

ノ ー ト

## 水中低分子アルデヒドの高感度分析における ブランク低減への $\gamma$ 線照射の応用

竹田 一彦<sup>®1</sup>, 三井 裕美<sup>1</sup>, 静間 清<sup>2</sup>, 近藤 宏壮<sup>1</sup>,  
中谷 暢丈<sup>1</sup>, 佐久川 弘<sup>1</sup>

### 1 緒 言

ホルムアルデヒドやアセトアルデヒド, プロピオンアルデヒドなどの低分子アルデヒドは, 環境中でいくつかの化学的過程において重要な役割を果たしている. 大気中の低分子アルデヒドは化石燃料の燃焼や自動車などの人為的発生源が主な起源である. 降水や霧水中では低分子アルデヒドは大気中の主要な有機化合物の一つであり, 雲水中での化学反応や硫黄化合物のスペシエーションを考察する上で重要な物質である<sup>1)~3)</sup>.

河川水や湖水, 海水中の低分子アルデヒドは 100 nM 以下と濃度は低く, その報告例は少ない. 海水中の低分子アルデヒドは光化学的反応で生成するが動態などについては不明な点が多い<sup>4)5)</sup>. 著者らは低分子アルデヒドを天然水中溶存有機物の光化学的分解過程における中間生成物として, その高感度検出法の開発に関する研究を行い, オンライン濃縮高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と試料の大量導入を組み合わせた方法を用いてナノモルオーダーの水中低分子アルデヒドの定量を報告した<sup>6)</sup>. 一方, 水道水では, オゾンによる上水処理過程でホルムアルデヒドが生成することから, 日本では 2004 年度からホルムアルデヒドの水道水基準として 0.08 mg/L (2.7  $\mu$ M) が設定されている<sup>7)8)</sup>.

水中のマイクロモルオーダー以下の低分子アルデヒドの定量においては, 試料や試薬, 分析に用いる水の汚染の問題はきわめて重要である. 室内の建材や家具からのホルムアルデヒドの放出や実験室内で使用するメタノールやエタノールの酸化, プラスチック製品などからの放出<sup>9)10)</sup>, 人の呼気など様々な原因によって実験室の大気からは高濃度の低分子アルデヒドが検出される. これらの気相中のアルデヒドは容易に水中に溶け込み, 試料や分析試薬, 分析に用いる水が汚染されることがしばしばある. 一方, 水の

精製も容易ではなく, 蒸留による水の精製では, 精製した水と実験室大気との接触時間が長いから, かえって水中のアルデヒド濃度を増加させる. また, 低分子アルデヒドは溶存有機物の紫外線分解で生成することから, 紫外線で溶存有機物を分解し精製する超純水作製装置からも微量のアルデヒドが検出される. 著者らは活性炭カラムによる吸着による精製も試みたが十分な成績は上げられなかった. 低分子アルデヒドの微量分析においては, それに用いる水の汚染とその精製は大変な大きな課題である. 使用する水がアルデヒドを含んでいては試薬ブランクの定量的評価やその差し引きは不可能である.

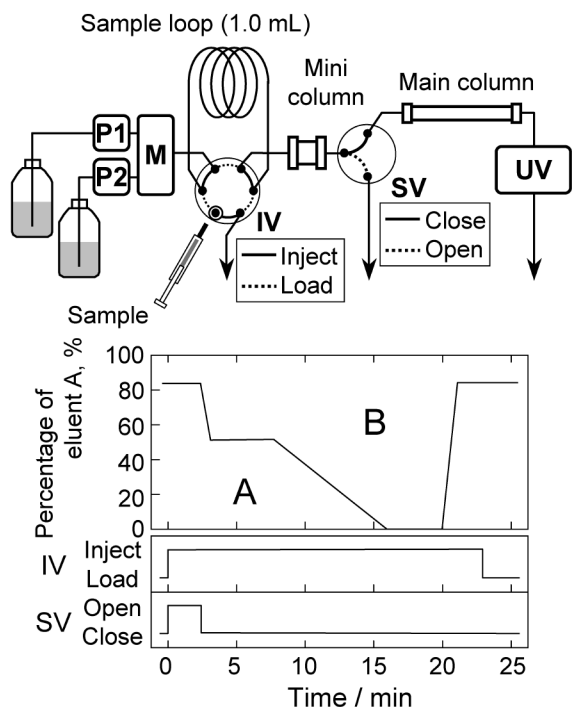
Sugaya らは様々な市販のミネラルウォーター中のアルデヒドを調査し, 最もアルデヒド濃度が低い特定銘柄のミネラルウォーターを空試験値として用いている<sup>7)</sup>. 著者らもこれまで特定のメーカーの高速液体クロマトグラフィー用蒸留水が最もアルデヒド濃度が低いことを見だし, これを空試験値として用いている<sup>6)</sup>.

