

(73) 超臨界 CO₂ 抽出/SPME 法による土壤中 PAH、PAE 濃度調査の検討

Study of Surveying PAH and PAE in the soil using Super Critical CO₂ Extraction / SPME method

島崎雄* 安河内健** 米田稔** 森澤眞輔**

Takeshi SHIMAZAKI*, Ken YASUKOUCHI**, Minoru YONEDA**, Shinsuke MORISAWA**

ABSTRACT ; For the screening of a large amount of environmental soil samples, it is required to reduce the use of organic solvents and simplify the extraction procedures. Therefore, we established a simple method by extending the supercritical fluid and Solid Phase Micro Extraction (SPME) method. The method developed in this study has the sufficient efficiency of the PAH extraction from the soils compared with the procedure established by the Environmental Ministry and the extraction method using subcritical water and SPME. Therefore, this method was applied to the field survey of PAHs and PAE in the soil of Kyoto city in summer season and winter season. Many of the sites were contaminated with DEHP, Fluoranthene and Pyrene in both seasons. The seasonal change was not observed in the PAHs distributions in the Kyoto city.

Keywords ; Super Critical CO₂ Extraction, Solid Phase Micro Extraction, PAH, PAE

1. 序論

プラスチック可塑剤として広く用いられている DBP、DEHP 等のフタル酸エステル (PAE) や、自動車排ガス等に含まれる多環芳香族炭化水素 (PAH) は、近年、内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) の疑いが持たれ、その環境中挙動や毒性が注目されている。PAE はプラスチックとの結合の弱さからプラスチック製品やその製造過程から容易に環境中に溶出・揮発し、PAH は自動車排ガス等の多数の非特定汚染源が存在することから、環境中での低濃度、広範囲な汚染が危惧されている。これらの化学物質のリスク評価を行なうためには発ガン性や生殖毒性と言った有害性の判別と同時に、環境中に放出された微量化学汚染物質が、水・大気・土壌等の媒体にどのように分配されるかを把握し、環境中の存在量や生物への曝露量の実態を明らかにすることも肝要である。そこで曝露量を明らかにする環境調査データ数に着目すると、平成 13 年度の環境省による化学物質環境安全性総点検調査¹⁾において、水系環境調査は水質・底質・魚類について全国 56 地点で 14 物質 (群) を対象としているのに対し、大気系環境調査は全国 22 地点で 14 物質 (群) であり、土壌系環境調査については行なわれてすらいない。環境モニタリングのために多数の土壌サンプルを測定しようとする場合、従来の土壌中有機化学物質濃度調査方法が、有機溶媒を大量に使用すること、抽出・分離・濃縮などの操作を必要とすること、また時間と労力を要し、分析者の健康影響までもが危惧されるなどの問題点が挙げられ、土壌中有機化合物の濃度測定にはより簡易かつ分析者の健康、環境に配慮した測定法が求められる。

従来の研究において、三井ら²⁾は固相マイクロ抽出法 (SPME) をヘッドスペースに用いた土壌中有機汚染物質濃度の測定を行ない、SPME を用いた簡易土壌分析が PAE、PAH に有効であると示した。そこで本研究では、三井らの SPME を用いた測定法の検出感度をさらに上げ、有機溶媒の使用量を極力抑え、抽出・分離・濃縮等の操作を省略し、時間的にも作業環境的にも測定者の負担を低減したより簡易な測定法を確立するこ

* 神鋼バンテック株式会社(Shinko Pantec Co.Ltd.) **京都大学(Kyoto University)

とを目的とし、近年その有用性が注目されている超臨界流体抽出^{3), 4)}を取り上げ、超臨界 CO₂ と SPME を組み合わせた測定方法（超臨界 CO₂/SPME 法）についての検討を行なった。超臨界 CO₂ 抽出では抽出補助剤（モディファイア）として少量の有機溶媒を添加することにより抽出効率を増加させられることが知られている。そこで、まず超臨界 CO₂ 抽出と SPME を組み合わせるうえで最適なモディファイアとその添加量の条件を最適化することにより PAH や PAE の土壤中濃度を超臨界 CO₂ 抽出/SPME 法で測定する可能性について検討する。また、従来用いられている測定方法で、比較の有機溶媒を使用せず測定者にとって比較的安全で有機廃液処理という点で環境負荷の比較的小さいとされる超音波抽出法、亜臨界水抽出法との抽出率の比較を行う。

さらに、将来的に子供たちの土壌摂食によるリスク評価を行なうことを念頭に入れて、京都市内 29ヶ所の児童公園について夏期および冬期の 2 回土壌採取を行い、本研究で求めた最適測定条件を用いて京都市内における土壌中 PAHs および PAE の汚染濃度を調査する。また、採取土壌について粒径及び強熱減量を測り測定有機化学物質濃度との相関の有無を調べ、対象汚染物質の汚染特性について検討することを本研究の目的とする。

2. 抽出方法

2. 1 超臨界 CO₂ 抽出/SPME 法

有機溶媒の使用量を極力抑え、抽出・分離・濃縮などの操作を省略し、時間的にも作業環境的にも測定者の負担を低減した簡易測定法として、超臨界 CO₂ 抽出と SPME 法を組み合わせた方法を提案するとともに、本研究の土壌中濃度測定に用いた。以下にその方法を示す。

超臨界 CO₂ 抽出装置付属の抽出槽（容積 50ml）にガラスビーズ 10g を入れ、続いて広口瓶内で葉さじを用い良く攪拌した試料土壌 20g（湿重）を入れる。さらに空隙充填材としてガラスビーズを 10g 添加して、軽く土壌とともに攪拌する。次にこの土壌に後述の SI 溶液を 0.1ml 添加した。本研究では安定同位体(SI)である DBP-d₄、DEHP-d₄、ナフタレン-d₈、アセナフテン-d₁₀、アントラセン-d₁₀、ピレン-d₁₀（以下 DEHP-SI などと略す）をそれぞれ 20μg/ml 含むアセトン溶液として内標準物質に用いることで定量を行なった。このアセトン溶液を SI 溶液と呼ぶ。超臨界 CO₂ 抽出装置の各パラメータは Table 1 に示す。超臨界 CO₂（流量 5.0ml/min、圧力 20MPa、抽出温度 50℃）とともに場合によっては抽出補助剤（モディファイア）を添加する。一定時間の抽出の後、モディファイアを使用した場合は得られたモディファイア抽出液約 3ml から 1ml を量り取り、20ml ガラスビーカーに移して 10%の NaCl 水溶液で 10ml にメスアップした。また CO₂ のみで抽出した場合は直接抽出容器に 10%の NaCl 水溶液を 1ml ほど加え、これで容器を十分洗った後、これを 20ml ガラスビーカーに移して 10%の NaCl 水溶液で 10ml にメスアップした。これをマグネティックスターラーで攪拌しながら、これに SPME ファイバーを 15 分間直接浸漬させることにより測定対象物質を抽出後、GC/MS で測定した。GC/MS の測定条件は Table 2⁵⁾に示す通りである。

