

## <分析技術>

# 薄層クロマトグラフィー・デンシトメトリーによる 大気中のベンゾ（a）ピレンの分析\*

松本光弘\*\*・上田栄次\*\*・板野龍光\*\*

## 1. 緒言

欧米では今世紀に入ってから、日本でも第二次大戦後、肺がんは急激に増加しており、主な原因として煙草について大気汚染があげられている<sup>1)</sup>。大気汚染では多環芳香族炭化水素、なかでも Benzo (a) pyrene (以下、Bap と略) が問題とされ<sup>2)</sup>、これをうけ大気中の Bap 濃度に関する業績は数多く、著者らも奈良県の調査結果について報告している<sup>3)</sup>。

さて Bap の定量方法であるが、現在、松下らによる方法が広く用いられている<sup>4,5)</sup>。この方法は、薄層クロマトグラフィー (以下、TLC と略) と蛍光分光光度計を組合せたもので、多数の試料を比較的簡易に測定できる利点をもっている。しかしながら、TLC で展開分離した Bap に対応するスポットをかき取って測定するため、この段階で手順が繁雑となり、精度もおち、かき取り操作によって Bap を飛散する恐れがでてくる。そこで著者らは、TLC で分離後、デンシトメーターで直接 TLC プレート上の Bap のスポットを定量する方法 (以下、TLC-D 法と略) を検討し、良好な結果が得られた。さらに、この方法を実際試料 (大気中 Bap の季節別粒度分布) に適用したので併せて報告する。

## 2. 実験方法

### 2・1 試薬

TLC プレート：上層 アセチルセルロース (16×20 cm<sup>2</sup>)、下層 キーゼルゲール G (4×20 cm<sup>2</sup>) の二層タイプ、和光純薬製。

展開溶媒：メタノール-エチルエーテル-水 (4:4:1, v/v)。メタノール、水は無蛍光試薬 (ドータイトルミナドール、同仁薬化製)。エチルエーテルは特級試薬 (和光純薬製)。

抽出溶媒：ベンゼン、ジメチルスルホキシド (DMSO)

は無蛍光試薬 (ドータイトルミナドール、同仁薬化製)、エタノールは特級試薬 (和光純薬製)。

Bap 標準液：Bap (和光純薬製) の一定量を正確に量り、ベンゼンを加え、正確に 1 ml 中に Bap 1 μg を含む溶液を作り、標準液とした。

石英繊維濾紙：Pallflex 製、2500-QAST、80 mm φ。その他の試薬はすべて市販特級試薬を用いた。

### 2・2 装置

蛍光デンシトメーター：島津製作所製、二波長クロマトスキャナー MODEL CS-910。

蛍光分光光度計：日本分光製、MODEL FP-4。

アンダーセン・エアー・サンプラー：高立機器製、MODEL KA-200。

### 2・3 試料採取

試料採取は、昭和56年4月より翌年3月までの1年間にわたり、奈良市街地の当所屋上にて、春期 (4月)、夏期 (7月)、秋期 (10月)、冬期 (1月) の各季節に2回ずつの計8回を、アンダーセン・エアーサンプラーを用いて行った。このサンプラーの9段階に粒径別に分級捕集する各捕集ステージに石英繊維濾紙を固定し、1試料について規定流量 28.3 l/min で14日間連続採気し、試料を濾紙上に分級採取した。試料を採取した濾紙は、試料捕集面を内側にして2つ折りにした後、アルミニウム箔で包んで遮光し、ビニール袋に入れて密封後、冷暗所 (-5℃) に分析するまで保存した。

### 2・4 Bap の分析方法

Bap の定量は、松下らの方法<sup>4,5)</sup>を若干変更し、ベンゼン抽出→二層一次元 TLC→蛍光デンシトメーターで行った。すなわち、試料が付着した石英繊維濾紙の全部を細切し、ソックスレー抽出器を用い、エタノール 5 ml を加えて濾紙を十分湿らせた後、無蛍光ベンゼン 80

\* Determination of Benzo (a) pyrene in Atmosphere by Thin Layer Chromatography-Densitometry

\*\* Mitsuhiro MATSUMOTO, Eiji UEDA, Tatsumitsu ITANO (奈良県衛生研究所) Nara Prefectural Institute of Public Health

ml を用いて遮光条件下で 8 時間抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、クーゼルナーダニッシュ濃縮器により 1 ml に減圧濃縮して試料溶液とした。試料溶液の 500  $\mu$ l と Bap 標準液 (1  $\mu$ g/ml: ベンゼン soln.) 100  $\mu$ l を、90 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱活性化させた二層 TLC プレートの下層に塗布し、展開溶媒で 2 時間展開し、風乾後、UV (365 nm) を照射して Bap に対応するスポットの位置を確認し、蛍光デンシトメーターで展開方向と直角の方向にスキヤニングを行い、その結果得られた Bap の各スポットの積分値から定量を行った。蛍光デンシトメーターの測定条件は、励起波長:  $\lambda_{EX}=290$  nm, 蛍光干渉フィルター: 400 nm (蛍光波長), 測定モード

