

ノート*

蛍光検出 HPLC を用いるタバコ煙粒子中多環芳香族炭化水素の定量

鳥羽 陽^{®1}, 本間 千春¹, 宇於崎和香¹, Thanyarat CHUESAARD², 唐 寧¹, 早川 和一¹

1 緒 言

多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAH) は、有機物の不完全燃焼によって生成し、ディーゼル排ガスや石炭燃焼粉じん、タバコ煙中に含まれ、大気汚染や健康影響の観点から多くの研究が行われている¹⁾。PAH には強い発がん性/変異原性を示す化合物があり、国際がん研究機関 (IARC) は、いくつかの PAH を発がん性がある、または疑われる物質として分類してきた²⁾。10 種類の高分子量 (4~6 環) の PAH が取り上げられ、最も代表的なベンゾ[a]ピレン (BaP) は、発がん性があるとしてグループ 1 に分類されている。これまで BaP の活性代謝物が DNA に結合することにより、発がん性を示すと考えられていたが、最近では、そのフリーラジカル生成能による発がん性も疑われている³⁾。また、IARC ではタバコ煙自体、喫煙や受動喫煙といった行為もグループ 1 に分類している⁴⁾。一方、米国環境保護局 (US EPA) は、発がん性あるいは他の毒性の観点から優先して監視すべき PAH として 16 物質 (2~6 環) を指定し、発がん性を有する PAH については IARC で取り上げられている PAH とかなりの部分で共通している⁵⁾。

タバコ煙は、非常に多くの物質の混合物であり、発がん性の PAH やヘテロサイクリックアミンを含む 4700 種を超える化学物質を含んでいる⁶⁾。タバコ煙中には 10 種類程度の発がん性 PAH と 53 種の PAH 以外の発がん性物質が存在している⁴⁾。PAH の中で特に発がん性の強い PAH はガス相よりも粒子相に分布⁷⁾しており、副流煙 (SS) 中の PAH 濃度は主流煙 (MS) より 10 倍高く、副流煙は室内空気中 PAH の主要な発生源となっていることが報告されている⁸⁾。

タバコ煙中の PAH 分析には、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS)^{9)~12)}、蛍光検出高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (HPLC-FL)¹³⁾、HPLC-タンデム質量分析計 (HPLC-

MS/MS)¹⁴⁾ が用いられてきたが、GC-MS による測定が大部分を占めている。HPLC-FL は、カナダの公定法として BaP の測定に採用されている。GC-MS による PAH の検出限界 ($S/N > 3$) は、おおよそ 10 pg (BaP では 6 pg)¹⁵⁾ で、かなり普及した装置ではあるが、装置の価格、高頻度の MS イオン源のクリーニングの煩雑さ、キャリアーガスであるヘリウムの昨今の入手の困難さ、装置の普及という点を考慮すると HPLC にも優位性があると言える。タバコ煙中の PAH 分析において、GC-MS 以外の選択肢の一つとして HPLC 法は有望であるが、現在のところ BaP の測定に用いられているだけで、多成分同時分析が可能な PAH 分析法は定着していない。そこで本研究では、US EPA が指定する 16 種の PAH のうち 15 種について、重水素化 PAH を内部標準物質として用いる HPLC-FL によるタバコ煙粒子中 PAH の分析法を開発した。

2 実 験

2.1 試薬及び溶媒

US EPA 610 PAH Mix (シグマアルドリッチ製) に含まれる、EPA が指定する 16 種のうち 15 種の PAH、すなわちナフタレン (Nap)、アセナフテン (Ace)、フルオレン (Flu)、フェナントレン (Phe)、アントラセン (Ant)、フルオランテン (Flu)、ピレン (Pyr)、ベンゾ[a]アントラセン (BaA)、クリセン (Chr)、ベンゾ[b]フルオランテン (BbF)、ベンゾ[k]フルオランテン (BkF)、BaP、ジベンズ[a,h]アントラセン (DBahA)、ベンゾ[ghi]ペリレン (BghiP)、インデノ[1,2,3-cd]ピレン (IDP) を測定対象とした。アセナフテンは蛍光性がないため、測定対象からあらかじめ除外した。内標準物質 (IS) として 7 種類の PAH の重水素化体、すなわちなフタレン- d_8 (Nap- d_8)、アセナフテン- d_{10} (Ace- d_{10})、フェナントレン- d_{10} (Phe- d_{10})、アントラセン- d_{10} (Ant- d_{10})、ピレン- d_{10} (Pyr- d_{10})、ベンゾ[a]アントラセン- d_{12} (BaA- d_{12})、及びベンゾ[a]ピレン- d_{12} (BaP- d_{12}) は和光純薬工業製を使用した。HPLC 用アセトニトリルは関東化学製を、その他の溶媒については和光純薬工業製を使用した。超純水は日本ミリポア製の Milli-Q システムより採水したものを使用した。