Table 1 Condition of Operating Supercritical Fluid Extraction

Sample Volume	wet soil20(g)+glassbeads20(g)
Extraction Temperature	50(°C)
Pressure	20(Mpa)
CO ₂ Flow Rate	5.0(ml/min)
Modifier	acetonitrile
Modifier Flow Rate	0.05(ml/min)
Extraction Time	60(min)
Nozzle Temperature	60(°C)
Nozzle Length	1(cm)
Trap	glass vial
Extraction Tank Volume	50(ml)

Table 2 Programmed temperature of GC/MS

		rate(°C/min)	temperature(°C)	retention time(min)
Injection	—	—	250°C	—
Column	Initial	—	50	2
	1st stage	20	160	0
	2nd stage	6	250	2

2. 2 定対象物質、使用試薬、装置、標準試料

(1) 測定対象物質

あらかじめいくつかの道路際の表層土壌を測定することによって、検出された以下の PAH と PAE を測定対象物質とした。

PAH: ナフタレン、ベンゾチアゾール、2-メチルナフタレン、1-メチルナフタレン、ピフェニル、ジメチルナフタレン、アセナフテン、ジベンゾフラン、フルオレン、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、クリセン

PAE: DEHP (フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)、DBP (フタル酸ジブチル)

(2) 試薬

DBP-d₄、DEHP-d₄ (林純薬)、ナフタレン-d₈、アセナフテン-d₁₀、アントラセン-d₁₀、ピレン-d₁₀ (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES 製)

測定対象物質に対して、測定対象物質のサロゲート化合物がある場合はそのサロゲートを内標準物質として用い、サロゲート化合物のないベンゾチアゾール、2-メチルナフタレン、1-メチルナフタレン、ピフェニル、ジメチルナフタレンにはナフタレン-SI、ジベンゾフラン、フルオレンにはアセナフテン-SI、フェナントレンにはアントラセン-SI、フルオランテン、クリセンにはピレン-SI をそれぞれ内標準物質として用いた。また容器の洗浄用も含めて他の試薬は全て残留農薬試験用試薬を使用した。

(3) 装置

超臨界 CO₂ 抽出装置: 日本分光インテリジェント超臨界 CO₂ 送液ポンプ SCF-GET 型

使用 SPME: SPELCO 製ポータブルフィールドサンプラー PDMS100μm

GC/MS: 島津製作所ガスクロマトグラフ GC-14 型、同質量分析計 QP-2000A 型

(4) 標準試料

抽出効率を測定するための試料としては、土壌の特性および測定対象物質の吸着形態とともに実際の測定対象土壌と同じものが望ましいと考えられる。このため抽出効率を検討するための標準土壌試料としては自動車排ガスが主要な発生源と推察されている PAH が多く含まれていると思われる比較的交通量の多い道路際の埋込土を用いた。

(5) 検量線

相対検量線を作成し、SI 比から土壌中有機物質濃度を割り出した。これにより窒素ガス吹き付けによる濃縮で対象物質が揮散し多少損失を生じてでも有機物質濃度を測定できるものとした。

2. 3 測定条件の検討

(1) SPME の溶媒ごとの抽出力

超臨界 CO₂ 抽出/SPME 法のモディファイアに有機溶媒を用いることを仮定して、SPME への標準物質の抽出が水と有機溶媒水溶液でどう変化するかをガラスビーズ 40g にアセナフテンとアントラセンの SI 各 2μg を添加して超臨界 CO₂ 抽出を行なうことにより検討した。モディファイアにエタノールを用い、その抽出液に直接 SPME を浸漬させても、全くピークを検出することはできなかった。しかし、抽出液を適当に水で希釈することにより対象物質のピークを得られるようになった。これは SPME ファイバーの中出力がエタノールなどの有機溶媒に妨害される、すなわち、対象物質が溶解する有機溶媒中に SPME ファイバーを浸漬させると、有機溶媒の方が対象物質よりも先にファイバーに吸着され、対象物質が吸着するスペースがなくなる

ためと考えられる。そこで抽出液をどの割合で希釈すると効率がよいのか検討した。ここでは2倍希釈、10倍希釈、20倍希釈について検討を行った。希釈する液は塩析効果を得るために、水ではなく10%NaCl水溶液とした。3回行った測定についてナフタレンの結果をTable 3に示す。どの希釈倍率でも平均ピーク面積比に大きな差異はなく、希釈率はナフタレンの土壌中濃度測定結果に影響しないことが分かるが、3回の測定結果から、平均ピーク面積がより安定して得られる希釈率が10倍希釈であることがわかり、また変動係数も10倍希釈の場合が最も小さく、ばらつきが小さいことが分かり、本研究では得られた抽出液を10%NaCl水溶液で10倍に希釈することにした。

Table 3 Effect of dilution of extract

	dilution ratio		
	*2	*10	*20
average SI ratio	0.2828	0.2998	0.2824
average count	447	6307	3935
coefficient of variation	0.0802	0.0505	0.0927

そこでモディファイアとして、水に解けやすい有機溶媒で本研究の趣旨に沿う低毒性の物質であるエタノール、毒性をもつが廃液燃焼処理時にNO_xを生じず処理が容易なアセトン、廃液燃焼処理時にNO_xを発生する可能性があるが、従来の抽出法（3. 1参照）によく用いられている溶媒であるアセトニトリルを用いそれぞれ抽出液を10%NaClによって10倍希釈してSPMEで抽出を行なった。何回か実験を行なった時の典型的な結果をTable 4に示す。

Table 4 Effect of modifiers to extraction efficiency of SPME

Modifier	peak area	
	Acenaphthene-SI	Anthracene-SI
ethanol	0	0
acetone	0	0
acetonitrile	58281	116411
water	0	27706