著者らはこれまで天然水中で発生するヒドロキシルラジカルの高感度定量や河川水や海水でのその分布などについて研究してきた<sup>11)~13)</sup>. ヒドロキシルラジカルは活性酸素種の一つであり高い酸化能力を有しており, 天然水中での溶存有機物の分解無機化過程や様々な化学種の酸化状態の決定に深く関与している.

そこで, 本研究では, ナノモルオーダーの水中低分子アルデヒドの定量のための水を精製する方法として, 微量の低分子アルデヒドを含む水にヒドロキシルラジカルを発生させ, アルデヒドを分解する方法について検討した. 水中でのヒドロキシルラジカルの発生法は硝酸イオンや亜硝酸イオン, 過酸化水素への紫外線照射による光化学的発生法や  $\text{Fe}^{2+}$  と過酸化水素のフェントン反応から発生させる方法などがある<sup>11)~13)</sup>. これらの方法で精製した水では水中に硝酸イオンや亜硝酸イオン, 鉄イオンなどが残るため, 光化学的な実験などの別の実験に用いる水として用いる場合はそれらを除去する必要がある. 本研究では<sup>60</sup>Coからの $\gamma$ 線を利用してヒドロキシルラジカルを発生させる方法を用いた.  $\gamma$ 線を用いることで他の物質を加えることなく密

<sup>1</sup> 広島大学大学院生物圏科学研究科環境循環系制御学専攻: 739-8521 広島県東広島市鏡山

<sup>2</sup> 広島大学大学院工学研究科機械システム工学専攻: 739-8527 広島県東広島市鏡山



**Fig. 1** Schematic diagram of large volume injection/column switching/high pressure gradient HPLC system, gradient program of the HPLC and time program of the valves

Eluent A: distilled water, Eluent B: 90% acetonitrile solution

閉容器中でヒドロキシルラジカルを効率的に発生させることができる。

また、既報<sup>6)</sup>では2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 誘導体化試薬の精製には四塩化炭素を使用し精製を行った。しかし四塩化炭素はモントリオール議定書でオゾン層破壊物質と指定され、日本の特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律 (PRTR 法) により第1種指定化学物質に指定されていることから、四塩化炭素を使用しない新たな方法の検索が必要である。本報告では DNPH 誘導体化試薬の精製についても検討した。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

標準溶液の調製や希釈には、シグマアルドリッチ製の高速液体クロマトグラフ用蒸留水を用いた。ホルムアルデヒド標準溶液はパラホルムアルデヒドを前述の高速液体クロマトグラフ用蒸留水に溶解させた。アセトアルデヒド標準溶液はアセトアルデヒドを溶解させた。それぞれのアルデヒドは 10 mM になるように調製し、これを保存液とした。

Milli-Q 水は水道水を活性炭フィルターで濾過後、オルガノ製のイオン交換樹脂 EG-5 でイオン交換し、更に 10  $\mu$ m のフィルターで濾過した一時処理水を Millipore 製の Milli-Q Plus で精製した。

### 2.2 DNPH 誘導体化試薬の調製

DNPH はシグマアルドリッチ製のものをアセトニトリルで2回再結晶し用いた。再結晶した DNPH 20 mg を、蒸留水:塩酸:アセトニトリル = 5:2:1 (容量比) の混合溶液 15 mL で溶解させた。

