がある。

大気浮遊粉塵の捕集に関しては、研究所で捕集法の説明をした後、バンコク市内で実際

に捕集を行なった。ERTC はバンコク市内に測定局 (monitoring station) を持っていないため、他の部局と掛け合ってサンプリング場所の確保や電源の供給などをお願いした。このため、計画を立ててから実際にサンプリングできるまで急いでも 1 ヶ月以上かかる。滞在日数が少ない場合や派遣されてすぐサンプリングが必要となる場合は、このことを計算に入れることが望まれる。また、PCD (Pollution Control Department) の測定局を使用したい場合はさらに時間がかかるため、2-3 ヶ月前に交渉しておくことが必要となるようである。

派遣期間の終了前には、報告書あるいは論文の書き方について説明を行なった。実はこの項目に関しては時間をかけてじっくり対応したかったが、派遣期間が 2 ヶ月と短かい上にするべきことが多く、あまり時間をかけられなかった。しかし、今後の ERTC の活動を考えた場合、重要な項目であることは論を待たない。

4. 成果、問題と課題

ERTC のカウンターパートはみな大学卒業程度の知識を持ち、英語に関しても十分な実力を持っているので、技術移転そのものに関してはほとんど何の問題もなく行われた。また、技術移転終了後、ERTC では数多くのサンプルが本法を用いて分析されており、十分な効果が上がったものと推察される。問題点や技術移転全般に関する課題は、以下の通りである。

- (1) まず、ERTC 所長には、技術移転の内容や成果をはじめ自分のスケジュールにいたるまで、直接所長に話さない限りまったく伝わらないので、その点注意が必要である。しかし、カウンターパート側は、自分の頭越しに所長と直接接触することをあまり快く思わないようなので更に細心の注意が必要である。また、仕事の実績を上げるだけでは評価されないので、仕事の成果はたえず所長や課長、カウンターパートに披露する (presentation) ことが必要と思われる。特にこの点は、自分も含めて多くの日本人にとって不得意な点なので第一に挙げる。
- (2) “技術移転” に関しては、単に“技術”を移転するのではなく、研究全般に関するバックアップが必要と考えられる。特に研究計画の立案および研究の取りまとめ方法にまで責任を持ち、そのための時間を十分に取っておくことが望まれる。さらに、例えば分析技術に関して言えば、可能な限り、EPA 法や JIS 法などの既存の方法を盲信することなく、その地域の特色にあった信頼性の高い分析法を移転すること、その信頼性を自分達で検討することができるようにすることが重要と思われる。今回の技術移転に際しても、

タイ王国では気温が高いため、サンプルから PAH が捕集あるいは捕集後に揮散してしまうのではないかとこの恐れがあり、今後の検討課題として残ってしまった。

- (3) 機材に関しては、数年前に納入されたものであり、特にインターフェースの部分（データ処理装置等）では、どうしても“旧式の技術”を教えることとなってしまった。今回はこのデータ処理装置の使用法を知っていたので対応できたが、ERTC のスタッフが日本などに来たときに、新しいインターフェース（楽な方法）を見てしまうと誤解を招く元になるので、十分説明しておく方が良いと思われる。
- (4) HPLC を長く使用しているとそのうち圧力がかなり高くなっていく。これは主にプレカラムのプレフィルターに赤い砂のようなものが詰まることに起因する。この洗浄法は何度も紙に書いて教えたが、すぐに忘れてしまうようである。このようなことはテクニシャンに教えるべきことなのかもしれない。
- (5) ERTC から、科学雑誌 (scientific journal) に投稿する論文が出てくるような協力を今後考えていかなければならないであろう。しかし、その場合、こちらで全部書いてしまったのでは、ERTC 側には喜ばれるが、肝心の ERTC スタッフを育てることにならず、ERTC 側に全部書かせようとする時間がかりすぎて実用的ではなく、歓迎されない恐れさえ出てくる。その辺に注意して論文作成の態勢に入っていくのが今後の課題である。このほか、プロジェクトとして、機材の老朽化や修理態勢、ディープフリーザーなど基本的な設備の不足、パソコンの不足、ネットワークへの参加の促進などハード面でのいろいろな問題点、目標設定に関する見解の不統一などソフト面での問題点をいろいろ考えさせられることも多かった。

5. 日本の技術とその他の国の技術との相違

米国 EPA の Method To-13 では、大気浮遊粉じんからの PAH の抽出にソックスレー抽出を用いており、この抽出液を K-D 濃縮装置で濃縮し、固層抽出によってクリーンアップしてから HPLC による分離分析を行なっている。しかし、この方法は時間がかかる上に非常に手間もかかり、汚染や損失を起こしやすい手法である。今回技術移転したのはこれらの欠点を克服した簡便な方法で、抽出効率や再現性にも優れており、そういった意味でタイ側には受け入れやすかったと思われる。