Table 4でwaterというのは、モディファイアを使用しないでの抽出操作である。またTable 3の各数値はGC/MSでの測定ピーク面積であり、面積が0というのはマスピークが検出できなかったことを示す。

エタノールやアセトンをモディファイアとして用いた場合、少量の有機溶媒であってもSPMEファイバーへの吸着量が減少あるいは無視できる程度となる傾向が認められた。またアセナフテンSIについては、モディファイアとしてアセトニトリルを用いた時以外は検出さえできなかった。アセトニトリルを10%のNaCl水溶液で10倍に希釈したときには、良好な抽出率が得られることが判明した。モディファイアとしてアセトニトリルを用いることで良好な結果が得られ、エタノール、アセトンを用いた場合には全く検出できなかった理由として、SPMEのファイバーの吸着の選択性は対象物質の極性により、極性の高いものほど吸着されやすいという性質から、この3つの水溶液の極性の違いによって生じるSPMEへの吸着力の差の表れである可能性と考えられる。すなわち、それぞれ水/オクタノール分配係数(LogPow)を比較するとアセトニトリル：-0.38、アセトン：-0.24、エタノール：-0.32より、アセトニトリルがその極性の高さから最もSPMEファイバーに吸着されやすい、あるいは吸着の阻害が少ない溶媒であったと考えられる。SPMEファイバーに吸着されやすい極性の高い溶媒という点では水で十分であると考えられるが、本研究の超臨界CO₂抽出のモディファイアとして、土壌中対象物質の溶解能力をもつということも求められる。そこで本研究では、土壌中対象物質を溶解する能力を有し、かつその水溶液が対象物質のSPMEのファイバーに吸着されやすい、あるいは吸着を妨げないモディファイアとして、アセトニトリルを用いることにした。

(2) モディファイアの添加量の検討

標準土壌試料20gに対する抽出力の評価の為、0～20、20～40、40～60、60～80分の各抽出液に対して1μgの内標準物質を加え、抽出された測定対象有機物質量のピーク面積とその内標準物質とのピーク面積比（以

下 SI 比とする)を求めた。アセトニトリルのモディファイアの添加条件は 0ml/min、0.05ml/min、0.25ml/min の 3 条件とした。Fig.1 にそのときの各抽出時間帯による PAH の SI 比を示す。

0.05ml/min 添加の条件でモディファイアを添加した場合、無添加に比べ 4~5 倍の抽出力があり、また、流量 0.25ml/min の条件で添加した場合の 1.2~1.5 倍の抽出力を出すことが分かった。モディファイアの流量が大きいほど、すなわち同一時間内に固相が流体の通過を受ける回数が多いほど被抽出量が多くなるのが理にかなっていると思われるが、実験結果はこれと異なっている。これはモディファイア流量が大きくなることで抽出物中のアセトニトリル濃度が高くなり、対象物質の SPME への吸着を阻害してしまっているのではないかと考え、本研究に用いるアセトニトリルのモディファイア流量を 0.05ml/min とした。

2. 4 添加回収実験

土壌試料に既知濃度の標準物質を添加し、これを抽出した結果どれだけ添加物質を回収できているかを評価するために添加回収実験を行なった。ただし環境中の土壌試料がすでに高濃度で汚染されている可能性もあるため、本研究で使用する 6 種類の安定同位体を用いて添加回収実験を行なった。

6 種類の SI を SI-A (ナフタレン-SI、アントラセン-SI、DEHP-SI) と SI-B (アセナフテン-SI、DBP-SI、ピレン-SI) の 2 組にわけた。なお、あらかじめ SI-A および SI-B を同じ土壌に添加し測定した場合のナフタレン-SI とアセナフテン-SI のピーク面積比、アントラセン-SI と DBP-SI のピーク面積比、DEHP-SI とピレン-SI

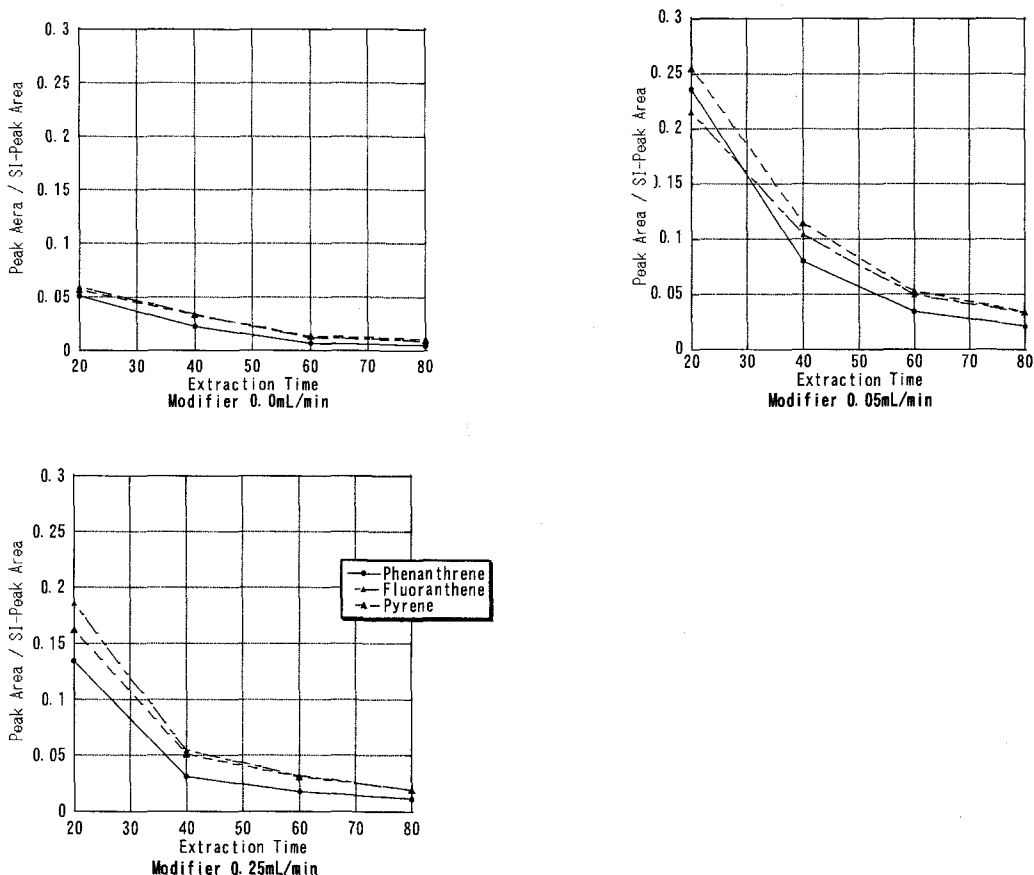


Fig.1 Change of extracted quantity in time depending on quantity of modifier addition