: 反射ジグザグスキヤン法, 測定光束:  $1.25 \times 1.25$  mm<sup>2</sup>, スキヤン速度: 20 mm/min で行った。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 TLC-D 法による Bap の定量

Fig. 1 に、二層一次元 TLC で展開した Bap のクロマトグラムを示した。そして、Fig. 2 と Fig. 3 に、ジグザグスキヤンの方法と蛍光デンシトメーターによって測定した Bap スポットのチャートを示した。

Bap の Rf 値は二層の境界より 0.08 (10 mm) であり、2 時間の展開で十分分離し、スポット幅も展開方向に 3 ~ 4 mm と小さく、デンシトメーターによる定量に適していた。そして、ジグザグスキヤン法は、照射光束を小さく絞り ( $1.25 \times 1.25$  mm<sup>2</sup>), 振幅 8 mm, ピッチ幅 1.25 mm でスポット全面をくまなくスキヤニングするので、スポットの濃度を正確に測定できた。用いた TLC プレートは幅 20 cm であるので、2.5 cm 間隔で 6 試料を塗布でき、20 mm/min のスキヤンスピードで測定すれば、わずか 10 分間で 6 検体の定量が可能であった。

デンシトメーターの検出限界を (S/N) 比の 2 倍とすれば、塗布試料中に絶対量として 0.2 ng の Bap があれ

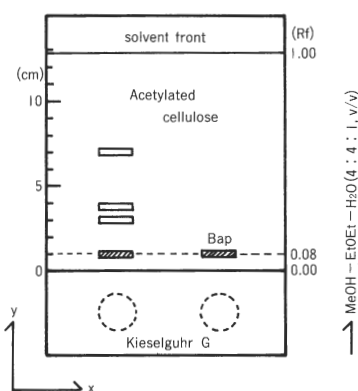


Fig. 1 One-dimensional dual band thin layer chromatogram of sample and Bap standard.

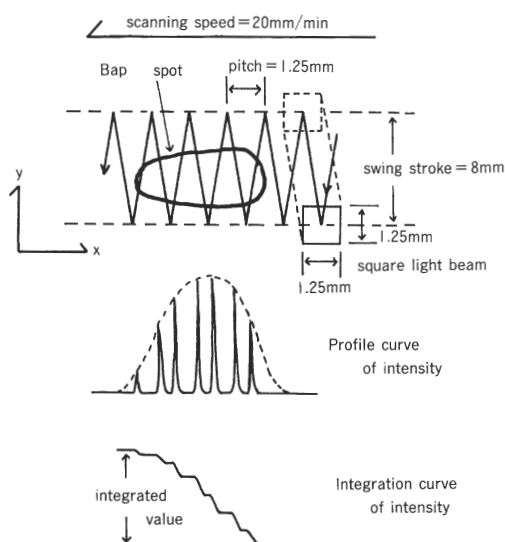


Fig. 2 Scheme of zigzag scanning method of densitometer for the Bap spot on the TLC plate.

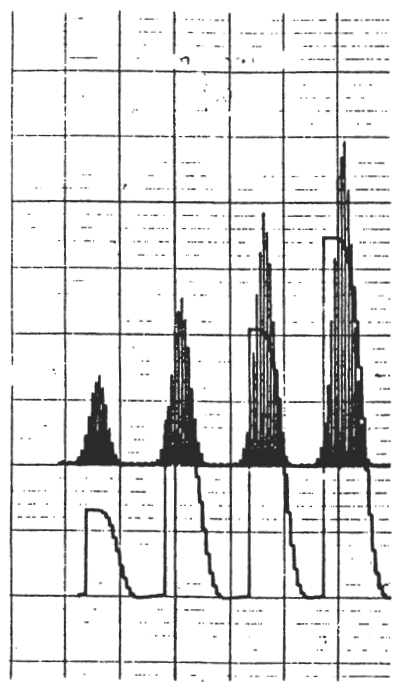


Fig. 3 Chart of profile curves and integration curves of intensity of Bap spots on the TLC plate measured by zigzag scanning method of densitometer.

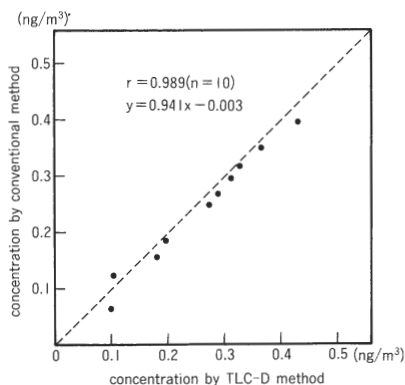


Fig. 4 Comparison of Bap concentrations measured by conventional method and TLC-D method.