また、大気浮遊粉塵中 PAH の測定には GC/MS なども用いられ、化合物の定性の確実性を考えると GC/MS を用いた手法が優れている。しかし感度が低いため、ローボリュームアンダーセンエアサンプラーや個人サンプラーを用いて捕集した大気浮遊粉じん中の PAH の測

定という目的を考えると、HPLC法に及ばないと考えられる。また、ERTCの活動計画にあげられている、濃度の低い、水中や底質中のPAHの測定に応用することを考えても、HPLC法が優れていると考えられる。

6. 当該技術に関する関係情報源情報一覧

1) H. Matsushita, Y. Takahashi, S. Azuma, H. Hiroi and T. Amagai: Development of highly sensitive automatic analysis for polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates and its application to the survey of indoor pollution. Indoor Air Quality in Asia (G. B. Leslie, K. J. Leslie, J. Huang, Y. Qin), pp236-243, Indoor Air International, International Association for Indoor Air Quality, Rothenfluh Switzerland (1994).

2) Lloyd R. Snyder, Joseph L. Glajch and Joseph J. Kirkland: Practical HPLC Method Development. John Wiley & Sons, Inc, 1988. (訳本: 高速液体クロマトグラフィーの実際、高橋昭、荒木峻訳、東京化学同人。)

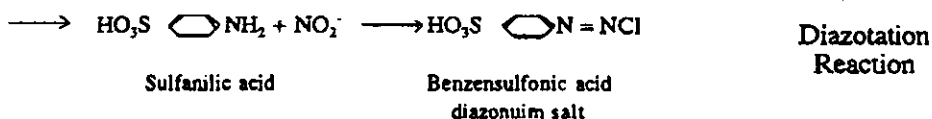
3) US EPA Method To-13, "The determination of Benzo[a]pyrene (BaP) and other polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH's) in ambient air using gas chromatographic (GC) and high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis". 1988.

Procedure for measurement of ambient NO₂ concentration by the Saltzman's method

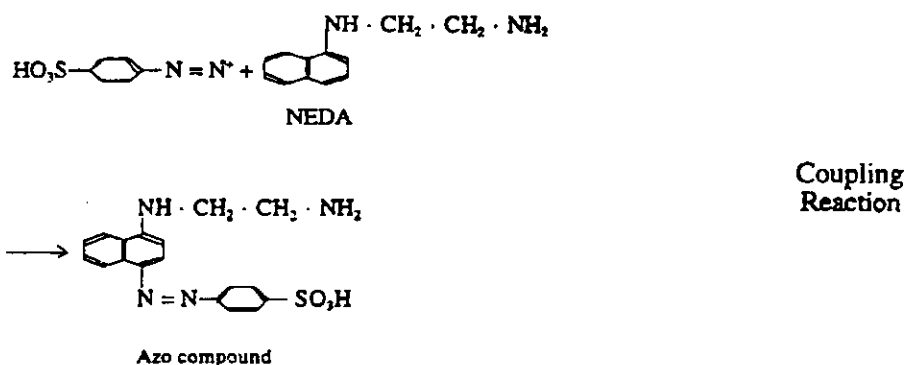
Principle

This method is originally developed by B.E. Saltzman (1954, Anal. Chem., 36, 610) and modified several times, especially about conversion ratio of NO₂ gas to nitrite ion. Now conversion ratio (Saltzman Factor) is experimentally determined as 0.84. Namely, 1 mol NO₂ produces 0.84 mol NO₂⁻ ion in a Saltzman solution. The absorbing solution includes sulfanilic acid (p-amino benzenesulfonic acid) and N-(1-naphtyl) ethylenediamine in 5 % acetic acid solution.

The NO₂ in a sample air collected in a Saltzman solution reacts with sulfanilic acid and produces diazonium compound (diazotation reaction).



Followed the above reaction, the compound reacts with N-(1-naphtyl)ethylenediamine (NEDA) and produces an azo dye which is stable red color (coupling reaction). This colored solution is measured by spectrophotometry.



Reagent

1. Absorbing solution (durable 3 months)

Sulfanilic acid (SA)	5.0 g	
N-(1-Naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDA)		0.05 g
Acetic Acid	50 ml	
Distilled water	950 ml	

SA and NEDA are dissolved completely in 950 ml distilled water using a glass stick, then add 50 ml acetic acid. This solution is transferred to a 1 l brown bottle and stored in a fridge.

2. NO₂ standard solution (durable 1 day)

Dry NaNO₂ at 110 °C for three hours, then keep in a silicagel desiccator for one night.