のピーク面積比がそれぞれ一定となることを確かめておく。ここで各 SI の組は、GC/MS での保持時間が近いもの同士となっている。添加回収実験では SI-A を土壤に添加し、超臨界 CO₂ 抽出時間を 80 分にとり、約 3ml の抽出液を 1ml に濃縮し、この 1ml に SI-B を添加し、測定にかけた。これにより SI-B は、ほぼ添加量全量が SPME に抽出されるのに対して、SI-A の方は、実験操作から回収率の損失が生じると思われる。この SI-A の回収率損失を SI-B のピーク面積と比較することにより算出した。Table 5 に添加回収実験結果を示す。

Table 5 Recovery of added SI (%)	
Naphthalene-SI	98.9
Anthracene-SI	84.5
DBP-SI	88.5

なお SI 添加について、土壤試料に SI のアセトン溶液を添加してその後すぐに抽出するのと、汚染を受けて長期間を経た土壤試料からの抽出とでは抽出特性が異なることが考えられる。そのため、添加した SI の溶媒の影響を考慮して添加後溶媒を揮発させる時間を取ることもあるが、本研究では添加溶媒量が 0.1ml と少なくまた、汚染を防ぐ意味でも SI 添加後時間をおくことなく抽出を行った。

回収率は 3 物質とも 8 割を超え、本研究で試みた超臨界 CO₂ 抽出/SPME 法は土壤中有機物質濃度測定法として十分通用するレベルにあると思われる。

3. 他の抽出法との比較

3. 1 超音波抽出法

従来から用いられてきた方法と比較するために、比較的簡易な方法として超音波抽出法を採用した。超音波抽出法は後述する亜臨界水/SPME 法と比べると有機溶媒を比較的大量に使い、時間と労力を費やすがその測定精度は高く、データのばらつきは小さいとされる。

土壌 20g をガラス製遠沈管 100ml にとり内標準物質として各 SI 濃度 20 μ g/ml のアセトン溶液を 0.05ml 添加後、アセトニトリル 30ml を加えて 5 分間振とうした。さらに超音波洗浄器(日本エマソン(株)ULTRASONIC CLEANER MODEL 2210J 発振周波数 47kHz 超音波入力 125W)を用いて 10 分間超音波抽出を行った後、3000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄み液 25ml を回収した。この抽出分離操作を計 2 回行ない、アセトニトリル抽出液を合わせ 50ml とする。このアセトニトリル抽出液全量を窒素ガスを穏やかに吹き付けて 1ml に濃縮する。この濃縮液を GPC カラムに注入して、対象物質の分画を試験管に分取する。GPC カラムによる対象物質分画の為の分取条件を Table 6 に示す。

分取液は合計 44ml となり、この分取液を窒素ガスを穏やかに吹き付けて 0.5ml に濃縮し、更に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、これを GC/MS で測定した。GC/MS の測定条件は Table 2 に示す通りである。

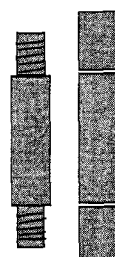
Table 6 Fractionation condition of GPC chromatography
Column: Shodex CLNpak PAE-800
Size: 8mmID*300ml
Mobile Phase: Acetonitrile
Flow Rate: 0.5ml/min

Fractionation time(min)	18~20	24~26	26~28	28~30
	DBP DEHP	Biphenyl Dimethylnaphthalene	Naphthalene Naphthalene-SI 2-Methylnaphthalene 1-Methylnaphthalene	Benzothiazole Acenaphthene-SI Acenaphthene Dibenzofuran Fluorene
Fractionation time(min)	30~36	36~38	38~44	
	Phenanthrene Anthracene Anthracene-SI	Fluoranthene	Fluoranthene Pyrene Pyrene-SI Chrysene	

3. 2 亜臨界水抽出／SPME 法⁶⁾

亜臨界水抽出／SPME 法は有機溶媒による抽出作業を行わないため、有機廃液を生じず、操作の時間短縮により数多くデータ採取することが可能であるとされている。本研究の目的である簡易かつ作業者にとって安全で、環境へもやさしい測定法の一つと言える。

標準土壌 1g を Fig.2 に示す特注のステンレス製バイアルに入れ、20 μ g/ml の SI 溶液を 25 μ l 添加する。あらかじめ窒素ガスを 1 時間バブリングすることにより溶存酸素を減らした地下水を水源とする水道水を約 3ml 加えた。テフロンテープをねじ口に巻きつけ蓋をすることにより完全密閉し、マッフル炉を用いて 250℃ にて加熱した。1 時間後取り出して速やかに流水で冷却し、ガラスバイアル(4ml)に内容物を移し、3000rpm で 10 分間遠心分離を行なった。上澄み 2.0ml に 0.2g の熱処理により洗浄した NaCl を添加し、スターラーで攪拌しながら SPME で 15 分間抽出した後、GC/MS で測定した。GC/MS の測定条件は Table 2 に示す通りである。



inside diameter : 8mm
outside diameter : 16mm
volume : 3.7ml
height : 80mm
pressure⁷⁾ <40bar

Fig. 2 stainless-steel vial

3. 3 測定法による抽出力の比較

児童公園（仮に A、B、C とおく）3 地点の土壌を採取し、2. 1、3. 1、3. 2 に示した測定法によりそれぞれ同じ土壌を用いて測定対象 16 物質についてその濃度を測定した。3. 1、3. 2 に示した測定法と 2. 1 に示した測定法での抽出率比を Table 7 に示す。