ば検出可能であった。しかも、用いた TLC プレートは粒子が微細なため、非常に平滑、均質であるので、バックグラウンドのノイズが小さく、デンシトメーターの定量に適していた。

### 3・2 TLC-D 法と従来法の比較

Fig. 4 に、TLC-D 法と従来法による大気中 Bap の測定結果を比較した。なお、従来法による定量方法は、前報<sup>2)</sup>に示した通りである。TLC-D 法と従来法による測定値の相関は良く ( $r = 0.989$ )、回帰式が  $y = 0.94x$  であることより、若干、TLC-D 法による値が高かった。

TLC-D 法による検出限界は絶対量で  $0.2 \text{ ng}$ 、一方、従来法の検出限界は  $0.1 \text{ ng/ml}$  (絶対量  $0.4 \text{ ng}$ ) である

ことより、TLC-D 法は、従来法に比べ感度的に良好であった。

そして、両法による測定値のかたより (正確さ) の有無を調べるのに t-検定<sup>6)</sup>を行った結果、1% の有意水準でかたよりに有意差はなかった。

これらのことより、TLC-D 法は、従来法に比べ、スポットをかき取り、溶媒抽出する手数が省けるので、分析所要時間で  $10 \sim 20$  倍速く、分析誤差も小さく、かき取る際に Bap を飛散させる危険もなく、しかも TLC プレート試料を破損せずに保存でき、かつ、感度も良いことより、Bap の定量に適しているといえる。

### 3・3 TLC-D 法による Bap の定量範囲

Bap 標準液 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) の  $10, 30, 50, 70, 100, 200, 500 \mu\text{l}$  を TLC プレートに塗布し、3・1 で示した測定法で定量すれば、Bap の塗布量が  $500 \text{ ng}$  までの範囲で直線性が得られ、定量可能であった。この量は、アンダーセン・エア・サンプラーを用いて規定の流量で 14 日間連続して大気試料を採取するとき、各ステージの最大 Bap 濃度が  $1.8 \text{ ng/m}^3$  まで定量可能であり、今回の測定で得られた最大濃度が  $0.6 \text{ ng/m}^3$  であることより、実際試料に十分適用できた。

### 3・4 TLC-D 法による Bap の添加回収率と再現性

石英繊維濾紙 5 枚に Bap 標準液 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を  $100 \mu\text{l}$  添加し、試料と同処理を行い、同方法で定量して回収率を求めると、回収率は  $94 \sim 98\%$  であり、平均回収率は  $96\%$  であった。また、上記の標準試料について、それぞ

Table 1. Seasonal variation of Bap's mean concentrations in atmosphere collected by Andersen air sampler at Nara city.

Stage	Size range ( $\mu\text{m}$ )	Mean concentrations* ( $\Delta\text{m} : \text{ng/m}^3$ )				
		Spring	Summer	Autumn	Winter	Annun
0	> 11	0.059	0.020	0.079	0.092	0.063
1	7 ~ 11	0.027	0.010	0.043	0.075	0.039
2	4.7 ~ 7	0.038	0.012	0.059	0.102	0.053
3	3.3 ~ 4.7	0.057	0.018	0.083	0.141	0.075
4	2.1 ~ 3.3	0.106	0.035	0.143	0.340	0.156
5	1.1 ~ 2.1	0.185	0.073	0.275	0.528	0.265
6	0.65 ~ 1.1	0.329	0.169	0.425	0.599	0.381
7	0.43 ~ 0.65	0.151	0.077	0.194	0.289	0.178
B.F.	0.43 >	0.200	0.103	0.258	0.502	0.266
Total		1.152	0.517	1.559	2.668	1.474
Coarse	> 2.1	0.287	0.095	0.407	0.750	0.386
Fine	2.1 >	0.865	0.422	1.152	1.918	1.088

\* : N = 2

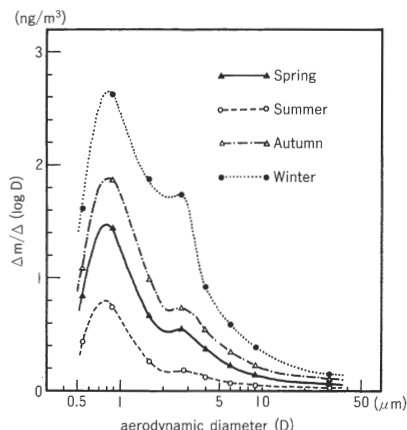


Fig. 5 Mean seasonal variation of particle size distribution curves of Bap in atmosphere.

