

DNPH誘導体化/HPLC法を用いた空气中アクロレイン定量方法の改良

大 貫 文^a, 齋 藤 育 江^a, 保 坂 三 継^a, 中 江 大^b

DNPH誘導体化/HPLC法による空气中アクロレインの定量は、回収率が低いために正確な結果を得ることが困難である。回収率低下の一因は、捕集管に空気を採取してから溶出するまでの保存時間が長くなる程、アクロレイン1分子にDNPH1分子が結合した標準的なアクロレイン誘導体の量が減少し、それ以外の誘導体が生成するためと報告されている。

そこで、本研究では、アクロレインの回収率を改善するために、溶出液にリン酸を加える酸処理法を検討した。対象空気をDNPH誘導体化用捕集管に採取し、アセトニトリルでアクロレイン誘導体を溶出させた後、溶出液1 mLに42.5%リン酸水溶液を0.1 mL添加し、65°Cで15時間反応させ、HPLCで分析した。対照として、DNPH誘導体化法よりもアクロレインの回収率が良好なCNET誘導体化法による測定値を用いた。酸処理の結果、標準的なアクロレイン誘導体のピーク高が増加するとともに、それ以外の誘導体のピーク高が減少した。また、捕集管の保存日数に係わらず、アクロレイン濃度は対照と近い値が得られた。したがって、DNPH誘導体化法によるアクロレイン測定は、溶出液をリン酸で処理することにより、捕集管の保存日数に係わらず、CNET誘導体化法による回収率と同レベルまで改善できることが分かった。

キーワード : アクロレイン, DNPH, CNET, リン酸

はじめに

空气中アルデヒド類濃度の測定方法として、アルデヒド類を2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (以下, DNPH) で誘導体化し、高速液体クロマトグラフ (以下, HPLC) で分析する方法がある。この方法は、大気及び室内空气中のホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド濃度を測定するための公定法であるが^{1,2)}、それ以外のアルデヒド及びケトン類も同じ原理で誘導体化することから、同一の捕集管による一斉分析が可能である。このため、他アルデヒド類の測定法としても一般的に利用されている。しかし、この方法で不飽和アルデヒドの一つであるアクロレインを測定した場合、捕集管に空気を採取してから溶出するまでの保存時間が長くなると、回収率が低くなることが報告されている^{3,4)}。青木らによる添加回収実験では、添加直後に溶出した時の回収率を100%とした場合、30分間常温保存した後の回収率は20%以下、120分後は約10%になることが報告されている⁴⁾。その一因として、捕集管内で保存中に、アクロレイン1分子にDNPH1分子が結合した標準的なアクロレイン誘導体の量が減少し、アクロレイン1または2分子に対し、DNPHが2または3分子結合した、標準物質以外の誘導体が生成されるためと考えられている^{5,6)}。

回収率を改善する方法としては、DNPH誘導体化以外の誘導体化法を用いる方法⁷⁻¹⁰⁾や、DNPH誘導体化用サンプラーの改良及び捕集法の変更¹¹⁻¹⁴⁾等がある。

なかでも、新しい誘導体化法の一つである α - (4-シアノ-

2-エトキシベンジル) ヒドロキシルアミン (以下, CNET) 誘導体化を用いる方法では、アクロレインの回収率が82~91%と良好であることが報告されている¹⁰⁾。しかし、CNET誘導体化法は公定法として採用されていないため、公定法に準じたホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドとの一斉分析を行う場合、DNPH誘導体化法を選択しなければならない。

そこで、我々は、現在利用しているDNPH誘導体化用の捕集管を用いた、簡便なアクロレインの定量法を検討した結果、回収率を大きく改善することができた。また、この改良法を用いて、ディーゼル排出ガス中のアクロレイン濃度を測定したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試薬

アクロレイン水溶液 (10 mg/mL) はAccuStandardから、アルデヒド/ケトンDNPH誘導体Mix (15成分) はSupelcoから、アクロレインCNET誘導体は林純薬から購入した。アセトニトリル (HPLC用)、リン酸 (85%) 及びメタノール (HPLC用) は和光純薬から、テトラヒドロフラン (HPLC用) はナカライテスクから購入した。

