

ニトロアレーン分析計の試作

| | |
|-----|---|
| 著者 | 早川 和一 |
| 雑誌名 | 平成7(1995)年度 科学研究費補助金 試験研究(B) 研究成果報告書 |
| 巻 | 1994-1995 |
| ページ | 8p. |
| 発行年 | 1996-03-01 |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/48779 |

KAKEN

1995

70

ニ ト ロ ア レ ー ン 分 析 計 の 試 作

(課題番号 06557121)

平成7年度科学研究費補助金 (試験研究(B)) 研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 早 川 和 一

(金沢大学大学院自然科学研究科助教授)

「はしがき」

大気質の悪化と肺がんや喘息などの疾病との関連が指摘されている。その対策として、欧米では大気環境基準あるいは排出基準項目として150から200余種の化合物が定められ、わが国でもその策定が急がれている。最近環境庁はその候補として284種の有害大気汚染物質リストを発表した。この中には強い発がん性を有する幾つかのニトロアレーン類が含まれているが、大気中の濃度が極めて低いために従来の分析法では十分に測定できないものや、まだリストアップされていないものもある。有効な規制を施すためにはこれらのニトロアレーンの高感度分析法の開発と汚染の実態把握が不可欠である。

既に本研究班員らは、発がん性は極めて強いが微量なために従来の蛍光検出高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー／質量分析法では追跡が困難なニトロアレーンとして、主としてジニトロピレンやニトロピレンを対象に化学発光検出高速液体クロマトグラフィーの原理を応用したニトロアレーン分析法を開発した。本法は従来法より遥かに高感度であり、極めて有用な方法であることがわかった。本研究では、さらに操作が容易でしかも高性能な分析システムを実現することを目的として、予め還元などの前処理を行う必要がない自動分析システム、さらにニトロアレーンと多環芳香族炭化水素を同時に分析できる一斉分析システムを開発した。また、これらのシステム条件を検討して、二次生成が疑われている幾つかのニトロアレーン類の分析をも可能とした。開発した分析システムをニトロアレーンによる都市大気汚染の現状把握や生物活性に関する研究に応用してその評価を行うとともに、今後の課題を明らかにした。

本研究は、平成6、7年度にわたって文部省科学研究費補助金（試験研究（B））の交付を受け、金沢大学大学院自然科学研究科並びに薬学部と株式会社島津製作所の共同で、主に金沢大学薬学部において行なわれた。研究成果の報告にあたり、ご協力いただいた関係各位に深く感謝の意を表する。

研究組織と研究経費は次の通りである。

研究組織

- 研究代表者： 早川和一（金沢大学大学院自然科学研究科・助教授）
 研究分担者： 宮崎元一（金沢大学薬学部・教授）
 研究分担者： 西村雅之（株式会社島津製作所応用技術部・主任）

研究経費

| | |
|-------|-------------|
| 平成6年度 | 5, 0 0 0 千円 |
| 平成7年度 | 6 0 0 千円 |
| 計 | 5, 6 0 0 千円 |



8000-45292-8

金沢大学附属図書館

[研究発表]

(1) 学会誌等

- 1) Kazuichi Hayakawa, Mizuka Butoh, Yukiko Hirabayashi, Motoichi Miyazaki:
Determination of 1,3-, 1,6-, 1,8-Dinitropyrenes and 1-Nitropyrene in Vehicle Engine Exhaust Particulates; *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 20-25 (1994).
- 2) Kazuichi Hayakawa, Noriko Terai, Tsuyoshi Murahashi, Motoichi Miyazaki:
Development of Nitroarene Analyzer; *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, P-29 (1994).
- 3) 村橋 毅, 早川和一, 岩本侑子, 宮崎元一: 蛍光/化学発光検出高速液体クロマトグラフィーによる大気粉じん中の多環芳香族炭化水素及びそのニトロ誘導体の同時分析; *分析化学*, **43**, 1017-1019 (1994).
- 4) 早川和一: (総説) 生活環境化学物質を対象とする新規光学検出液体クロマトグラフィーの開発; *薬誌*, **114**, 669-680 (1994).
- 5) Kazuichi Hayakawa, Tsuyoshi Murahashi, Mizuka Butoh, Motoichi Miyazaki:
Determination of 1,3-, 1,6-, and 1,8-Dinitropyrenes and 1-Nitropyrene in Urban Air by HPLC Using Chemiluminescence Detection; *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 928-932 (1995).
- 6) Tsuyoshi Murahashi, Motoichi Miyazaki, Ryuichi Kakizawa, Yoshihisa Yamagishi, Moritsugu Kitamura, Kazuichi Hayakawa: Diurnal Concentrations of 1,3-, 1,6-, 1,8-Dinitropyrenes, 1-Nitropyrene and Benzo[a]pyrene in Air in Downtown Kanazawa and the Contribution of Diesel-Engine Vehicles; *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 328-333 (1995).
- 7) Kazuichi Hayakawa, Yoshitatsu Kawaguchi, Tsuyoshi Murahashi, Motoichi Miyazaki:
Distributions of Nitropyrenes and Mutagenicity in Airborne Particulates Collected with an Andersen Sampler; *Mutation Res.*, **348**, 57-61 (1995).
- 8) Kazuichi Hayakawa, Tsuyoshi Murahashi, Motoichi Miyazaki: Behavior of Mutagenic Nitroarenes in Urban Air; *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, P-13 (1995).