* 年間特集「空」

[®] E-mail: toriba@p.kanazawa-u.ac.jp

¹ 金沢大学医薬保健研究域薬学系: 920-1192 石川県金沢市角間町

² 金沢大学大学院自然科学研究科環境科学専攻: 920-1192 石川県金沢市角間町

2・2 タバコ煙の捕集と前処理

ケンタッキーリファレンスシガレット 3R4F (標準タバコ 3R4F), マルボロ (フィリップモリス製) 及びマイルドセブンオリジナル (現: メビウス, JT 製) について, 自動喫煙装置を用いて ISO 4387 及び 3308 の捕集方法¹⁶⁾¹⁷⁾に準拠して主流煙及び副流煙をガラス繊維フィルターに捕集した. 喫煙方法は, 吸煙時間 2 秒間に吸煙量 35 mL 回⁻¹, 吸煙間隔を 1 分とし, 1 本あたり 8~10 回吸煙した. 5 本分のタバコ煙を 1 枚のフィルターに捕集し, 各フィルターをジクロロメタン (DCM) 15 mL で超音波抽出した. 主流煙については粒子状成分 2 mg 相当の抽出物について, 副流煙については 0.1 mg 相当について PAH の分析を行った. それぞれの抽出液に 7 種類の IS を添加した後, ヘキサンで希釈して DCM/ヘキサン (5/95, v/v, 以降 5 % DCM と表記) の組成とし, DCM とヘキサンの混液で以降の操作を行った. 希釈した抽出溶液 (10 mL) を, ジクロロメタン及び 5 % DCM でコンディショニングした Sep-Pak Silica (690 mg, Waters 製) と Sep-Pak Alumina-N (1710 mg) を直列に連結させた固相カートリッジに流した. さらに 5 % DCM (5 mL) で洗いこんだ後に 10 % DCM (15 mL) でカートリッジから溶出させ, 続いて 35 % DCM (15 mL) で溶出させた. 5 % 及び 10 % DCM 相を混合して溶出画分 ① (Fraction 1) とし, 35 % DCM 相を溶出画分 ② (Fraction 2) とした. それぞれの画分にジメチルスルホキシド (DMSO) 20 μ L を添加してから DMSO のみ残存する状態まで減圧濃縮し, Fraction 1 についてはアセトニトリル (480 μ L) を加え, Fraction 2 については 80 μ L 加えてからそれぞれ 20 μ L を HPLC に注入した.

2・3 HPLC

HPLC システムを構成する装置は, すべて島津製作所製 (Nexera) を用い, ポンプ (LC-30AD), オートサンプラー (SIL-30AC), デガッサー (DGU-20A), カラムオープン (CTO-20AC), システムコントローラ (CBM-20A), 蛍光検出 (RF-20A XS) から構成した. 得られたデータは, LabSolutions により解析した. HPLC 用カラムは Inertsil ODS-P (3.0 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m, GL Sciences 製) 及びそのガードカラム (3.0 mm i.d. \times 10 mm) を用い, カラム温度を 20 $^{\circ}$ C とした. 移動相は A: 水と B: アセトニトリルのグラジエント溶離 [0~10 分, B: 55 %, 10~17 分, B: 70~90 % (linear), 17~35 分, B: 100 %, 35~45 分, B: 55 %] を行い, 流速は 0.8 mL min⁻¹ とした. 測定対象 PAH の検出波長は既報¹⁸⁾に従って各 PAH の最適励起・蛍光波長とし, 保持時間に合わせて変化させた. また, 2 波長同時測定を行い, Pyr を除く PAH をチャンネル 1 で, Pyr をチャンネル 2 で記録した.