この溶液を次に示す2つの方法で精製し誘導体化試薬として使用した。一つ目の方法は四塩化炭素を用いた方法で、上記溶液に四塩化炭素を加え5分以上激しく振とうし、その後、2000 rpm で遠心分離を行った後に、その上澄を誘導体化試薬として用いた<sup>4)~6)</sup>。二つ目の方法は、調製した DNPH 溶液を C<sub>18</sub> 固相抽出カートリッジ (SPEC, ウォーターズ製, Sep-Pak Plus C18 Cartridge) を用いて精製した。SPEC はアセトニトリル 10 mL と高速液体クロマトグラフ用蒸留水を 10 mL を通じて、コンディショニングした後に、上記で調製した DNPH 溶液を通過させた。

試料の誘導体化は、試料 10 mL に対してこれらの方法で精製した DNPH 誘導体化試薬 400  $\mu$ L を添加し、密栓をして軽くふりまぜ、1時間以上放置し誘導体化させた。

### 2.3 装 置

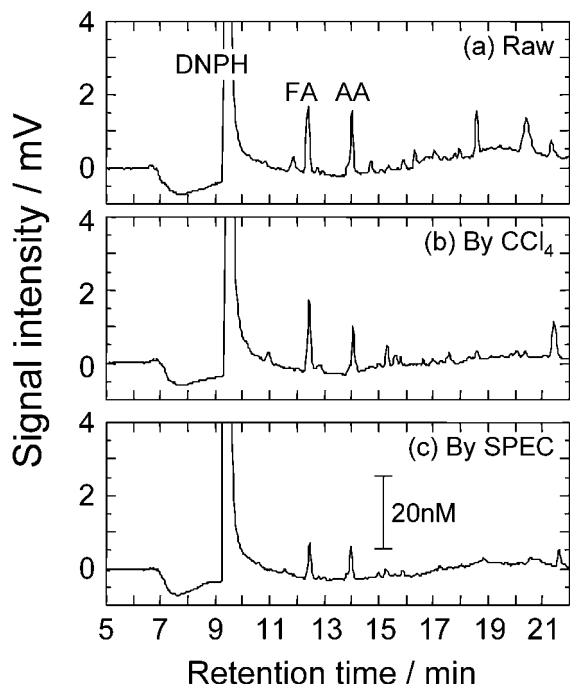
本研究で用いた試料大量導入/カラムスイッチング/高圧グラジエント HPLC システムの概略図を Fig. 1 に示す。溶離液 A は蒸留水、溶離液 B はアセトニトリル 90% 水溶液を用いた。Fig. 1 にはグラジエントプログラムとインジェクションバルブ (IV) とスイッチングバルブ (SV) の開閉タイミングも示した。本研究での HPLC システムは試料の大量導入とミニカラムによる濃縮と未反応 DNPH の除去を行うシステムで、著者らによる既報<sup>7)</sup>の方法と原理的には同じであるが、試料注入の操作をサンプルループを用いて行うことや、ミニカラムとスイッチングバルブをライン上に組込むこととで、オペレーターの負担を軽減し、繰り返し精度が向上した。

HPLC は日本分光株式会社の 1500 シリーズ高圧 2 溶媒 HPLC システムを、ミニカラムは関東化学製 Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm, 長さ 5 mm, 粒子径 5  $\mu$ m)、分離カラムは関東化学製 Mightysil RP-18 GP (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5  $\mu$ m) をそれぞれ用いた。カラムはカラムオープンで 40°C に保ち、検出は吸光度検出器を用いて波長 365 nm の吸光度を検出した。

酢酸やギ酸はサブレッサー式イオンクロマトグラフィー (ダイオネクス製, DX500) で測定した。

### 2.4 $\gamma$ 線照射

$\gamma$  線の照射は広島大学大学院工学研究科放射線総合実験室の <sup>60</sup>Co  $\gamma$  線源を用いた。この照射装置は定格 370 TBq で、照射時 (2007年4月) の強度は 99.6 TBq であった。試料又は蒸留水をガラスアンブルに封入又はガラスバイアル