Table 7 Comparison of Extraction Ratio

	Park A		Park B		Park C	
	Extraction Ratio i (%)	Extraction Ratio ii (%)	Extraction Ratio i (%)	Extraction Ratio ii (%)	Extraction Ratio i (%)	Extraction Ratio ii (%)
Naphthalene	68.2	11.0	299.9	10.0	309.1	1.0
Benzothiazole	0.0	N.D.	0.0	0.0	0.0	0.0
2-Methylnaphthalene	43.8	19.3	85.9	13.0	89.9	22.9
1-Methylnaphthalene	20.0	8.2	59.5	6.6	66.8	12.4
Biphenyl	43.6	27.3	149.0	5.3	311.8	51.0
Dimethylnaphthalene	19.0	18.3	8.9	6.3	40.7	30.7
Acenaphthene	28.0	N.D.	185.8	N.D.	126.3	N.D.
Dibenzofuran	85.9	13.9	22.8	20.0	132.6	21.5
Fluorene	33.4	23.7	176.6	53.6	89.9	38.9
Phenanthrene	34.2	13.6	121.2	26.6	68.0	16.0
Anthracene	6.6	2.4	119.2	9.0	84.6	N.D.
DBP	162.1	N.D.	410.0	N.D.	504.0	N.D.
DEHP	201.5	N.D.	120.5	N.D.	145.9	N.D.
Fluoranthene	140.0	30.4	233.2	63.4	195.5	60.4
Pyrene	149.8	36.5	239.6	65.1	215.8	70.6
Chrysene	173.9	N.D.	118.1	N.D.	107.5	N.D.

ただし抽出率比 i、ii (%) はそれぞれ（超臨界 CO₂ 抽出／SPME 法による土壌中濃度）／（超音波抽出法による土壌中濃度）、（超臨界 CO₂ 抽出／SPME 法による土壌中濃度）／（亜臨界水抽出／SPME 法による土壌中濃度）の比率、Table 7 で ND は分母が検出限界以下、0.0 は分子が検出限界以下の場合を示す。また、超臨界 CO₂ 抽出／SPME 法による検出限界濃度を Table 8 に示す。Table 7 を見ると類似した化合物間においても抽出率の比にばらつきが見られるが、これは極性の違いによるものではないかと考えられる。

（1）超音波抽出法と超臨界 CO₂／SPME 法との比較

ベンゾチアゾールについては、超臨界 CO₂ 抽出／SPME 法を用いて検出することはできなかった。しかし、超音波抽出法によると公園 A:0.02 μ g/g、公園 B:0.01 μ g/g、公園 C:0.01 μ g/g と、フルオランテンやピレンなど

よりもはるかに高濃度で土壤中に存在していることが分かった。ベンゾチアゾールは、本研究中、超臨界CO₂抽出/SPME法によっては一度も検出することができなかったため、今回の条件はベンゾチアゾールに対しては不適合であったと思われる。また、DBP、DEHP、フルオランテン、ピレン、クリセン、の抽出率が平均して非常に良好であるが、ジメチルナフタレンのように抽出率が低いものも見られた。よって、総合的に見ると、概ね、超音波抽出法に匹敵する抽出率を得たと判断して良い結果と思われる。

(2) 亜臨界水/SPME法と本測定法との比較

アセナフテン及びピクリセンは、亜臨界水抽出/SPME法では一貫して不検出であった。DBP及びDEHPは、そのブランク値の高さ及び変動が原因で、亜臨界水/SPME法では定量には至らなかった。フルオランテン、ピレンについては、亜臨界水抽出/SPME法と比較しても公園B、Cにおいては6~7割の抽出率を示しているが、その他の物質については良好な抽出率を得られなかった。一見すると亜臨界水抽出/SPME法が非常に抽出率が高く、優れた測定法であるかのように思われる。しかし、この測定法については本研究では原因を明らかにできなかった重要な問題点が2つ観察された。1つは本研究で試みた亜臨界水抽出/SPME法では全般的にSIのピーク面積が得られにくいという問題点である。本研究の亜臨界水抽出/SPME法では超音波抽出法や超臨界CO₂抽出/SPME法の5倍量のSIを試料に投入してようやく定量に充分と思われるピーク面積を得ており、亜臨界水抽出の過程でSIが分解している可能性も考えられ、表中の数値が示す亜臨界水抽出/SPME法の優位性を鵜呑みにすることの危険性がうかがえる。2つ目はSIのピーク面積の得られにくさが、特にブランク試験において顕著であった点で、土壌抽出液からは良好に全てを検出できるが、ブランク試験では検出できないという傾向がみられた。門上希和夫らの研究⁹⁾によると炭酸カリウムを飽和量添加することでNaClに比べSPMEへの抽出率が40~80倍向上するとの報告がある。この報告から、土壌中からの抽出液には様々なイオンや有機物等が含まれており、塩析効果によってSPMEへの抽出率が増加するが、逆に水からの抽出液にはこのような物質が含まれていないため、SPMEファイバーへの吸着力があがらなかったのではないと思われる。このようにいくつかの問題点を抱えた亜臨界水/SPME抽出法は、その測定法としての感度が非常に悪い可能性を否定できない。

4. フィールド調査

4. 1 土壌採取条件

2. で求めた最適条件での超臨界CO₂/SPME法を実際の環境サーベイに使用した場合の有効性を見るため、フィールド調査を行なった。1. 序論で述べたように、本研究では京都市内の児童公園土壌を試料採取地点とした。夏の土壌採取は2002年8月12~25日に行ない、冬の土壌採取は2003年1月30~31日に行なった。冬の土壌採取では、前日まで雪が降っていたため、表層の土壌は多少湿っていたが、2mmのふるいを通らないほどではなかったため、採取を続けた。夏のサンプリング時の平均気温は30.4℃(標準偏差1.9℃)、冬のサンプリング時平均気温は3.8℃(標準偏差1.1℃)であった。

4. 2 試料採取方法

試料の採取にあたっては、可能な限り公園中央部10m四方程度の裸地で落ち葉や草木等で覆われていない

Table 8 Detection Limit of the measuring objects

measuring objects	Quantitation Limit($\mu\text{g/g}$)
Naphthalene	2.3×10^{-5}
Benzothiazole	1.9×10^{-3}
2-Methylnaphthalene	2.8×10^{-4}
1-Methylnaphthalene	2.8×10^{-4}
Biphenyl	3.5×10^{-4}
Dimethylnaphthalene	1.5×10^{-5}
Acenaphthene	2.8×10^{-5}
Dibenzofuran	1.6×10^{-5}
Fluorene	2.0×10^{-5}
Phenanthrene	3.1×10^{-5}
Anthracene	2.3×10^{-5}
DBP	1.3×10^{-3}
DEHP	3.3×10^{-3}
Fluoranthene	2.2×10^{-5}
Pyrene	1.5×10^{-5}
Chrysene	2.5×10^{-5}