2. アルデヒド用捕集管

DNPH誘導体化用捕集管として、酸処理条件の検討用に主に捕集管A : ORBO-DNPH tubes (Supelco, 充填剤量120

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

mg) を、ディーゼル排出ガスの分析用に捕集管B : XPOsure Aldehyde Sampler (Waters, 充填劑量350 mg) を、またCNET誘導体化用捕集管として、スミキャッチCNET-A (住化分析センター) を用いた。

3. 分析装置と条件

HPLC分析装置は、ポンプ : LC-10AT, デガッサー : DGU-14A, カラムオープン : CTO-10AC, 検出器 : SPD-10AV及びSPD-M10AVP (島津製作所) を使用した。

分析は、DNPH誘導体はTable 1に、CNET誘導体はTable 2に示した条件で行った。

4. 保存性試験

試料採取後の捕集管内におけるアクロレイン-DNPH誘導体の保存性試験は、テドラーバッグに調整したアクロレインガスを0.5 Lずつ採取した5本の捕集管Aを、4°Cの冷蔵庫で、0, 1, 2, 3及び7日間保存後にアセトニトリル2 mLで溶出させ、HPLCで分析した。

Table 1. HPLC Conditions for Acrolein-DNPH

Column	ZORBAX Bonus RP (4.6mm i.d.×25cm, 5µm)												
Column Temp.	40°C												
Eluent A	Acetonitrile/Water/THF 50/50/0.1												
Eluent B	Acetonitrile/Water/THF 80/20/0.1												
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>min</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>17</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table>	min	B (%)	0	25	14	25	17	100	26	100	27	25
min	B (%)												
0	25												
14	25												
17	100												
26	100												
27	25												
Flow Rate	1.0 mL/min												
Injection Vol.	10 µL												
Wave Length	360 nm												

THF : Tetrahydrofuran

Table 2. HPLC Conditions for Acrolein-CNET

Column	ZORBAX Bonus RP (3.0mm i.d.×25cm, 5µm)												
Column Temp.	40°C												
Eluent A	Acetonitrile/Water/THF 50/50/0.1												
Eluent B	Acetonitrile/Water/THF 80/20/0.1												
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>min</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>25</td> </tr> </tbody> </table>	min	B (%)	0	25	10	25	11	100	20	100	21	25
min	B (%)												
0	25												
10	25												
11	100												
20	100												
21	25												
Flow Rate	0.5 mL/min												
Injection Vol.	10 µL												
Wave Length	240 nm												

THF : Tetrahydrofuran

5. 酸処理条件の検討

酸処理条件の検討は、テドラーバッグに調整したアクロレインガスを捕集管A及びBに0.5 L採取し、4日間冷蔵保存した後、アセトニトリルで溶出して得られた溶出液を用いた。検討項目は、溶出液に添加するリン酸水溶液の濃度、添加後の反応時間及び反応温度で、アクロレイン関連誘導体のピーク高合計に対する標準的なアクロレイン誘導体の割合が高くなる条件を求めた。

6. 酸処理によるアクロレイン定量値の変化

テドラーバッグに調整したアクロレインガスを0.5 Lずつ採取した5本の捕集管Aを、0, 1, 2, 3及び7日間冷蔵保存し、それぞれの溶出液を用いて、酸処理前後のアクロレインの定量値を比較した。対照には、アクロレインガスをCNET誘導体化用捕集管で採取したアクロレインの測定値を用いた。

7. ディーゼル排出ガス中のアクロレイン等濃度

汎用小型ディーゼルエンジンNFAD-50-EX (309 cc, ヤンマー製) の排出ガスを導入したチャンバー内空気を捕集管Bに30 L捕集し、0, 1, 及び3日間冷蔵保存後、アセトニトリル5 mLで溶出した。酸処理前及び酸処理後の溶出液をHPLCで分析し、アクロレイン及び他アルデヒド類濃度を算出した。