(2) 口頭発表

- 1) Kazuichi Hayakawa, Motoichi Miyazaki: Determination of Mutagenic Nitroarenes in Urban Air by High-Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection; 8th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence, Cambridge, England, September 5-8, 1994.
- 2) Tsuyoshi Murahashi, Kazuichi Hayakawa, Motoichi Miyazaki: Simultaneous Determination of Mutagenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Nitrated

Derivatives in Airborne Particulates by HPLC with Fluorescence/Chemiluminescence Detection; Asian Symposium on Ecotechnology - Toyama'94, Toyama, October 3, 1994.

- 3) 村橋 毅, 早川和一, 宮崎元一: 蛍光/化学発光検出HPLCによる大気粉じんに着した多環芳香族炭化水素及びそのニトロ誘導体の同時分析; 日本分析化学会第43年会, 福岡, 平成6年10月13日-15日.
- 4) 川口佳辰, 早川和一, 村橋 毅, 宮崎元一: ニトロアレーンの変異原性解析における化学発光検出HPLCとAmes試験併用の有用性; 日本薬学会北陸支部第91回例会, 富山, 平成6年12月3日.
- 5) 早川和一, 村橋 毅, 川口佳辰, 宮崎元一: ニトロアレーン分析計による都市大気中変異原性ジニトロピレン及びニトロピレンの日内変動の追跡; 第56回分析化学討論会, 大阪, 平成7年5月11日-12日.
- 6) 早川和一, 村橋 毅, 川口佳辰, 宮崎元一: 化学発光検出高速液体クロマトグラフィによる都市大気中発がん性ニトロアレーンの追跡; 生物発光・化学発光研究会第14回学術講演会, 東京, 平成7年5月20日.
- 7) Tsuyoshi Murahashi, Kazuichi Hayakawa, Motoichi Miyazaki: Development of a Carcinogenic Nitroarene Analyzer - Determination of 2-, 4-Nitropyrenes and 2-Nitrofluoranthene; Asian Symposium on Ecotechnology - Toyama'95, Toyama, October 2-3, 1995.
- 8) 早川和一, 村橋 毅, 川口佳辰, 宮崎元一: 大気粉じん中の直接変異原測定におけるニトロアレーン分析とエイムス試験の相関; 第36回大気環境学会, 東京, 平成7年11月3日-5日.
- 9) 村橋 毅, 早川和一, 阿久津和彦, 宮崎元一: 化学発光検出HPLCによる大気粉じん中のニトロクリセン, ニトロフルオランテン, ニトロピレンの高感度分析; 日本薬学会第116年会, 金沢, 平成8年3月27日-29日.
- 10) 川口佳辰, 早川和一, 寺井規子, 宮崎元一: 大気粉じん中のDinitropyreneとNitropyreneを対象とした化学分析及びAmes試験に最適な抽出溶媒の検索; 日本薬学会第116年会, 金沢, 平成8年3月27日-29日.