場所を選定した。表層に落ち葉、枯れ枝等の被覆物がある場合にはそれらを除去し、表面積約 30×30cm の地点の土壌から、表層の砂質土壌を含め深さ 0.5cm 程度までの土壌をできるだけ均一に採取する。さらにその場で、採取した土壌から中小礫、木片、植物残渣等を取り除き、孔径 2mm のふるいにかけた。ふるいにかけた土壌はさらに数回にわたってよく攪拌した。なお、採取に使用した採土用具は金属製のものとし、採取にあたっては、他地点の採取時に付着した土壌等を完全に除去した。こうして採取した土壌は広口瓶（広白試薬瓶 60mL）に収めるが、このときに広口瓶の口の部分に付着した土壌はキムワイプで拭い、できるだけ密閉性が高い状態にて蓋をし、保冷剤で冷やしながらか運んだ。本研究では夏期にサンプリングを行ったが、分析を行った冬まで長期保存をさせるため、-80℃の冷凍保存を施した。ただし、分析を行う約2週間前にこの保存に使用した超低温フリーザーが作動しなくなったため別の超低温フリーザーに移し替え、-20℃で冷凍保存を続けた。また、冬に行ったサンプリング土壌については、同様に採取し、こちらについては最初から-20℃にて冷凍保存し、できるだけ速やかに測定を行った。

4. 3 土壌特性の測定法

(1) 粒度分布の測定

採取した表層土壌を 2.0mm メッシュのふるいで振った後に、その 10g について、1.4、1.0、0.5、0.35、0.15mm メッシュで順次振り、各ふるいを通過した土壌重量を測定し、2.0mm 以下の粒子の全量 10g に対する重量百分率を求めた。

(2) 強熱減量の測定

強熱減量について「ダイオキシン類に関わる土壌調査測定マニュアル」⁹⁾（平成 12 年 1 月付環境庁水質保全局土壌農業課通達）記載の測定方法に基づき、試料 5g 以上をはかり取り、600±25℃で約 2 時間強熱後秤量し、その重量差から強熱減量を算出した。

4. 4 解析

(1) 夏と冬の濃度比較

Fig.3 に各有機化学物質濃度の季節変化を示す。図中のプロットは上端が 75 パーセンタイル値、中央のプロットが平均値、下端が 25 パーセンタイル値である。ほとんどの化学物質に対して冬平均値>夏平均値、冬中央値>夏中央値の関係が得られた。これは夏の気温が高く、乾燥していたため、有機化学物質が揮発した、あるいは夏から冬の間に土壌への蓄積が進んだなどの原因が考えられる。一方、2-メチルナフタレンと1-メチルナフタレン、ジメチルナフタレン、DBP に関しては逆の結果が得られた。これらの物質は他の化学物質が水へ溶解しない、もしくはほとんど水への溶解性を示さないのに対し、それぞれ溶解度が 2-メチルナフタレン:0.03g/l(25℃)、1-メチルナフタレン:0.03g/l(25℃)、DBP:0.112g/l (25℃)、またジメチルナフタレンは異性体によって異なるが 1,3-ジメチルナフタレンで 0.008g/l、2,6-ジメチルナフタレンで 0.002g/l と比較的高い値を示す。

冬のサンプルは採取日前日まで雨と雪が降っていた。このため土壌を水が浸透することにより下層へと流さ

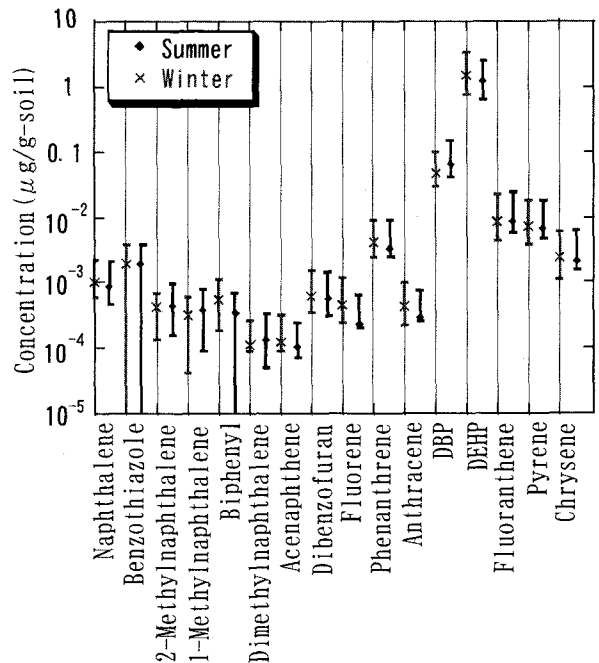


Fig. 3 Comparison of the concentration of Summer and Winter

れてしまい、このため夏の濃度よりも低く測定された可能性も考えられる。しかし全体として図を見てみると、季節変化は上記のように各化学物質に対し夏・冬ともに比較的似た値となり、季節によって急激に汚染が増えるといった傾向は見られなかった。

(2) 粒度分布および強熱減量と土壌中有機物質濃度との相関

土壌中の汚染物質の濃度を表すとき、多くの場合、乾燥土壌の単位質量あたりの汚染物質で示される。しかしながら、汚染物質が土壌粒子の特性（粒径、含水率、全炭素量、強熱減量等）に応じて吸着・蓄積している可能性も考えられる。長谷川の研究¹⁰⁾ではある地点での土壌から粒径別濃度を求めた場合、粒径と各濃度との間に明らかな相関関係が認められたとしている。例として Fig.4 に長谷川が求めた粒径別表層土壌のナフタレン汚染濃度を示す。また、強熱減量は底泥・土壌等の有機含有量を表す量と考えられる。

そこで、本研究では、夏に採取した児童公園の土壌について、4. 3の方法により算出した中央径および強熱減量が測定有機物質の濃度との間に相関があるかを調べた。なおここでは、本研究中ほぼ土壌中濃度が検出限界下であった2-メチルナフタレン、1-メチルナフタレン、ピフェニルは除外して考えることにする。