**Fig. 2** HPLC chromatograms of derivatized commercial HPLC grade distilled water

The distilled waters were derivatized (a) by the raw derivatization reagent prepared by dissolving recrystallized DNP in a solution containing HCl, acetonitrile and water (2 : 1 : 5), (b) by derivatization reagent purified by tetrachloromethane and (c) by derivatization reagent purified by C<sub>18</sub> solid phase extraction cartridge. Peaks : DNP, unreacted excess DNP; FA, formaldehyde; AA, acetaldehyde.

に入れ密栓をしたのち、線源から20~60 cmの所で1分~3時間程度照射した。吸収線量は線源から20 cmのところでは11.7 Gy/minであった。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 DNP 誘導体化試薬の精製

DNP 誘導体化試薬を四塩化炭素で精製した場合とSPECで精製した結果をFig. 2に示す。四塩化炭素を用いて精製した場合は保持時間が長い14~20分あたりの不純物ピーク除去されているが、保持時間12.4分のホルムアルデヒドのピークの高さはあまり変わっていない。SPECを用いて精製した場合、ホルムアルデヒドのピークが若干残っているが、ホルムアルデヒドのピークもアセトアルデヒドのピーク(保持時間14.0分)も四塩化炭素を用いた方法にくらべ小さくなっていることが分かる。SPECを用いた方法は四塩化炭素を用いた方法より優れていることを示している。

#### 3.2 アルデヒドの $\gamma$ 線照射による分解

ホルムアルデヒドとアセトアルデヒド溶液に $\gamma$ 線を照射

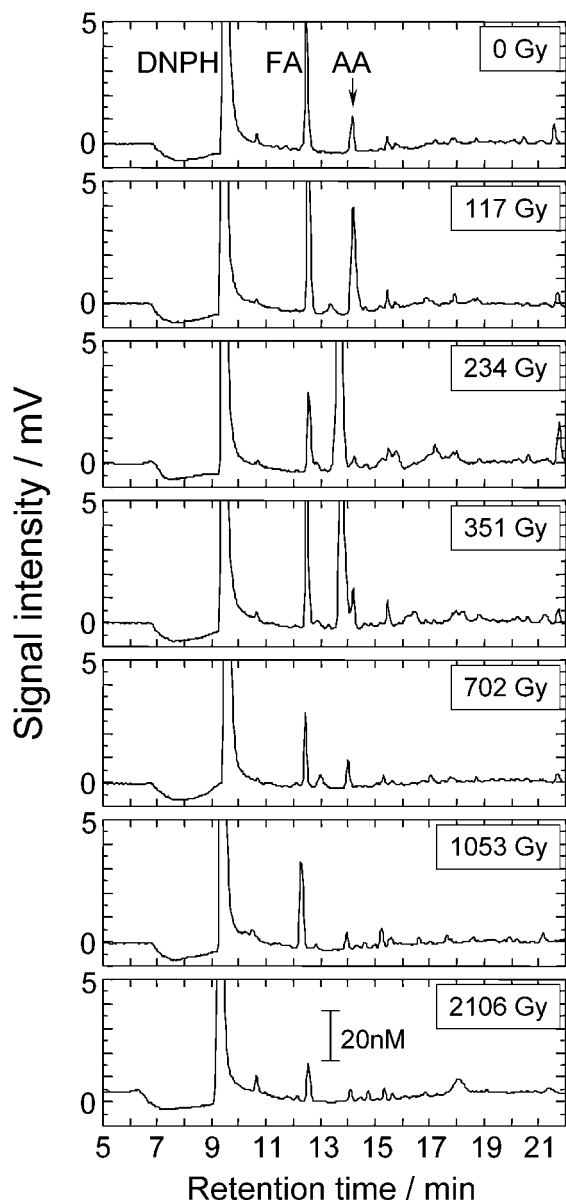
したところ、ホルムアルデヒドからはギ酸が、アセトアルデヒドからは酢酸が生成した。ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドの吸収線量に対する減少速度はそれぞれ0.16  $\mu\text{M}/\text{Gy}$ と0.23  $\mu\text{M}/\text{Gy}$ であった。