(3) 特別講演等

- 1) 早川和一: 廃棄物のモニタリング技術; 富山技術開発事業団ハイテクゼミナール, 富山, 平成6年8月31日.
- 2) 早川和一: ジニトロピレンの超高感度分析法開発と大気内挙動; 公開シンポジウム

- 「未規制大気汚染物質の挙動と毒性－発がん関連物質－」, 金沢, 平成7年6月23日.
- 3) 早川和一: 金沢における未規制大気汚染物質の現状; 金沢大学自然科学研究科第2回公開シンポジウム, 金沢, 平成7年9月26日.
 - 4) 早川和一: 都市域における有害大気汚染物質の現状; 第39回全国環境衛生大会, 金沢, 平成7年11月9日.
 - 5) 早川和一: 有害大気汚染物質測定法の現状と今後の課題; 日本大気環境学会平成7年度中部支部講演会, 静岡, 平成7年12月8日.

(4) 出版物

- 1) 公開シンポジウム「未規制大気汚染物質の挙動と毒性－発がん関連物質－」要旨集, 文部省科学研究補助金研究早川班, 平成7年6月23日.

[研究成果]

1. 本研究の背景と目的

近年, 肺がんによる死亡率は増加の一途をたどり, 特に男性では, 平成5年度にはこれまでがんのなかでトップであった胃がんを追い越した. 大気環境中に存在する主な発がん物質として, 重金属(カドミウム, ニッケル, ひ素など), アスベスト, ベンゼン, 多環芳香族炭化水素(ベンゾ[a]ピレンなど), ニトロアレーンなどがあげられる. これらのなかでもニトロアレーンは発がん性が極めて強いにもかかわらず, 大気中濃度が低いため, 従来の分析法(GC/MS, 蛍光検出HPLC)では定量が困難であった. このため, 大気内動態はほとんど明らかになっておらず, 汚染防止対策も遅れているのが実情である.

このような問題を解決するため, 本研究班員らは既にニトロアレーンをアミノ体に還元後, HPLCで分離・化学発光検出するニトロアレーン分析法を開発した. その結果, 従来の分析法より2桁高感度化が達成され, 大気中の濃度が測定可能となった.

本研究では, 本分析法をさらに容易で高性能なものとするため, まず, 試料の前処理の際の抽出溶媒を検討した. 次に, 基本ニトロアレーン分析計を改良することにより, (1) 自動還元分析システム, (2) ニトロアレーン/多環芳香族炭化水素同時分析システム, (3) 2次生成ニトロアレーン分析システムを開発した.

2. ニトロアレーン分析のための抽出溶媒の検討

大気粉じんから変異原物質を抽出するために様々な有機溶媒が使用されているが、溶媒によってニトロアレーン抽出効率は異なると考えられる。最も抽出効率が高く、しかも毒性も弱い抽出溶媒を検索するため、金沢市内幹線道路沿いで捕集した大気粉じんに各種有機溶媒を加えて、超音波抽出し、その抽出物についてニトロアレーン分析法により1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレン及び1-ニトロピレンを定量した。比較検討した有機溶媒は、大気粉じん中の有機化合物の抽出に使用されたことが報告されているアセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、ベンゼン、ヘキサン、シクロヘキサン、酢酸エチル、ベンゼン-エタノール(3:1)の11種である。その結果、ベンゼン-エタノール(3:1)、アセトニトリル、エタノール、メタノールの順に高い抽出効率を示し、他の溶媒より1.2-1.7倍高いことが明らかとなった。この中でベンゼン、アセトニトリル、メタノールは毒性が懸念される。一方、エタノールはこれまで用いてきたベンゼン-エタノール(3:1)と比べると抽出効率は3-4%低いですが、抽出回数を増やすことにより同等の抽出効率を得られるようになったことから最も適していると考えられる。さらに、多環芳香族炭化水素の抽出効率についても検討中である。[参考研究発表: (2)-10]

3. 自動還元分析システムの開発

これまでの研究では、ニトロアレーンをHPLCに適用する前に水酸化ナトリウムを用いてオフライン還元していたが、操作が煩雑で長時間が必要であった。これを簡略化するために、分析システムに還元部を導入することとした。

まず自動還元部の基礎検討・最適化を行った結果、亜鉛を充填したカラムが還元効率、汎用性の面から優れていることがわかった。次に、ODSカラムではニトロ体を還元してから分離する方が分離後還元するよりも、ジニトロピレン3異性体間の分離がよかった。そこで、本システムでは自動還元部として亜鉛を充填したカラムを分析カラム(ODS)の前に導入することにした。さらに、分離度を向上させる目的で、試料を還元後、最も還元成績体の濃度が高い部分をスイッチングバルブでハートカッティングして、分析カラムに導入することとした。