Fig.5 にDBP、ピレンの土壌中濃度 ($\mu\text{g/g}$)、Fig.6 に中央径(mm)の対数正規分布プロットを示す。他の対象物質についても Fig.5 と同様の分布が見られた。土壌中濃度、中央径ともに対数正規分布に近かったので、これらの対数を取り、無相関のt検定を行った。Table 9 は各有機化学物質との間の単相関係数をとったものである。

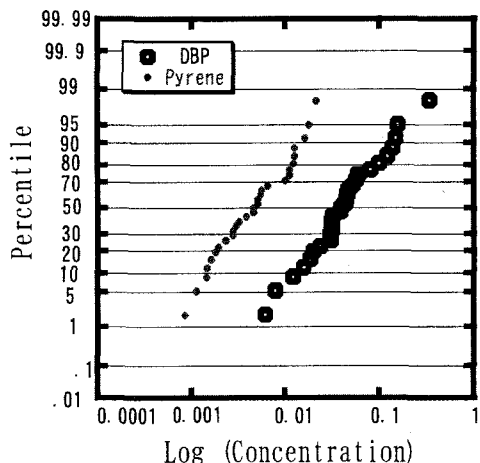


Fig. 5 Normal distribution plot of the concentration in the soil

無相関のt検定を行い、帰無仮説（母集団の相関が0（全くない））が有意水準1%、5%で棄却されるかを調べた。1%で棄却されるなら99%の相関があるといい、5%で棄却されるならば95%相関があるという。（正確には相関がないとは言えないことを示している）

その結果、PAE、特にDEHPは強熱減量との相関が見られPAHには強熱減量との相関が見られなかった。

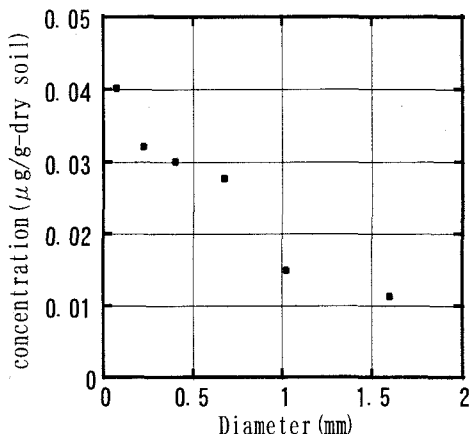


Fig. 4 Change of naphthalene concentration depending on particle size of ground soil

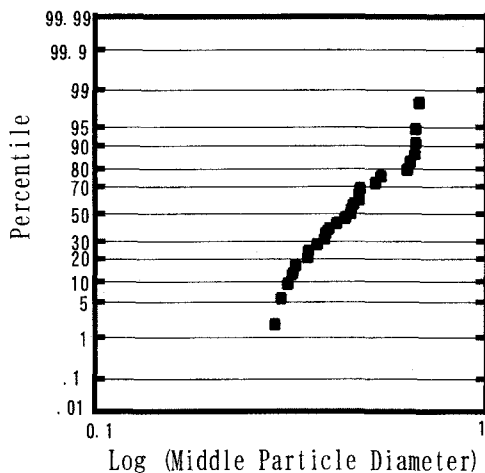


Fig. 6 Normal distribution of Middle Particle Diameter

Table 9 Simple Correlation Coefficient between Organic Chemicals and ignition Loss or Middle particle Diameter

27case

	Naphthalene	Dimethylnaphthalene	Dibenzofuran	Fluorene	Phenanthrene	DBP	DEHP	Fluoranthene	Pyrene	Chrysene	Ignition Loss	Middle Particle Diameter
Naphthalene	1.00	0.54	0.63	0.75	0.25	0.72	0.59	0.77	0.46	0.13	-0.42	
Dimethylnaphthalene	0.54	1.00	0.56	0.53	0.59	0.42	0.62	0.52	0.24	0.12	-0.57	
Dibenzofuran	0.63	0.56	1.00	0.73	0.86	0.60	0.69	0.66	0.44	0.08	-0.46	
Fluorene	0.75	0.53	0.73	1.00	0.79	0.71	0.82	0.73	0.36	0.19	-0.41	
Phenanthrene	0.25	0.59	0.86	0.79	1.00	0.61	0.68	0.82	0.53	0.12	-0.49	
DBP	0.72	0.42	0.60	0.71	0.61	1.00	0.78	0.71	0.25	0.33	-0.51	
DEHP	0.59	0.62	0.69	0.82	0.68	0.78	1.00	0.62	0.14	0.10	-0.46	
Fluoranthene	0.77	0.52	0.66	0.73	0.82	0.71	0.62	1.00	0.60	0.08	-0.48	
Pyrene	0.46	0.24	0.44	0.36	0.53	0.25	0.14	0.53	1.00	-0.33	-0.30	
Chrysene	0.13	0.12	0.08	0.19	0.12	0.33	0.10	0.08	-0.33	1.00	0.26	
Ignition Loss	-0.42	-0.57	-0.46	-0.41	-0.49	-0.51	-0.46	-0.48	-0.30	0.26	1.00	
Middle Particle Diameter												

99%related

95%related

一方、中央径に関してはDEHPは相関が見られなかったがPAHやDBPには中央径と負の相関が見られ、これは粒径の小さなものほど有機物質が多く存在していることを示しており長谷川の研究結果と合致する結果となった。この結果より、特にDEHPとPAHの汚染源や汚染経路が異なるのではないかと推測される。例としてFig.7に三井²⁾が求めたPAHやDBP濃度と道路からの距離との関係を示す。

PAHと道路からの距離の間に明らかに相関が見られ、道路から遠ざかるにつれその濃度が減少したことから、PAHは自動車の走行に伴って発生したものであると考えられる。DBPとDEHPの測定結果では、道路から遠方は比較的濃度が減少することから、やはり自動車なども汚染源の一つであると考えられる。DEHPについては道路からの距離が増加するにつれて濃度は減少傾向を示しているが、他のPAH、DBPほどの強い相関は見られず、自動車以外の発生源からの寄与も考えられ、ガス状物質の吸着による汚染などである可能性が考えられる。

なお、これらの結果が得られたことにより、本研究で提案した超臨界CO₂/SPME法は超音波抽出/SPME法、亜臨界面水/SPME法と比較しても有効に各有機物質の土壤中濃度を測定できたのではないかと考えられる。