水に $\gamma$ 線を照射した際にはヒドロキシルラジカル以外にも水和電子や水素原子、過酸化水素などの活性酸素種やラジカルが生成する。生成した水和電子や水素原子そのものがアルデヒドと反応する可能性があるが、水和電子とホルムアルデヒドやアセトアルデヒドとの反応速度定数(それぞれ $1 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $4.4 \sim 5.4 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )にくらべ、水和電子と溶存酸素の反応速度定数( $1.9 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )は十分大きい<sup>14)</sup>。また、それぞれの濃度を考慮すれば、生成した水和電子のほとんどは溶存酸素と反応しスーパーオキシドアニオンを形成すると思われる。同様に生成した水素原子のほとんども溶存酸素と反応しHO<sub>2</sub>ラジカルを形成する。これらのスーパーオキシドアニオンやHO<sub>2</sub>ラジカルはヒドロキシルラジカルにくらべれば反応性が低いため、本研究での $\gamma$ 線による低分子アルデヒドやカルボン酸の分解はほぼヒドロキシルラジカルによるものであると考えられる。

これまでの報告値ではホルムアルデヒドとヒドロキシルラジカルの反応速度定数は $0.78 \sim 1 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であるのに対して、アセトアルデヒドは $3.6 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である<sup>14)</sup>。アセトアルデヒドの反応速度定数はホルムアルデヒドに対して約4倍である。本研究でのホルムアルデヒドとアセトアルデヒド分解速度の違いは約1.5倍程度しかなかった。したがって、ヒドロキシルラジカルとの反応だけでは説明できず、詳細な分解メカニズムについては今後の検討課題であろう。

アセトアルデヒドの分解では分解したアセトアルデヒド量と生成した酢酸の量はほぼ一致していた。しかし、ホルムアルデヒドの場合は、分解したホルムアルデヒド量にくらべ生成したギ酸の量が小さくなっていた。ギ酸とヒドロキシルラジカルの反応速度定数は $1 \sim 1.4 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、酢酸は $0.092 \sim 0.23 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である<sup>14)</sup>。アセトアルデヒドのヒドロキシルラジカルの反応速度定数と酢酸のその差は2桁以上あるのに対して、ホルムアルデヒドとギ酸の差は5~10倍程度である。このことから考え、ホルムアルデヒドは $\gamma$ 線照射によって生成するヒドロキシルラジカルでギ酸に分解されるが、生成したギ酸も更にヒドロキシルラジカルで分解されていると考えられる。

ギ酸や酢酸などのカルボン酸もDNPで誘導体化される。しかし、DNPで誘導体化したカルボン酸を逆相HPLCで測定した時は、DNP-カルボン酸誘導体の保持時間は未反応DNPのそれより短い<sup>15)</sup>。したがって、アルデヒドの分解でカルボン酸が生成しても、本方法でのアルデヒドの定量におけるHPLCのクロマトグラム上で、生成



**Fig. 3** HPLC chromatograms of Milli-Q water irradiated by  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray

Peaks : DNP, unreacted excess DNP ; FA, formaldehyde ; AA, acetaldehyde. The samples were derivatized by the DNP derivatization reagent purified by tetrachloromethane.