測定は、運転条件を変えて3回行った。

結果及び考察

1. 捕集管内保存性試験

アクロレインガスを採取した捕集管を、0日から7日間冷蔵保存した後に得られた溶出液のHPLCクロマトグラムをFig. 1に示す。検出されたアクロレイン関連誘導体のピークを溶出順にAC1, AC2及びAC3とし、それぞれのUVスペクトルをFig. 2に示した。

各ピークの吸収極大波長は、AC1が373 nm, AC2が356 nm, AC3が354 nmで、AC1に比べAC2及びAC3は短波長側にシフトしていた。これらのUVスペクトル及び溶出時間と、Schulte-Ladbeckらの報告⁵⁾から、AC1はアクロレイン1分子とDNPH1分子が結合した標準的な誘導体、AC2はアクロレイン1分子とDNPH2分子が結合した誘導体、AC3はアクロレイン2分子とDNPH3分子が結合した誘導体と推測された (Fig. 3)。

AC1のピーク高は、採取後0日に溶出させた場合が最も高く、冷蔵保存後1日目に溶出させた場合は0日目の半分以下に、7日目には0日目の1/10になった。

AC2のピークは採取後0日から検出され、ピーク高は冷蔵保存後1日目から7日目まで同程度であった。AC3のピークは、採取後0日目では検出されなかったが、冷蔵保存後1日目から検出されはじめ、ピーク高は7日目に最も高くなった。

2. 酸処理条件の検討

AC2及びAC3をAC1に変化させるため、電気陰性度の差がある窒素-炭素の単結合部位 (Fig. 3の矢印で示した箇所) をプロトンで切断する方法、すなわち溶出液に酸を添加し反応させる条件を検討した。

1) リン酸濃度

捕集管A (4日間保存) から得られた溶出液1 mLに0, 14, 32及び42.5%に調整したリン酸水溶液0.1 mLを添加し、25°C及び60°Cで6時間反応させた。その結果、リン酸水溶液の濃度が高いほど、また、25°Cよりも60°Cで反応させた方が、AC1の割合が高くなった (Fig. 4)。この結果から、

添加するリン酸水溶液の濃度は42.5% (終濃度3.86%) とし、60°Cに加熱して反応させることとした。

2) 反応時間

捕集管A (4日間保存) から得られた溶出液1 mLに42.5%リン酸水溶液0.1 mLを添加し、60°Cで6, 15及び24時間反応させた結果、AC1の割合は6時間では60%, 15時間では85%, 24時間では86%であった。15時間及び24時間ではAC1の割合に大きな差が見られなかったことから、反応時間は15時間とした。

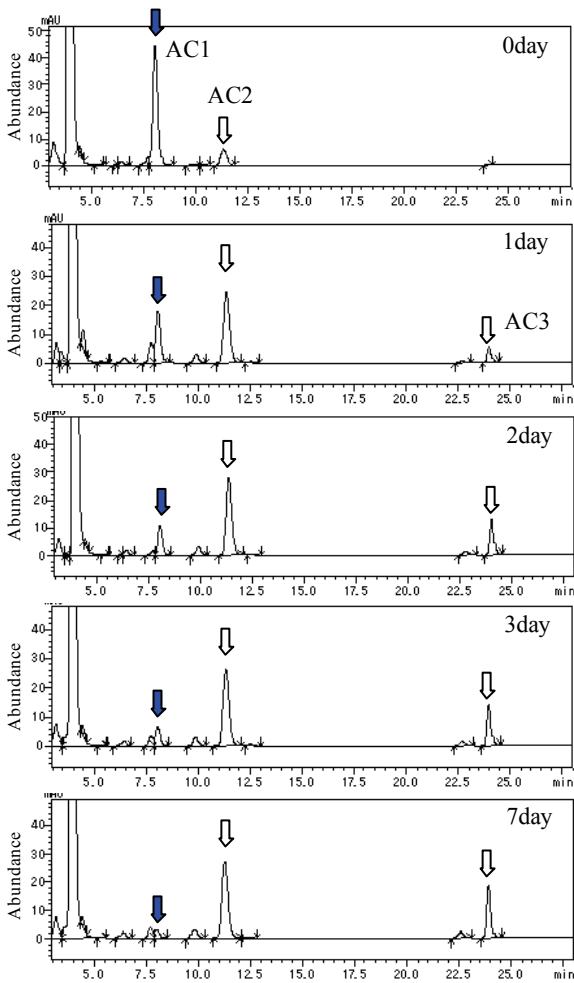


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Acrolein-DNPH (AC1) and its reaction products (AC2 and AC3)