一方、ニトロアレーンの還元と分析に最適な条件はそれぞれ異なるが、本システムに採用したハートカッティング法は還元用流路と分析用流路とを独立させることで、それぞれに最適な条件を選択することが可能である。そこで、還元用流路の流速を下げ、亜鉛を充填したカラムの寿命を1週間以上に延長させることができ、より実用性を高めることができた。

本法は、簡単な前処理のみで大気粉じん中のジニトロピレン3異性体及び1-ニトロピレンが一斉に定量できることから、これらの化合物のルーチン分析に適した方法であることがわかった。[(1)-2, (2)-6]

4. ニトロアレーン/多環芳香族炭化水素同時分析システムの開発

大気中には、主として直接変異原性を有するニトロアレーンとともに、主として間接変異原性を有する多環芳香族炭化水素も存在する。上述したようにニトロアレーンの自動還元分析システムは開発できたものの、依然としてニトロアレーンと多環芳香族炭化水素は別々に分析しなくてはならなかった。そこで本研究では、これらの化合物の同時分析法を開発した。

すなわち、開発したニトロアレーン分析法の前処理では、多環芳香族炭化水素も除去されず、ニトロアレーンと同様に精製される。そこで、ニトロアレーン分析用の化学発光検出HPLCシステムと多環芳香族炭化水素分析用の蛍光検出HPLCシステムとをスイッチングバルブで併合したシステムに試料を注入することで同時分析を可能とした。本法は、試料、有機溶媒、分析時間が節約でき、ニトロアレーン4種(1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレン, 1-ニトロピレン)と多環芳香族炭化水素8種(フルオランテン, ピレン, ベンツ[a]アントラセン, クリセン, ベンゾ[b]フルオランテン, ベンゾ[k]フルオランテン, ベンゾ[a]ピレン, コロネン)とが30分以内に定量可能になった。[(1)-3, (2)-2,3]

5. 2次生成ニトロアレーン分析システムの開発

本研究班員は、既に1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレン, 1-ニトロピレンは主にディーゼル車から発生することを明らかにしているが、ニトロアレーンのなかには大気中で多環芳香族炭化水素とNO_xにより2次生成するものもある。主なものとして、2-, 4ニ

トロピレン、2-ニトロフルオランテン、6-ニトロクリセンが知られている。これらの生成は大気の変異原活性増強の可能性を示唆することから、その動態解明が強く望まれている。そこで上述のニトロアレーン分析法を次の様に改良することにより、6-ニトロクリセン、2-ニトロフルオランテン、2-, 4ニトロピレンを1-ニトロピレンとともに定量できる分析法を開発した。

基本ニトロアレーン分析システムでは、きょう雑ピークが目的化合物の定量を妨害した。そこで、このシステムに高い精製効果を与えるための精製用ODSカラム、更に還元を自動化する亜鉛充填カラムと分離・検出を改善する濃縮用ODSカラムを導入した。このシステムに大気粉じん抽出物を精製・還元操作なしに注入したところ、わずか2 hの大気サンプリングでも上記5化合物の定量が可能であった。これらの化合物の金沢市市街地大気中濃度は 10^{-12} - 10^{-16} mol m⁻³の範囲にあった。本法は2次生成ニトロアレーンの大気内動態追跡に有用な分析法である。 [(2)-7, 9]

6. 結語

本研究では、オフライン還元化学発光検出HPLCを用いた基本ニトロアレーン分析計を改良することにより、(1) 簡便な自動還元分析システム、(2) 多環芳香族炭化水素も同時に定量できる分析システム、(3) 2次生成ニトロアレーンも分析できるシステムを開発した。これらを用いることにより、ニトロアレーンのみならずそれと関係が深い多環芳香族炭化水素の大気内動態が広域的にしかも詳細に明らかにできると期待される。本研究班員の一部は、既に金沢、東京、並びに札幌の研究者らと共同研究班(文部省科学研究費補助金(一般C)研究班, 代表 早川和一)を組織し、開発した分析法を駆使することにより、3都市のニトロアレーンによる大気汚染の実態把握に着手している。