れ3回ずつ、デンストメーターで繰り返し測定した結果、変動係数は0.5~1.1%であり、再現性も良好であった。

### 3・5 TLC-D 法による大気中 Bap の定量 (大気中 Bap の粒径分布)

TLC-D 法によって定量した当所屋上の大気中 Bap の季節別粒径分布を Table 1 に、そして、質量分布関数<sup>9)</sup>による粒径分布図を Fig. 5 に示した。

Bap の季節別平均濃度は、春期 (1.15 ng/m<sup>3</sup>)、夏期 (0.52 ng/m<sup>3</sup>)、秋期 (1.56 ng/m<sup>3</sup>)、冬期 (2.67 ng/m<sup>3</sup>) であり、前報<sup>3)</sup>に示した経月変化と同様で、冬期が最も高く、次いで秋期、春期、夏期の順であった。この理由としては、前報<sup>3)</sup>にも触れたように、冬期に化石燃料の消費が増大する人為的要因と、日射量および大気安定度による自然的要因が考えられる。

Fig. 5 に示した大気中 Bap の粒径分布図より明らかなように、大気中 Bap は年間を通して粒径 2.1 μm 以下の「微小粒子」側に集中しており、その占める割合は、春期 (75.1%)、夏期 (81.6%)、秋期 (73.9%)、冬期 (71.9%) であった。また、2~3 μm 付近にショルダーが見られるが、これは Bap が粒径 2.1 μm 以上の「粗大粒子」の一部に吸着したためと考えられた。本調査によって得られたこれらの事実、富田<sup>8)</sup>、松下ら<sup>9)</sup>、Broddin ら<sup>10)</sup>などの研究結果と同様の傾向を示していた。

## 4. 結 語

松下らの報告した Bap 定量法は、その簡易性と多試料分析に向いていることから、広く用いられている。しかし、薄層クロマトグラフィーで展開分離に続く Bap に対応するスポットのかき取り操作は繁雑であり、精度を落とし、Bap を飛散させる危険をはらんでいる。著者らは、このスポットをかき取ることなく、直接デンストメーターで測定することにより、原法にくらべ迅速性、精度・再現性にまさる結果が得られた。また、この方法により測定された当所屋上の大気中 Bap の平均濃度は、春 1.15 ng/m<sup>3</sup>、夏 0.52 ng/m<sup>3</sup>、秋 1.56 ng/m<sup>3</sup>、冬 2.67 ng/m<sup>3</sup> であった。

なお、本論文の一部は、第20回全国衛生化学技術協議会年会 (昭和58年) において発表した。

### 一引用文献一

- 1) 富永祐民, 黒石哲生: 疫学からみた肺がんの現状と動向, 公衆衛生, Vol. 47, No. 3, pp. 148~155, 1983.
- 2) 松下秀鶴: 環境汚染物質と毒性, 多環芳香族炭化水素, 化学の領域, 増刊129号, p. 115~134, 1980.
- 3) 松本光弘, 市川 博, 市村國俊, 上田栄次, 板野龍光: 奈良県における大気中のベンゾ (a) ピレンについて, 全国公害研究会誌, Vol. 6, No. 2, pp. 77~82, 1981.
- 4) 松下秀鶴: 環境大気中の多環芳香族炭化水素の分析法, 大気汚染研究, Vol. 10, pp. 724~731, 1976.
- 5) 松下秀鶴, 嵐谷奎一: 多環芳香族炭化水素の蛍光分析用溶媒としてのジメチルスルホキシド, 分析化学, Vol. 24, pp. 198~201, 1975.
- 6) F. H. C. Kelly: "Principal Mathematics for Chemist", Butterworth & Co. Ltd., 1963; 平田光穂訳: 「化学者のための実用数学」, p. 37, 東京化学同人, 1965.
- 7) S. S. Butcher, R. J. Charlson: "An Introduction to Air Chemistry", Academic Press, Inc., New York, 1972; 荒木 峻訳: 「大気汚染の化学」, p. 151~161, 東京化学同人, 1975.
- 8) 富田綱子: 大阪市の大気中多環炭化水素量, 大気汚染研究, Vol. 10, pp. 742~744, 1976.
- 9) 松下秀鶴, 林 久緒, 永田正信, 大塚富士雄: 大気浮遊粒子に含まれる多環芳香族炭化水素と重金属の粒度分布, 大気汚染学会誌, Vol. 15, pp. 45~52, 1980.
- 10) G. Broddin, L. Van Vaeck, K. Van Gauwenberghe: On the Size Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon containing Particles from a Coke Oven Emission Source, Atmos. Environ., Vol. 11, pp. 1061~1064, 1977.