After keeping samplers at 4°C from 0 day to 7 days, the acrolein-DNPH were analyzed in each days.

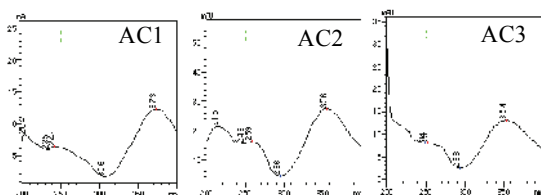


Fig. 2. UV Spectra of AC1, AC2 and AC3

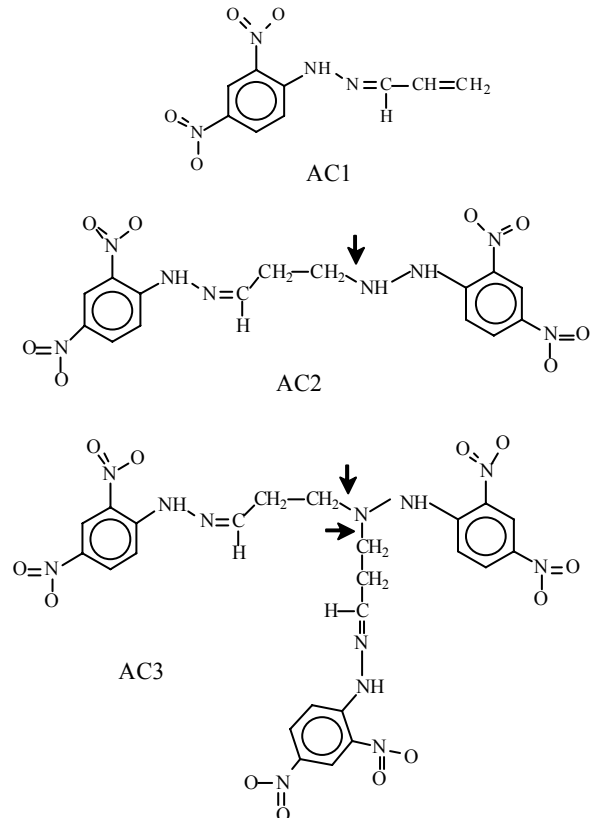


Fig. 3. Presumed Structures of AC1, AC2 and AC3⁵⁾

Arrows indicate the expected attack points by acid treatment.

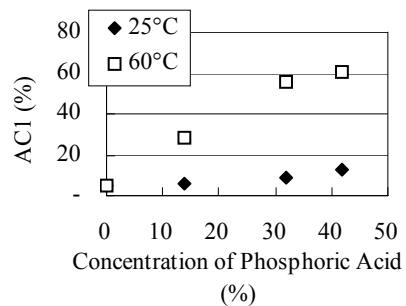


Fig. 4. Effect of Concentration of Phosphoric Acid Solution and Temperature on Proportion Change of AC1

The percentages of AC1 were calculated from the peak height of AC1 and the sum of those of AC1, AC2 and AC3.

3) 反応温度

捕集管A及びB (4日間保存) から得られた溶出液1 mLに42.5%リン酸水溶液0.1 mLを添加し、捕集管Aは40°Cから70°C、捕集管Bは55°Cから65°Cで15時間反応させた結果、捕集管Aでは60°C、捕集管Bでは65°Cで、AC1の割合が最も高くなった (Fig. 5).