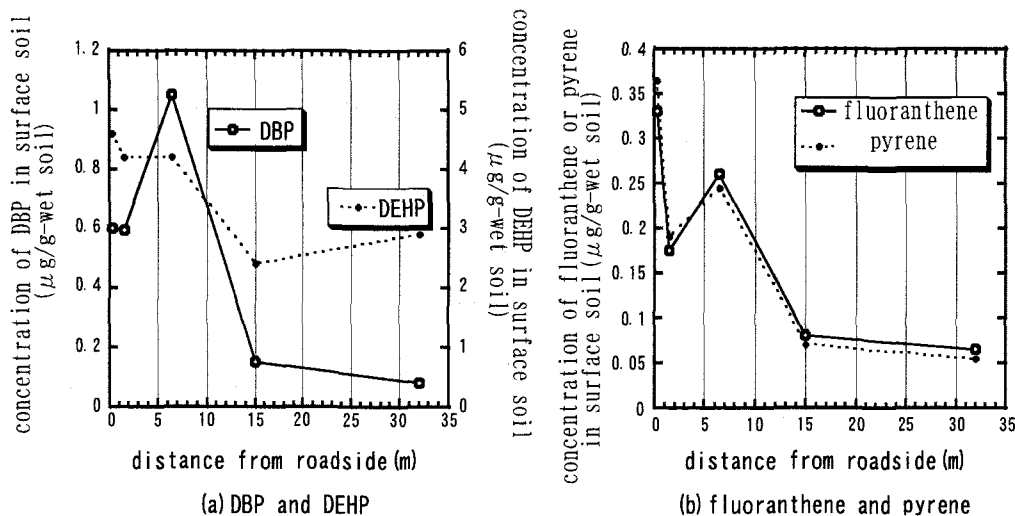


Fig. 7 Change of the concentraiton in surface soil according to the distance from roadside

5. まとめ

本研究では、土壌中の有機化学物質の比較的簡単かつ安全で環境にもやさしい測定方法として超臨界CO₂抽出とSPME抽出を組み合わせた方法について検討した。その手順として、

- 1) 土壌 20g にガラスビーズを添加し、これに内標準物質のアセトン溶液を添加。

- 2) 超臨界 CO₂ とともにモディファイアとしてアセトニトリルを流量 0.05ml/min で添加
 - 3) 1 時間の抽出時間の後、得られたアセトニトリル抽出液から 1ml を量り取り、10%の NaCl 水溶液でメスアップ。
 - 4) これに SPME ファイバーを直接浸漬させることにより測定対象物質を抽出後、GC/MS 測定。
- という方法を採用し、最適な測定条件についての検討を行った。

まず第一に、できるだけ少量のエタノール等の有機溶媒を用いた場合に SPME への抽出率が減少あるいは無視できる程度となる傾向が見られたが、溶媒としてアセトニトリルを用い、10%NaCl 水溶液で 10 倍に希釈することによって十分な抽出率を得ることが確認された。

また、超臨界 CO₂ 抽出の条件にアセトニトリルを 0.05ml/min 用いることによって用いない場合の約 4 倍の抽出力を得ることを確認し、またこの流量は 0.25ml/min と増やした場合には抽出率が低下することが分かった。よって本研究ではアセトニトリルをモディファイアとして流量 0.05ml/min 加える条件を採用した。しかし、アセトニトリルは有毒性であるため、アセトニトリル以外の毒性のより少ない、また環境への負荷がより少ない有機溶媒をモディファイアとして用いた最適条件をみつけることが今後の課題といえる。

超臨界 CO₂ の抽出時間を 80 分にとり、その時点での抽出量を安定同位体の添加により評価することで算出した抽出率は 8 割を超えた。この抽出率を、超音波抽出法及び亜臨界水抽出/SPME 法での抽出率との比較により評価した。その結果、ほぼ超音波抽出法と同等かそれ以上の抽出率を得たが、亜臨界水抽出/SPME 法の抽出力には及ばなかった。しかし、亜臨界水抽出/SPME 法の有効性の評価については検討を要する部分が多く残っている。また、超臨界 CO₂ 抽出の抽出時間としても時間が長過ぎると思われ、抽出条件についても今後検討を加えて最適条件を見出す必要がある。

さらに本測定法を用いて京都市内 29 ヶ所の児童公園について夏と冬の 2 回土壌採取を行ない測定を行なった。その結果、測定有機物質についての季節による急激な濃度変化は見られなかった。強熱減量及び中央径と濃度との相関を調べたところ、DEHP については強熱減量との間に相関が見られ、PAH については中央径との相関が見られた。このことより、それぞれ異なる汚染源や汚染経路により汚染が生じたのではないかと考えられ、今後汚染源を特定するための測定調査を行う必要がある。

(参考文献)

- 1) 平成 13 年度版「化学物質と環境」環境省 総合環境政策局 環境保健部 環境安全課
- 2) 三井昌文、島田明彦、米田稔、森澤眞輔、SPME を用いた PAH 及び PAE による土壌汚染調査、環境工学研究論文集、第 37 巻、287-298、2000
- 3) 長浜邦雄、鈴木功、「食品への超臨界流体応用ハンドブック」、SCIENCE FORUM 2002
- 4) 新井邦夫、佐古猛、福里隆一、鎗田孝、超臨界流体の環境利用技術、エヌ・ティー・エス 1999
- 5) 小田淳子：相対保持時間指標を用いるキャピラリーガスクロマトグラフィー/質量分析法による大気粉じん中の多環芳香族炭化水素の分析 BUNSEKI KAGAKU Vol. 45.No.9.pp.825~835、1996
- 6) Kimberly J. Hageman : Coupled Subcritical Water Extraction with Solid-Phase Microextraction for Determining semivolatile Organics in Environmental solids Analytical Chemistry.Vol.68, No.22.November 15、1996
- 7) Steven B. Hawthorne : Simple method for estimating polychlorinated biphenyl concentrations on soils and sediments using subcritical water extraction coupled with solid-phase microextraction Journal of Chromatography A,814 151-160(1998)
- 8) 門上希和夫：固層マイクロ抽出/ガスクロマトグラフィー/質量分析法による水環境中の水溶性アルコールの定量 BUNSEKI KAGAKU Vol.45 .No.11.pp.10013~1018(1996)
- 9) 環境庁水質保全局土壌農薬課：ダイオキシン類に係る土壌調査測定マニュアル 2000
- 10) 長谷川貴之：表層土壌の環境汚染指標としての利用可能性、京都大学大学院工学研究科環境地球工学専攻修士論文、1999