3 結果と考察

3・1 固相抽出の検討

PAH を分析するためのタバコ煙抽出物の前処理では, フィルターを極性の高い有機溶媒 (メタノール) で抽出した後に水を加えて有機溶媒含量を低下させてから逆相系 (C₁₈) 固相抽出を実施し, さらにシリカゲルによる順相系固相抽出で生成する例が多い⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾. しかしながら過剰な水を抽出液に加えることで抽出成分が析出する可能性があり, また固相に流す試料の体積が増加して操作が煩雑になりやすい. 一方, フィルターをシクロヘキサンで抽出した後での順相系の固相抽出では, シリカゲルやアミノプロピルシリカが用いられてきた¹³⁾¹⁴⁾が, 蛍光検出に対する精製度として十分ではなかった. 燃焼由来の粉じんや大気粉じんのフィルター試料について, 順相系の固相 (シリカゲル + アルミナ) を使用した 2 段階精製を行っている例が多い¹⁹⁾²⁰⁾ ことから, 本研究では, 市販の固相カートリッジ (Sep-Pak Silica 及び Alumina-N) を組み合わせてタバコ煙抽出物を精製した. シリカゲルカートリッジについて PAH の溶出を確認したところ, PAH はほとんど保持されずにヘキサン及び 10 % DCM 溶液中にすべての PAH が溶出した (Fig. 1). この溶出条件では, 極性物質の除去には有効であるが, 芳香族化合物以外の低極性物質の除去は困難である. 中性アルミナは飽和炭化水素と芳香族炭化水素を分離精製²¹⁾できることが知られており, シリカと中性アルミナの組み合わせにより高い精製が期待できる. 次に, 中性アルミナについて PAH の溶出を確認したところ, 2, 3 環の PAH, 4 環の Pyr, BaA, Chr はヘキサン及び 10 % DCM にほとんど溶出し, BbF, BkF 及び 5, 6 環の PAH は 35 % DCM に溶出した (Fig. 1). この結果からシリカと中性アルミナのタンデム固相による前処理を考案した. シリカと中性アルミナのカートリッジを直列につないだ状態で試料溶液及び 5 % DCM 洗浄液をロードし, 10 % DCM で溶出してロード液及び溶出液を合わせて Fraction 1 とした. 次に 35 % DCM を通液することで Fraction 2 を得た. Fraction 1 と Fraction 2 を別々に濃縮して分析することとした. フィルター抽出液を固相にロードするために DCM からヘキサンに転溶する必要があるが, 抽出液の乾固により揮発性の高い Nap の回収率が低下する恐れがある¹⁸⁾. そこで本研究では, 抽出液を乾固してヘキサンに再溶解するのではなく, 分析対象である粒子状成分を溶解する DCM-ヘキサン混合溶媒で試料調製した. すなわち, DCM によるフィルター抽出液を DCM 含量が 5 % となるようにヘキサンで希釈してから固相カートリッジにロードした. タンデム固相における PAH の挙動は中性アルミナにおける保持挙動と一致し, 二つの画分に PAH の環数によって大まかに分離された. しかしながら, 単体のカートリッジの結果に反して