以上の結果から、酸処理条件は、溶出液1 mLに42.5%リン酸水溶液0.1 mLを加え、65°Cで15時間反応させることとした。

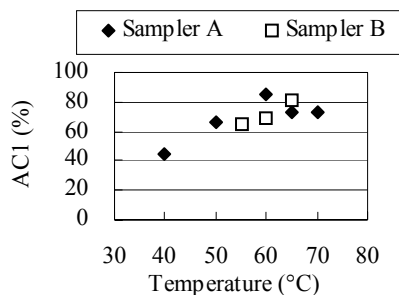


Fig. 5. Effect of Temperature on Proportion Change of AC1

The percentages of AC1 were calculated from the peak height of AC1 and the sum of those of AC1, AC2 and AC3.

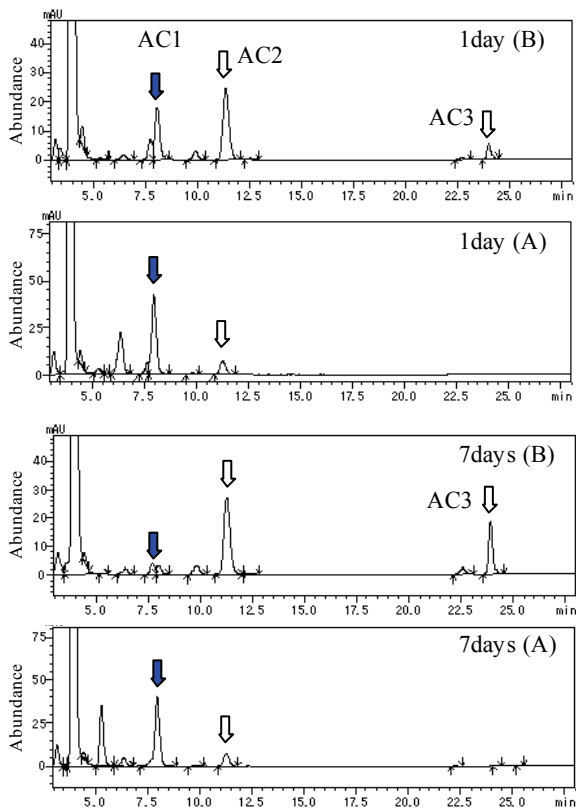


Fig. 6. Changes of HPLC Chromatograms before (B) and after (A) Acid Treatment of Extracts

Extracts were obtained from sampler A preserved from 1 day or 7 days in cool after adsorption of acrolein gas.

3. 酸処理によるアクロレイン定量値の変化

アクロレインガスを採取した捕集管を、0日から7日間、冷蔵保存した後に得られた溶出液について、酸処理前後のHPLCクロマトグラム (保存後1日目及び7日目) をFig. 6に、アクロレインの定量値をFig. 7に示した。

酸処理前と比べ、酸処理後はAC1のピーク高が増加し、AC2は減少、AC3は消失した (Fig. 6).

この変化を反映して、酸処理前のアクロレイン濃度は、捕集管内での保存日数が長いほど低くなり、7日目には0日目の1/10以下であったが、酸処理後の0~7日目の濃度範囲は5,630~6,100 µg/m³、変動係数3%であり、冷蔵保存7日間までほぼ同レベルの値が得られた (Fig. 7)。この値はCNET誘導体法によって得られた濃度 (5,500 µg/m³) と同程度であり、酸処理により回収率が改善されたことが考えられた。

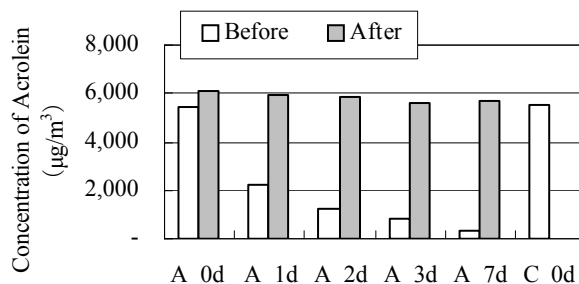


Fig. 7. Estimated Acrolein Concentration before and after Treating Extracts with Acid

A_0d-7d : The extract obtained from DNPH derivative sampler (sampler A) which adsorbed acrolein gas and preserved 0 - 7 days in cool.