Weigh 0.25 g and dissolved in 1 l of distilled water (original solution).

Take 1 ml of original solution in a 100 ml volumetric flask and fill distilled water until the line. This final solution (standard solution) 1 ml equivalents to 1.0 µl NO₂ gas (0 °C, 760 mmHg)

NO₂ concentration in original solution is calculated as follows.

$$\frac{0.25 \text{ g}}{69 \text{ g}} \times 22.4 \text{ l} \times \frac{1}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1}{0.84} = 1 \times 10^{-4} \text{ l/ml}$$

The standard solution must be prepared just before use, however, the original solution can be stored in a refrigerator for one week.

Analytical Line

Take 1, 2, 3, 4, 5 ml of the standard solution in 20 ml of graduated test tubes each, then, add 9, 8, 7, 6, 5 ml of absorbing solution and leave 20 minutes at room temperature. Then transfer to photo-cell tubes for the spectrophotometer and measure the absorbance at wave length 540 nm.

Each absorbance is plotted on a normal scale section paper with the vertical axis for absorbance and the horizontal for amount of NO₂.

In case the points are deviate from the regression line, this work should be repeated.

Procedure for measuring absorbance

A simple type of spectrophotometer is shown in Fig. 1.

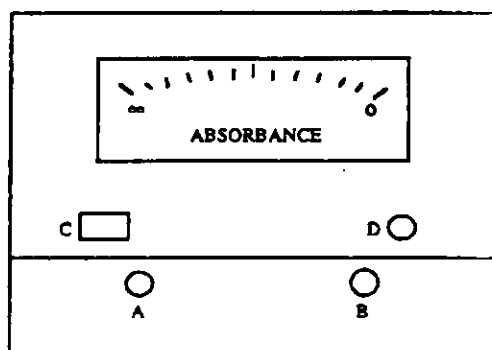


Fig.1. A simple type of Spectrophotometer

Turn the dial B clockwise to power on state

Turn the dial D and adjust wave length at 540 nm.

Turn the dial A and adjust indicator to ∞ then open lid C and insert a blank tube with absorbing solution and adjust the indicator to 0 using dial B. Repeat above procedure several times and confirm the stability. Measure the absorbance of sample solutions. (Notice: Absorbance are written in red figures).

Procedure of sampling

Ten ml of absorbing solution is taken in an absorbing tube (brown color) and connect with an empty impinger and a handy air sampler as shown in Fig.2.

Push the power switch A and adjust the flow rate 0.3 l/min by the regulator B.

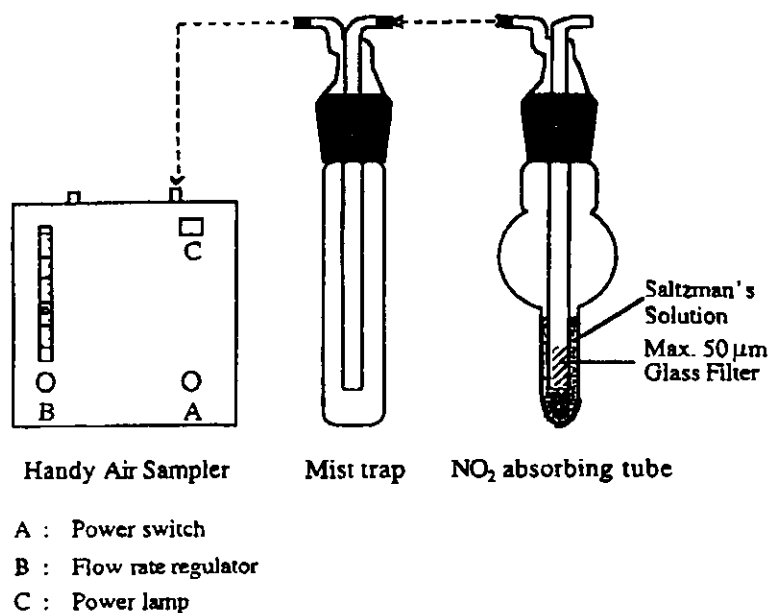


Fig.2. Schematic diagram of the apparatus for measuring NO₂ by Saltzman's method

Calculation

$$C_{\text{NO}_2} (\text{ppm}) = \frac{A}{A_s} \times \frac{1}{v}$$

C_{NO_2} (ppm) : NO₂ concentration (ppm)

A : Absorbance of a sample in 10 ml solution

A_s : Absorbance of standard solution contains 1 μl (NTP) of NO₂ in 10 ml of solution (nearly 0.19)

v : Volume of sampled gas (1, 0 °C, 1 atm)