したカルボン酸がアルデヒドの定量の障害になる可能性はないと思われる。

### 3.3 高純水に残留する微量アルデヒドの $\gamma$ 線照射による分解

本研究で用いた高速液体クロマトグラフ用蒸留水を空試験値として誘導体化し測定した時のクロマトグラム上に現れるピークのブランク等価濃度 (BEC, Blank Equivalent Concentration) はホルムアルデヒドで約 10~15 nM 程度, アセトアルデヒドで約 3 nM 程度以下であった<sup>6)</sup>。この

高速液体クロマトグラフ用蒸留水に 351~1053 Gy の  $\gamma$  線を照射して測定してみたところ, ホルムアルデヒドの BEC は若干は減少するが, 減少量が小さくその減少量の変動も大きかった。アセトアルデヒドのピークはほとんど検出されなくなった。本研究では BEC がホルムアルデヒドで 50 nM, アセトアルデヒドで 15 nM 程度ある Milli-Q 水 (Fig. 3, 0 Gy) に  $\gamma$  線を照射し, その効果を検討した。その時のクロマトグラムの変化を Fig. 3 に示す。前節で述べたようにホルムアルデヒドやアセトアルデヒドは  $\gamma$  線の照射で分解したので, ここでも同じ結果を期待したが, 照射開始直後はホルムアルデヒドやアセトアルデヒドのピークは増加し, 更にはクロマトグラム上に未同定のピークが多く発生し, 吸収線量 351 Gy まではこれらのピークは大きくなった。しかし, 吸収線量 702 Gy 以降はこれらのピークは減少し, ホルムアルデヒドのピーク (< 15 nM) を除いてほぼ消失した。

水への  $\gamma$  線の照射で生成するヒドロキシルラジカルは活性酸素種の中で最も酸化力の強い反応性の高い化学種である。それゆえに, ヒドロキシルラジカルは様々な物質と反応するが Fig. 3 で見られた照射開始直後に現れた未同定ピークの出現やホルムアルデヒドやアセトアルデヒドのピークの上昇は, Milli-Q 水中の微量の有機物が分解し生成した物質によるものではないかと推測される。

## 4 結 語

$\gamma$  線の照射によって発生したヒドロキシルラジカルによって水中のホルムアルデヒドやアセトアルデヒドを分解することができることが分かった。Milli-Q 水に 2106 Gy 照射した場合には, ホルムアルデヒドの BEC で 15 nM 程度, アセトアルデヒドのピークは見られなかった。また, 市販の高速液体クロマトグラフ用蒸留水に  $\gamma$  線の照射した時のホルムアルデヒドもほぼ同じ値であり, アセトアルデヒドのピークは見られない。また, 誘導体化試薬の精製法を四塩化炭素を用いる方法から SPEC を用いた方法に変えることによって, ホルムアルデヒドの BEC は小さくなっている。これらのことから考えて, Milli-Q 水や市販の高速液体クロマトグラフ用蒸留水に  $\gamma$  線を十分照射した時に見られるホルムアルデヒドのピークは主に誘導体化試薬を起源としている可能性が高い。本研究で DNP 誘導体化試薬の精製法として SPEC による方法が効果的であることを示したが, 今後, 10 nM 以下の BEC を追求する際には DNP 誘導体化試薬の更なる精製について検討する必要があるものと思われる。

本研究で  $\gamma$  線の照射によって発生したヒドロキシルラジカルによって水中のホルムアルデヒドやアセトアルデヒドを分解することを示したが,  $\gamma$  線照射による不純物の分解はアルデヒドのみならず他の物質にも応用できると考えら

れる。すでに $\gamma$ 線を用いて下水や排水中の汚染物質を分解除去する試みは報告されている。本研究で用いたような大規模な $\gamma$ 線照射装置は大学の研究施設をのぞいて、日本国内ではおよそ10カ所前後の施設があり、ディスプレイの医療器具の滅菌などに利用されている。オートクレーブや酸化エチレンガスによる滅菌にくらべ $\gamma$ 線照射による滅菌は安価に行えると言われている。本研究の結果はこれらの施設を用いてアンブル等に封入した水に $\gamma$ 線照射を行うことで空試験値を低減した水が作製できる可能性を示している。 $\gamma$ 線照射によるヒドロキシラジカルの発生は、滅菌のみならず、水の精製法の一つとして利用できると期待される。

## 文 献

- 1) P. Carlier, H. Hannachi, G. Mouvier : *Atmos. Environ.*, **20**, 2079 (1987).
- 2) R. J. Kieber, M. F. Rhines, J. D. Willey, G. B. Avery Jr. : *Atmos. Environ.*, **33**, 3659 (1999).
- 3) 片桐保行, 渡邊真一, 大河内博, 井川 学 : 日本化学会誌, **1994**, 1007.
- 4) R. J. Kieber, X. Zhou, K. Mopper : *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 1503 (1990).
- 5) X. Zhou, K. Mopper : *Marine Chemistry*, **56**, 201 (1997).
- 6) K. Takeda, S. Katoh, N. Nakatani, H. Sakugawa : *Anal. Sci.*, **22**, 1509 (2006).
- 7) N. Sugaya, T. Nakagawa, K. Sakurai, M. Morita, S. Onodera : *J. Health Sci.*, **47**, 21 (2001).
- 8) 羽田三奈子, 滝埜昌彦, 代島茂樹 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 411 (2000).
- 9) N. Sugaya, K. Sakurai, T. Nakagawa, N. Onda, S. Onodera, M. Morita, M. Tezuka : *Anal. Sci.*, **20**, 865 (2004).
- 10) M. T. Oliva-Teles, P. Paiga, C. M. Delerue-Matos, M. C. M. Alvim-Ferraz : *Anal. Chim. Acta*, **467**, 97 (2002).
- 11) N. Nakatani, M. Ueda, H. Shindo, K. Takeda, H. Sakugawa : *Anal. Sci.*, **23**, 1137 (2007).
- 12) 竹田一彦, 進藤宏隆, 中谷暢丈, 佐久川弘 : 水環境学会誌, **28**, 509 (2005).
- 13) K. Takeda, H. Takedoi, S. Yamaji, K. Ohta, H. Sakugawa : *Anal. Sci.*, **20**, 153 (2004).
- 14) G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross : *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **17**, 513 (1988). Web Site <[http://www.rcdc.nd.edu/browse\\_compil.html](http://www.rcdc.nd.edu/browse_compil.html)>でも検索可能.
- 15) S. Uchiyama, E. Matsushima, S. Aoyagi, M. Ando : *Anal. Chem.*, **76**, 5849 (2004).

## Application of $\gamma$ -Ray Irradiation to Reduction of Blank for Highly Sensitive Analysis of Low Molecular Weight Aldehydes in Water

Kazuhiko TAKEDA<sup>1</sup>, Yumi MITSUI<sup>1</sup>, Kiyoshi SHIZUMA<sup>2</sup>, Hiroaki KONDO<sup>1</sup>,  
Nobutake NAKATANI<sup>1</sup> and Hiroshi SAKUGAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-shi, Hiroshima 739-8521

<sup>2</sup> Graduate School of Engineering, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima-shi, Hiroshima 739-8527

(Received 4 November 2008, Accepted 16 December 2008)

For a highly sensitive analysis of formaldehyde and acetaldehyde in water, a degradation of formaldehyde and acetaldehyde in blank water by <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray irradiation was demonstrated. Formaldehyde and acetaldehyde in water were evaluated by using a large-volume injection/column switching/high pressure gradient HPLC system coupled with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. By  $\gamma$ -ray irradiation, formaldehyde was decomposed to formic acid, and the resulting formic acid was furthermore decomposed. Acetaldehyde also oxidized to acetic acid upon exposure to  $\gamma$ -rays. In the early stage of  $\gamma$ -ray irradiation for Milli-Q water, the formaldehyde and acetaldehyde in Milli-Q water increased, and many unknown peaks appeared in HPLC chromatograms. The formaldehyde, acetaldehyde and unknown species formed upon  $\gamma$ -ray irradiation may be derived from trace organic mater contained in Milli-Q water. Acetaldehyde and unknown peaks disappeared upon further  $\gamma$ -ray irradiation, and the formaldehyde peak was also diminished. In this report, purification of the DNPH derivatization reagent is also mentioned.

**Keywords** : formaldehyde ; acetaldehyde ; 2,4-dinitrophenylhydrazine ; HPLC ;  $\gamma$ -ray degradation.