C_0d : The extract obtained from CNET derivative sampler which adsorbed acrolein gas on the 0 day without acid treatment.

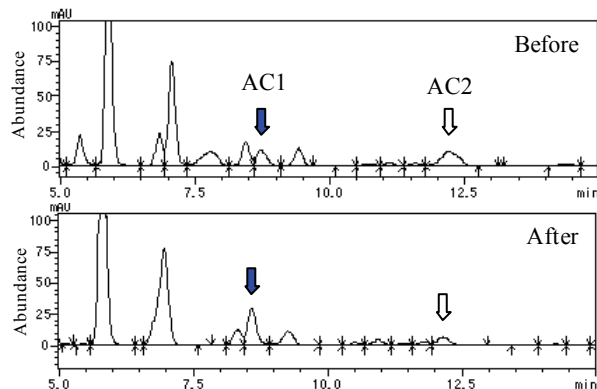


Fig. 8. Changes of HPLC Chromatograms before and after Acid Treatment of Extracts obtained from Sampler B which Adsorbed Diesel Exhaust 1

Table 3. Concentration of Carbonyl Compounds in Diesel Exhaust before and after Acid Treatment of DNPH

		Derivatives ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				
		Formaldehyde	Acetaldehyde	Acetone	Acrolein	Crotonaldehyde
Exhaust 1	Before	597	453	117	80.1	31.2
	After	703	497	86.5	215	45.6
Exhaust 2	Before	448	218	10.0	14.0	0.0
	After	417	159	1.0	53.3	12.7
Exhaust 3	Before	371	156	41.4	17.1	0.0
	After	612	150	20.6	51.0	12.5

4. ディーゼル排出ガス中のアクロレイン等濃度

酸処理前後のHPLCクロマトグラム（排出ガス1）をFig. 8に、アクロレイン等濃度をTable 3に示した。

酸処理後、AC1のピーク高が増加しAC2が減少したこと及びアクロレイン濃度が増加したことから、アクロレイン以外のアルデヒド類が混在する排出ガスについても、酸処理法が有効であることを確認した。

アクロレインは、ホルムアルデヒドやアセトアルデヒドと同様に「有害大気汚染物質に該当する可能性がある物質」の一つであり¹⁵⁾、汎用ディーゼルエンジン（コンクリートミキサ、大型コンプレッサ、動力脱穀機）に係る排出量推計結果¹⁶⁾から算出すると、排出されるアクロレイン濃度の割合は、ホルムアルデヒドの約5%、アセトアルデヒドの約24%であった。

しかし、今回の測定結果から、排出ガス中のアクロレイン濃度は $51.0\sim 215\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ で、ホルムアルデヒド濃度の12~36%、アセトアルデヒド濃度の24~48%、またアセトンよりも高濃度になることがわかった。このことは、これまでの推計よりも高い割合のアクロレインが大気中に排出される可能性があることを示すものである。

酸処理による他アルデヒド類への影響については、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド濃度は増加又は減少、アセトン濃度は減少、クロトンアルデヒド濃度は増加した。クロトンアルデヒドは、①不飽和アルデヒドであること、②標準的な誘導体以外の生成物が検出されること⁵⁾、③回収率が低いこと⁴⁾等、アクロレインと類似した性質を持つため、酸処理によってアクロレイン同様、回収率が改善した可能性が考えられる。他のアルデヒド類については、濃度変化が一定でなく、酸処理による反応機構は不明であった。

以上のことから、ホルムアルデヒド等の一斉分析時に、アクロレイン関連誘導体が検出された場合や、アクロレインを含む可能性がある空気を採取した場合には、溶出液の一部を酸処理することで、正確なアクロレインの定量値を得られることが分かった。

ま と め

DNPH誘導体化法によるアクロレインの回収率は、捕集管からアセトニトリルで溶出させた液を酸処理することで改善し、酸処理後の測定濃度はCNET誘導体化法による値と同程度になった。