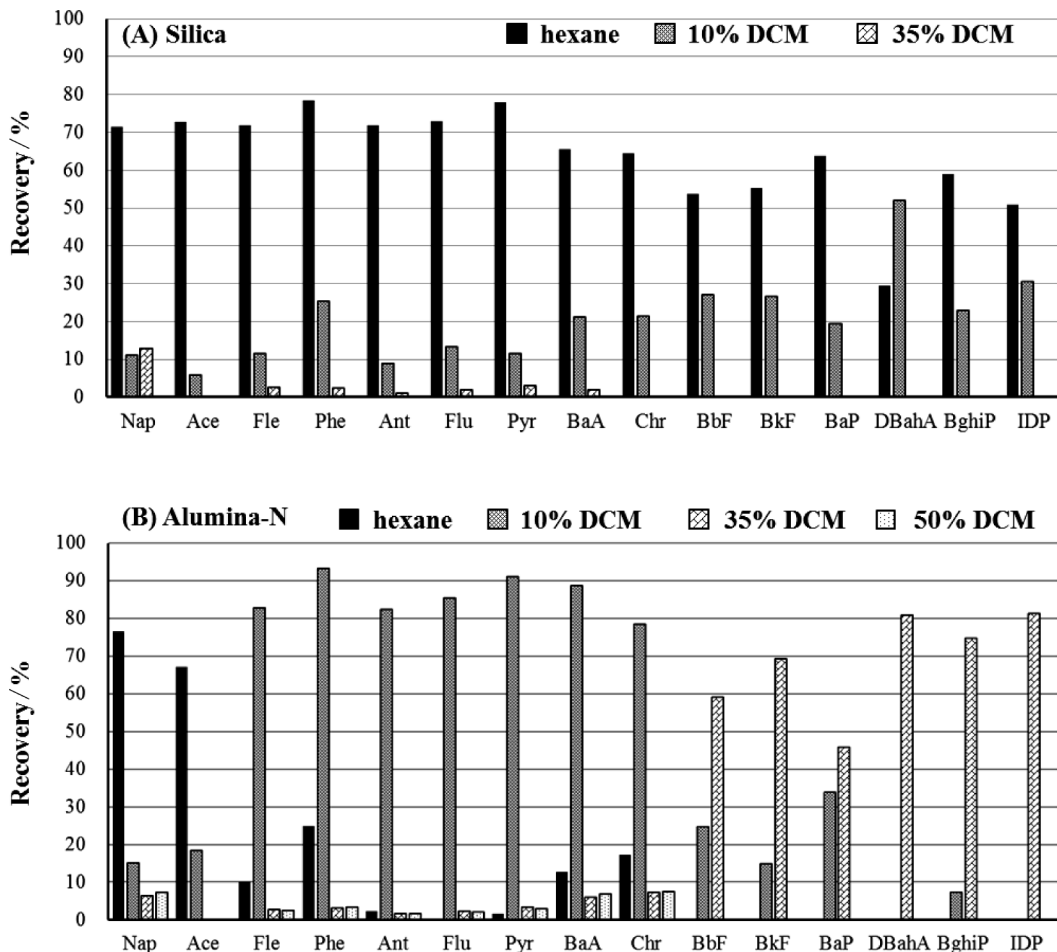


Fig. 1 Elution profiles for PAHs with (A) silica and (B) Alumina-N SPE cartridges

BaA と Chr は Fraction 2 にも溶出が認められた。また、得られた各 PAH 及び IS としての重水素化体の回収率は、Fraction 1 及び Fraction 2 の合計で 80 % 以上であり、実試料への適用が可能であると判断した。

3.2 クロマトグラム

測定対象とした 15 種 PAH 標準物質のクロマトグラムを Fig. 2 (A) に示す。分析対象の 15 種 PAH 及び 7 種の IS について、グラジエント溶出により 35 分で分離することができた。PAH の重水素化体の化学的性質は被検体に最も近く IS として最適であるが、同一の蛍光特性を有するために検出器では区別できず、カラム分離を行う必要がある。ポリメリックタイプの ODS カラムの使用により重水素化 PAH が非標識体の直前に溶出し、分離できることが報告されており、PAH の定量の際に重水素化 PAH が IS として用いられている¹⁸⁾²²⁾。Pyr については、Flu と保持時間が近接しており、波長切り替えが困難であることから、チャンネル 2 で同時検出した。注入量あたりの検出限界 ($S/N = 3$) は、Ant の 0.24 pg から IDP の 2.2 pg の範囲であり、本研究で得られた検出限界及び定量限界は従来報告されている蛍光

検出による報告よりも 10 倍以上高感度¹⁸⁾であるが、蛍光検出器自体の改善によるものと考えられ、多くの PAH について GC-MS よりも高感度に検出できた⁹⁾¹⁵⁾。このことは、優れた前処理の適用により、蛍光検出でも質量分析に劣らない結果が得られることを示している。実際のタバコ煙抽出物を分析した際の代表的なクロマトグラムを Fig. 2 (B) に示した。Nap から Pyr までの 2~4 環 PAH が Fraction 1 に検出され、4~6 環の PAH が Fraction 2 に検出された。また、夾雑ピーク^{きょう}に妨害されることなく各 PAH の同定を行うことができたが、Phe- d_{10} (IS-3) は夾雑ピークと重なって添加量以上のピークが観察されたことから、IS から除外した。

3.3 定量性とバリデーション

定量に用いた 6 種類の IS は、以下のように使用した [Nap- d_8 (Nap の定量), Ace- d_{10} (Ace, Fle の定量), Ant- d_{10} (Phe, Ant の定量), Pyr- d_{10} (Flu, Pyr の定量), BaA- d_{12} (BaA, Chr の定量), BaP- d_{12} (BbF, BkF, BaP, DBahA, BghiP, IDP の定量)]。PAH 標準物質の検量線の直線性は、注入量あたり最少量が 0.5 ~ 10 pg で、最大量が 200 ~ 2000 pg の範囲

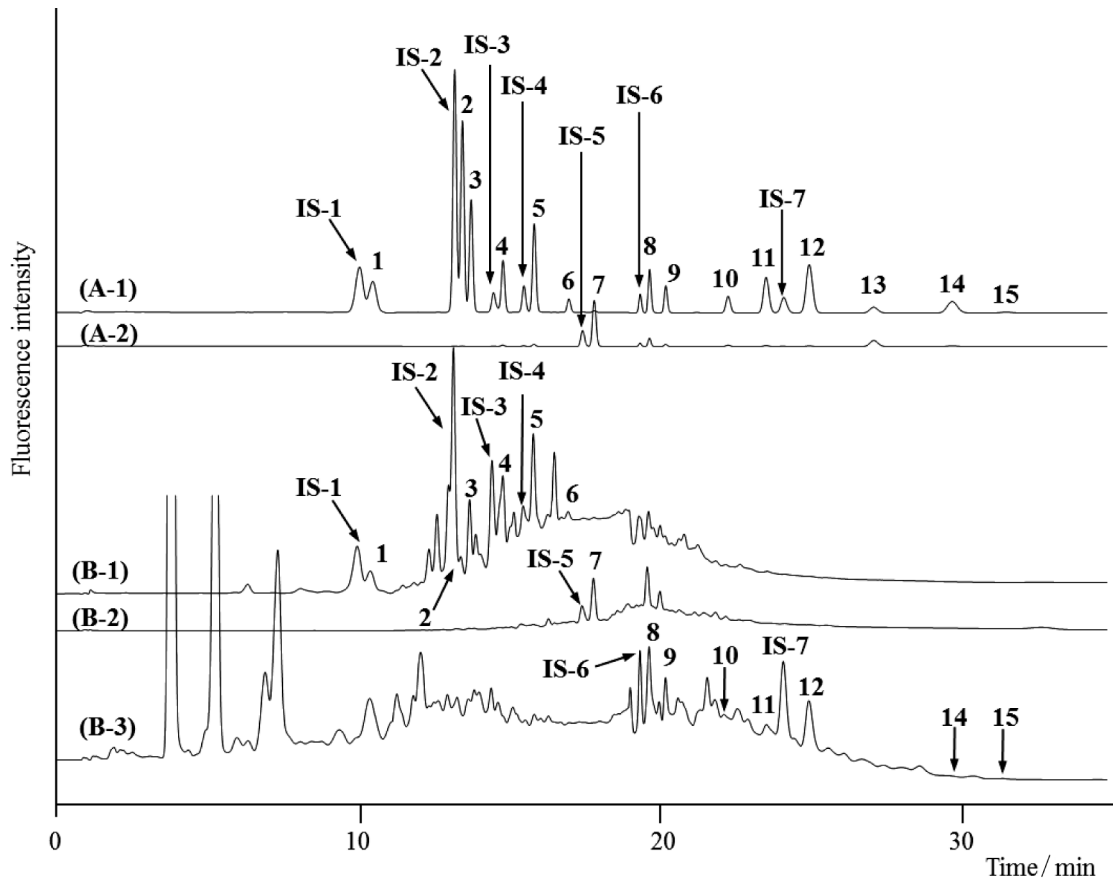


Fig. 2 Chromatograms of (A) a standard solution of 15 PAHs and 7 internal standards prepared from EPA 610 polynuclear aromatic hydrocarbons mix (Sigma-Aldrich) and (B) representative chromatograms of a cigarette smoke sample. Chromatograms (A-1) and (A-2) were obtained from wavelength settings of the channel (CH) 1 and CH 2 for the standard solution. Chromatograms (B-1 and -2) and (B-3) were from CH 1 and 2 for the fraction 1 and CH 1 for fraction 2 of a real sample, respectively. Each peak of PAHs corresponds to: 1, Nap; 2, Ace; 3, Fle; 4, Phe; 5, Ant; 6, Flu; 7, Pyr; 8, BaA; 9, Chr; 10, BbF; 11, BkF; 12, BaP; 13, DBahA; 14, BghiP; 15, IDP. IS-1, IS-2, IS-3, IS-4, IS-5, IS-6 and IS-7 indicate Nap-*d*₈, Ace-*d*₁₀, Phe-*d*₁₀, Ant-*d*₁₀, Pyr-*d*₁₀, BaA-*d*₁₂ and BaP-*d*₁₂, respectively. The detection wavelength programs were as follows: (CH 1) 0–15.3 min, excitation (Ex) 280 nm, emission (Em) 340 nm; 15.3–16.85 min, Ex 250 nm, Em 400 nm; 16.85–19 min, Ex 286, Em 433 nm; 19–30.9 min, Ex 264, Em 407 nm; 30.9–35 min, Ex 294 nm, Em 482 nm; (CH 2) 0–35 min, Ex 331 nm, Em 392 nm. The other HPLC conditions were the same as those described in the Experimental section.

で良好な直線性を示し ($r^2 > 0.999$), タバコ煙抽出物に PAH を添加した際に得られた検量線の傾きとほとんど変化がなかった. 定量下限 ($S/N = 10$) は Ant の 0.073 pg から IDP の 7.5 pg の範囲であった. タバコ煙中 PAH 測定のパリテーションの結果を Table 1 に示す. 主流煙抽出物に既知量の PAH を添加して前処理を行ってから定量した. 分析精度 ($n = 5$) は相対標準偏差 0.68~10%, 真度 Accuracy ($n = 5$) は 85~111% であり, 測定対象とした 15 種の PAH について十分な定量性を得ることができた. Phe については, 固相カートリッジ由来のピークが観察されたが, タバコ煙抽出物のピークに対して 2% 程度であり, 定量に影響しなかった.

3.4 タバコ煙粒子中 PAH の定量

標準タバコ 3R4F, マルボロ及びマイルドセブンの主流煙及び副流煙中の粒子状物質 (TPM) 濃度及び PAH 濃度を Table 2 に示す. 3 銘柄の主流煙中の PAH 濃度範囲は, 0.2~305 ng cigarette⁻¹ で, 副流煙のそれは 26.4~6160 ng cigarette⁻¹ であった. 主流煙中の PAH 濃度は, 2, 3 環 PAH が 4~6 環 PAH より濃度が高く, 特に Nap, Fle 及び Phe の濃度が高かった. この傾向は, これまでの報告とも一致⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾している. 主流煙及び副流煙に共通して最も濃度の高かった Fle は, 尿中に排泄される Fle の代謝物が非喫煙者よりも喫煙者で著しく高濃度で排泄されることが報告されている²³⁾. 本研究で分析した 3 銘柄について, 銘柄間で検出できる PAH は共通で濃度差も小さく, 各 PAH 濃度の高低も似通っており, 銘柄やフィルターの違いがタバコ

Table 1 Precision and accuracy in the determination of PAHs in cigarette smoke samples ($n = 5$)

	Nap		Ace	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	24.6	0	24.6
Found ± SD/ng mg ⁻¹	15.0 ± 0.34	37.6 ± 0.62	0.89 ± 0.03	25.1 ± 0.21
RSD/%	2.2	1.7	3.3	0.83
Accuracy/%	—	92	—	99
	Fle		Phe	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	29.4	0	28.7
Found ± SD/ng mg ⁻¹	17.3 ± 0.32	49.6 ± 1.16	48.6 ± 0.29	78.8 ± 1.43
RSD/%	1.8	2.3	0.59	1.8
Accuracy/%	—	110	—	105
	Ant		Flu	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	2.5	0	4.9
Found ± SD/ng mg ⁻¹	2.3 ± 0.03	5.0 ± 0.11	2.6 ± 0.10	7.4 ± 0.45
RSD/%	1.2	2.2	3.8	6.0
Accuracy/%	—	110	—	98
	Pyr		BaA	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	2.5	0	2.5
Found ± SD/ng mg ⁻¹	2.0 ± 0.05	4.7 ± 0.11	1.1 ± 0.06	3.3 ± 0.06
RSD/%	2.6	2.3	5.6	1.7
Accuracy/%	—	111	—	89
	Chr		BbF	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	2.5	0	4.9
Found ± SD/ng mg ⁻¹	0.7 ± 0.03	2.8 ± 0.05	0.2 ± 0.02	4.3 ± 0.07
RSD/%	3.9	1.7	10	1.8
Accuracy/%	—	86	—	85
	BkF		BaP	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	2.5	0	2.5
Found ± SD/ng mg ⁻¹	0.2 ± 0.01	2.5 ± 0.04	0.5 ± 0.02	2.9 ± 0.02
RSD/%	5.4	1.5	4.4	0.68
Accuracy/%	—	95	—	98
	DBahA		BghiP	
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	4.9	0	4.9
Found ± SD/ng mg ⁻¹	n.d. ^{a)}	5.0 ± 0.05	< LOQ ^{b)}	4.6 ± 0.08
RSD/%	—	1.0	—	1.8
Accuracy/%	—	102	—	94
	IDP			
Added amounts/ng mg ⁻¹	0	2.5		
Found ± SD/ng mg ⁻¹	0.2 ± 0.01	2.6 ± 0.05		
RSD/%	4.7	2.0		
Accuracy/%	—	98		

a) n.d., not detected.; b) below the limit of quantification.

煙中の PAH 濃度に大きな影響を与えていないと考えられた。既報⁴⁾⁹⁾²⁴⁾では主流煙及び副流煙中の DBahA が定量されているが、本研究において、すべての銘柄について DBahA を検出できなかった。3R4F の主流煙中 PAH 濃度の傾向は、既報⁹⁾との相関関係が認められた ($r = 0.859, p < 0.01$)。

3銘柄の主流煙及び副流煙中の各 PAH 濃度の間には相関関係 ($r = 0.928 \sim 0.974, p < 0.01$) が認められ、主流煙中に高濃度で存在する PAH は副流煙でも同様であることが

分かった。主流煙に対する副流煙の TPM 濃度の比率 (SS/MS) は 2~3 程度であったが、総 PAH 濃度の SS/MS 比率は 19 以上で、IARC²⁾でグループ 1 に分類されている BaP で 14 倍以上、グループ 2B の BaA, Chr, BbF, BkF, IDP で 14~81 倍副流煙中の濃度が高かった (Table 2)。4 環以上の PAH について、副流煙中の濃度が 10 倍以上主流煙より高いことが報告されている²⁴⁾。IARC が受動喫煙をグループ 1 に分類⁴⁾しているように、室内での喫煙は、喫煙者のみならず非喫煙者が副流煙の受動喫煙により高濃度の

Table 2 Total particulate matter (TPM) (mg cigarette⁻¹) and PAH levels (ng cigarette⁻¹, mean ± SD) in mainstream (MS) and sidestream (SS) smoke from 3 cigarette brands

Analyte	3R4F			Marlboro			MILD SEVEN		
	Mainstream (MS)	Sidestream (SS)	Ratio (SS/MS)	Mainstream (MS)	Sidestream (SS)	Ratio (SS/MS)	Mainstream (MS)	Sidestream (SS)	Ratio (SS/MS)
TPM	11.0 ± 0.2	29.1 ± 1.1	3	11.5 ± 0.1	23.3 ± 0.9	2	14.4 ± 0.2	25.6 ± 0.9	2
Nap	156 ± 5	2460 ± 246	16	174 ± 13	2200 ± 84.6	13	117 ± 7.5	2170 ± 256	19
Ace	14.0 ± 5.8	130 ± 6	9	9.8 ± 0.3	99.0 ± 8.9	10	7.3 ± 1.6	100 ± 13	14
Fle	213 ± 7	6160 ± 218	29	305 ± 27	5240 ± 270	17	216 ± 9.8	5700 ± 46	26
Phe	95.1 ± 2.7	4350 ± 141	46	79.6 ± 3.0	2610 ± 73.0	33	98.2 ± 0.7	3350 ± 47	34
Ant	3.4 ± 0.3	202 ± 9	60	5.4 ± 0.5	190 ± 28.9	35	3.7 ± 0.2	149 ± 9	41
Flu	21.4 ± 0.7	673 ± 14	31	32.1 ± 0.4	688 ± 82.0	21	25.2 ± 1.4	638 ± 26	25
Pyr	18.0 ± 0.3	496 ± 26	28	27.1 ± 0.4	445 ± 17.6	16	23.1 ± 0.7	477 ± 23	21
BaA	10.5 ± 0.8	542 ± 22	52	13.2 ± 1.3	416 ± 71.8	31	8.9 ± 0.5	411 ± 30	46
Chr	8.1 ± 0.4	452 ± 66	56	11.0 ± 0.5	425 ± 52.5	38	8.9 ± 0.1	359 ± 19	40
BbF	1.3 ± 0.3	104 ± 6	81	3.1 ± 0.5	81.5 ± 11.0	26	2.8 ± 0.1	89.5 ± 7.8	32
BkF	1.0 ± 0.2	45.2 ± 2.7	45	2.3 ± 0.2	33.0 ± 4.8	14	2.2 ± 0.0	42.2 ± 2.4	19
BaP	5.3 ± 0.1	111 ± 7	21	6.9 ± 0.3	96.1 ± 6.2	14	5.7 ± 0.2	102 ± 6	18
DBahA	n.d. ^{a)}	n.d.	—	n.d.	n.d.	—	n.d.	n.d.	—
BghiP	0.2 ± 0.1	26.4 ± 2.5	152	0.8 ± 0.1	30.5 ± 2.0	38	0.7 ± 0.2	32.2 ± 1.6	46
IDP	1.3 ± 0.3	35.6 ± 0.7	28	3.3 ± 0.2	51.8 ± 5.2	15	2.4 ± 0.5	44.4 ± 6.9	19
total	548 ± 16	15800 ± 406	29	673 ± 41	12600 ± 217	19	522 ± 17	13700 ± 787	26

a) n.d., not detected.

PAH に曝露することを意味している。一方で、主流煙についてフィルターの通気口をふさぐことで主流煙中の PAH 濃度が増大することが報告¹⁴⁾されており、喫煙方法によってより高濃度曝露が引き起こされる可能性もある。

4 結 言

HPLC-FL を用いたタバコ煙（主流煙及び副流煙）粒子中 15 種 PAH の高感度分析法を確立した。ポリメリックタイプの ODS カラムを用いることで、PAH とそれらの重水素化体とを良好に分離することができ、質量分析と同様に標識体を内部標準物質として利用できた。また、シリカゲルと中性アルミナのタンデム固相により高い精製度を達成し、多くの PAH について GC-MS よりも高感度に検出できた。このことから、本法はタバコ煙中の PAH を定量する際の分析法の選択肢の一つとなると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、環境省による環境研究総合推進費 (5RF-1302)、科学研究費補助金基盤研究 (B) 23406004 及び喫煙科学研究財団の助成によりなされた研究の一部である。

文 献

- 1) 早川和一, 唐 寧, 鳥羽 陽, 亀田貴之: ぶんせき (*Bunseki*), **2008**, 278.
- 2) IARC: "Monographs on the Evaluation of Carcinogenic

Risks to Humans", <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>, accessed 16 July 2013.

- 3) K. B. Kim, B. M. Lee: *Cancer Lett.*, **113**, 205 (1997).
- 4) IARC: "Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 83", p. 1 (2004), (Lyon, France).
- 5) USEPA: "Priority Pollutants 40 CFR, Protection of Environment Appendix A to Part 423", (2010), (Washington, DC, USA).
- 6) R. F. Casper, M. Quesne, I. M. Rogers, T. Shirota, A. Jolivet, E. Milgrom, J. F. Savouret: *Mol. Pharmacol.*, **56**, 784 (1999).
- 7) M. Kalaitzoglou, C. Samara: *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1432 (2006).
- 8) H. Lee, D. P. H. Hsieh, L. Li: *Chemosphere*, **82**, 477 (2011).
- 9) J. E. Tarrant, K. Mills, C. Williard: *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2227 (2009).
- 10) G. Gmeiner, G. Stehlik, H. Tausch: *J. Chromatogr. A*, **767**, 163 (1997).
- 11) J. B. Forehand, G. L. Dooly, S. C. Moldoveanu: *J. Chromatogr. A*, **898**, 111 (2000).
- 12) Y. S. Ding, J. S. Trommel, X. J. Yan, D. Ashley, C. H. Watson: *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 471 (2005).
- 13) J. Dumont, F. Larocque-Lazure, C. Iorio: *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 371 (1993).
- 14) Y. S. Ding, D. L. Ashley, C. H. Watson: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5966 (2007).
- 15) C. Stader, F. T. Beer, C. Achten: *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 7041 (2013).
- 16) International Standard: "ISO Standard 4387", Third ed. (2000).

- 17) International Standard : "ISO Standard 3308", Forth ed. (2000).
- 18) A. Toriba, Y. Kuramae, T. Chetiyankornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa : *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 126 (2003).
- 19) G. Shen, S. Tao, S. Wei, Y. Zhang, R. Wang, B. Wang, W. Li, H. Shen, Y. Huang, Y. Chen, H. Chen, Y. Yang, W. Wang, X. Wang, W. Liu, S. L. M. Simonich : *Environ. Sci. Technol.*, **46**, 8123 (2012).
- 20) L. Liu, Y. Liu, J. Lin, N. Tang, K. Hayakawa, T. Maeda : *J. Environ. Sci.*, **19**, 1 (2007).
- 21) M. E. Machado, L. P. Bregles, E. W. de Menezes, E. B. Caramão, E. V. Benvenutti, C. A. Zini : *J. Chromatogr. A*, **1274**, 165 (2013).
- 22) S. A. Wise, L. C. Sander, W. E. May : *J. Chromatogr.*, **642**, 329 (1993).
- 23) A. Toriba, T. Chetiyankornkul, R. Kizu, K. Hayakawa : *Analyst*, **128**, 605 (2003).
- 24) M. Lodovici, V. Akpan, C. Evangelisti, P. Dolara : *J. Appl. Toxicol.*, **24**, 277 (2004).

Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cigarette Smoke Particulates by HPLC with Fluorescence Detection

Akira TORIBA^{®1}, Chiharu HONMA¹, Waka UOZAKI¹, Thanyarat CHUESAARD²,
Ning TANG¹ and Kazuichi HAYAKAWA¹

[®] E-mail : toriba@p.kanazawa-u.ac.jp

¹ Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

² Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

(Received October 4, 2013; Accepted November 18, 2013)

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with fluorescence detection was developed for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cigarette mainstream and sidestream smoke particulates. Fifteen kinds of PAHs classified as priority pollutants by the US EPA were quantified with six perdeuterated PAHs as internal standards. The smoke filter samples obtained from 3 brands of cigarettes using standardized smoking conditions were extracted with dichloromethane, and then treated with tandem solid phase extraction cartridges (Silica and Neutral Alumina). The limits of detection ranged from 0.24 to 2.2 pg, and were more sensitive than those by GC-MS. The analytes were quantified by using the internal standards, and the developed method achieved sufficient reproducibility and accuracy. The PAH levels in mainstream and sidestream smoke from 3 cigarette brands were in the range of 0.2–305 ng cigarette⁻¹ and 26.4–6160 ng cigarette⁻¹, respectively. The total PAH content in sidestream smoke was more than 10 times higher compared with that of mainstream smoke. This method should be useful as an optional analytical method to quantify PAHs in cigarette smoke particulates.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbon; cigarette smoke; HPLC; fluorescence detection; solid phase extraction.