この酸処理法を利用し、大気中アクロレインの発生源と考えられるディーゼル排出ガスを分析した結果、酸処理後はアクロレイン濃度が増加し、他アルデヒド類が混在するサンプルにおいても酸処理法が有効であること、また、アクロレイン以外のアルデヒド類との存在比率は、これまで示されているものよりも高くなることが示された。

付 記

（本研究の概要は平成23年度室内環境学会学術大会2011年12月で発表した。）

文 献

- 1) 環境省水・大気環境局大気環境課：環大規第27号，有害大気汚染物質測定方法マニュアル，平成23年4月1日改正，
<http://www.env.go.jp/air/osen/manual2/index.html>（2012年9月20日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 2) 厚生労働省医薬局長：医薬発第0207002号，室内空气中化学物質の室内濃度指針値及び標準的測定方法等について（通知），2002.
- 3) IPCS: No.43 Acrolein, CICAD, 2002.
- 4) 青木睦実，野田高広，大浦健，他：平成14年度室内環境学会講演集，118-119, 2002.
- 5) Schulte-Ladbeck, R., Lindahl, R., Levin, J.-O., et al.: *J. Environ. Monit.*, **3**, 306-310, 2001.
- 6) 野口美由紀，八巻高子，柳沢幸雄：平成20年度室内環境学会講演集，234-235, 2008.
- 7) Knighton, W.B., Herndon, S. C., Shorter, J.H., et al.: *J. Air & Waste manage. Assoc.*, **57**, 1370-1378, 2007.
- 8) Ho, S.S.H. and Yu, J.Z.: *J. Environ. Monit.*, **4**, 728-733, 2002.
- 9) 中山明美，秋山賢一：第15回環境化学討論会講演要旨集，616-617, 2006.
- 10) 上堀美智子，今村清，服部幸和，他：環境化学，**18**(1), 73-80, 2008.
- 11) 秋山賢一，中山明美：第18回環境化学討論会講演要旨集，124-125, 2009.
- 12) Liu, L.-J.S., Dills, R.L., Paulsen, M., et al.: *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2301-2308, 2001.
- 13) 萩野浩之，中山明美：分析化学，**59**(3), 251-256, 2010.

- 14) Uchiyama, S., Inaba, Y., Kunugita, N.,: *J. Chromatogr. A*, 1217, 4383-4388, 2010.
- 15) 環境省水・大気環境局長：環水大総発第101015002号, 今後の有害大気汚染物質対策のあり方について（第九次答申）について（通知），2010.
- 16) 経済産業省：化学物質排出把握管理促進法PRTR制度 平成22年度届出外排出量の推計方法等 9.汎用エンジンに係る排出量, http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/h22kohyo/todokedegai_haisyutsu/syousai/9.pdf（2012年9月20日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

Alternative and High-Performance Method for Quantification of Acrolein in Air with HPLC and DNPH DerivatizationAya ONUKI^a, Ikue SAITO^a, Mitsugu HOSAKA^a and Dai NAKAE^a

Official analytical methods in Japan include the measurement of aldehydes using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization and high-performance liquid chromatography, but this has been hampered by the poor quantitativity of acrolein, an unsaturated aldehyde. This is thought to be due to the formation of acrolein–DNPH derivatives other than the standard ones in the sampler during storage. In this study, we examined the addition of phosphoric acid to an extract from the sampler to solve this problem. Acrolein gas was adsorbed by the sampler to form the DNPH derivatives, and the resulting acrolein DNP-hydrazones were extracted by acetonitrile. Then, phosphoric acid was added to the extract and heated at 65°C for 15 hours before analysis. For the control, we used the CNET derivatization method, which has been reported to have a high acrolein recovery rate. The acid treatment demonstrated that the peak height of reactants other than the standard acrolein derivative decreased and that of the standard increased correspondingly, so that the estimated acrolein concentration increased to the same recovery rate as the control irrespective of the sampler storage periods from sampling to extraction. Therefore, we concluded that treating the extract with phosphoric acid satisfactorily improved the acrolein recovery rate of our DNPH derivatization method.

Keywords: acrolein, DNPH, CNET, phosphoric acid

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan