

Table 1 Concentrations (mg/m³) of major carbonyl compounds generated from 13 brands of E-cigarettes

Product	N_{high} N_{low}	FR	Formaldehyde	Acetaldehyde	Acrolein	Propanal	Glyoxal	Methylglyoxal
A	16	31	61 ± 64	48 ± 51	7.5 ± 6.9	16 ± 19	4.6 ± 6.5	5.3 ± 5.7
	35		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B	6	20	44 ± 19	0.3 ± 0.1	12 ± 4.3	2.0 ± 1.2	29 ± 12	20 ± 7.8
	24		2.6 ± 1.6	n.d.	2.2 ± 1.6	n.d.	n.d.	3.7 ± 2.2
C	8	27	40 ± 28	1.7 ± 2.5	9.7 ± 10	6.1 ± 6.3	18 ± 9.5	22 ± 10
	22		3.1 ± 2.6	n.d.	1.1 ± 1.1	n.d.	1.3 ± 1.4	2.1 ± 1.9
D	12	24	28 ± 12	25 ± 12	36 ± 18	24 ± 19	7.7 ± 4.1	11 ± 7.5
	37		1.5 ± 1.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E	14	40	31 ± 14	27 ± 11	34 ± 12	27 ± 15	8.2 ± 4.4	8.6 ± 7.9
	21		1.3 ± 1.5	n.d.	1.2 ± 1.7	n.d.	n.d.	n.d.
F	2	40	12 ± 1.7	2.8 ± 0.2	2.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.8 ± 0.7	5.8 ± 0.9
	3		3.6 ± 3.1	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.5	n.d.	n.d.	1.6 ± 1.5
G	1	4	53	19	19	6.3	17	37
	25		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H	5	17	19 ± 8.9	8.3 ± 4.3	8.1 ± 4.0	n.d.	4.6 ± 0.9	8.4 ± 5.7
	25		1.7 ± 2.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I	6	20	5.8 ± 1.9	11 ± 5.9	11 ± 4.2	14 ± 4.1	n.d.	n.d.
	24		2.8 ± 2.6	4.8 ± 5.2	5.0 ± 4.9	6.0 ± 6.2	n.d.	n.d.
J	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	4		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	30		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	30		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	13		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

The upper line indicates the mean value for the high-concentration group, and the lower line indicates the mean value for the low-concentration group. Indices N_{high} and N_{low} indicate the number of E-cigarettes that generated high and low concentrations of carbonyl compounds, respectively. FR indicates the failure rate, which was calculated using the following equation: $\text{FR} = N_{\text{high}} / (N_{\text{high}} + N_{\text{low}}) \times 100$. Values are mean ± SD. n.a., not available; n.d., not detected.

Concentration of carbonyl compounds in E-cigarette smoke

The concentration of carbonyl compounds in the smoke mist from 13 brands of E-cigarettes sold in Japan was determined by the HQ-DNPH method. The analysis of these actual brands of E-cigarettes revealed very large variations in the carbonyl concentrations among not only different brands, but also different examples of the same products. Typical distributions of the carbonyl concentrations were not observed for any of the E-cigarettes tested, and the mean values were largely different from the median values. These concentration variations were not caused by the analytical method, because the HQ-DNPH method has good reproducibility (RSD less than 2.1%).³ We previously reported that the smoke mist generated from E-cigarettes unexpectedly contains carbonyl compounds.⁴ This conclusion is based on the fact that for the same E-cigarette products, it was found that some E-cigarettes generated high concentrations of carbonyl compounds, while others did not. Figure 2 shows the concentrations of formaldehyde, acrolein, glyoxal, and methylglyoxal generated from 10 electronic cigarettes of the same brand. These results represent triplicate measurements for 10 samples. As can be seen in the figure, the number 7 and 9 E-cigarettes generated peculiarly high concentrations of carbonyl compounds. Therefore, the resulting data were divided into two groups based on the formaldehyde concentration (10 mg/m³): a high concentration group and a low concentration group. Table 1 shows the concentrations of the major carbonyl compounds generated from 13 brands of E-cigarettes. In the table, the top entry in each cell indicates the mean value for the high-concentration group, and the lower

entry indicates the mean value for the low-concentration group. The indices N_{high} and N_{low} indicate the number of E-cigarettes that generated high and low concentrations of carbonyl compounds, respectively. FR indicates the failure rate, which was calculated by the following equation: $\text{FR} = N_{\text{high}} / (N_{\text{high}} + N_{\text{low}}) \times 100$.

Four (J, K, L, M) out of the 13 E-cigarette brands did not generate any carbonyl compounds. The other nine E-cigarette brands (A, B, C, D, E, F, G, H, I) generated various carbonyl compounds. The concentrations of carbonyl compounds obtained for the high concentration group were significantly higher than that determined for the low concentration group. The maximum concentrations of formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, propanal, glyoxal, and methylglyoxal were 260, 210, 73, 83, 42, and 38 mg/m³, respectively. For a typical cigarette smoking experience of 10 puffs, these values translate to maximum concentrations of 140 µg formaldehyde/cigarette, 120 µg acetaldehyde/cigarette, 33 µg acrolein/cigarette, 46 µg propanal/cigarette, 23 µg glyoxal/cigarette, and 21 µg methylglyoxal/cigarette. Most notably, very high concentrations of formaldehyde were measured in the smoke from the E-cigarettes. Glyoxal and methylglyoxal are peculiar to E-cigarette smoke, and have not been detected in the mainstream smoke from normal cigarettes. Glyoxal is known to be mutagenic to *Salmonella typhimurium* strains TA100, TA102, and TA104.^{6,7} It has been shown that glyoxal reacts with guanine residues in DNA.⁸ Its tumor promoting activity has also been reported.^{9,10} Methylglyoxal, the most mutagenic of all aldehydes, is known to inhibit formaldehyde metabolism, thus

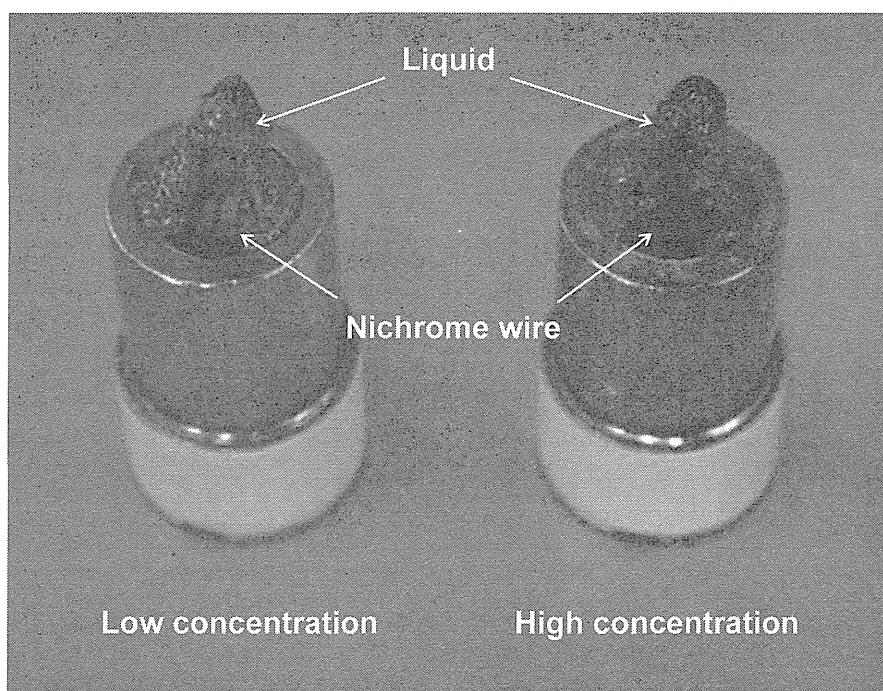


Fig. 3 E-cigarette atomizers that generated low and high concentrations of carbonyl compounds.

enhancing formaldehyde-induced cytotoxicity.¹¹

After smoking an E-cigarette, the atomizer that generated the high concentrations of carbonyl compounds was burned black. Figure 3 shows atomizers after smoking 10 puffs. The left atomizer generated a low concentration. The right atomizer generated a high concentration of carbonyl compounds, and the color around Nichrome wire changed from white to black. These results suggest that the compounds in the E-cigarette liquid, such as glycerol and glycols, incidentally touch the heated Nichrome wire in the atomizer, and are oxidized to formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, glyoxal, and methylglyoxal.

Conclusions

E-cigarettes incidentally generate carbonyl compounds in the E-cigarette smoke mist. A possible cause for carbonyl generation is the oxidation of liquids in the E-cigarette, such as glycerol and glycols, when they incidentally touch the heated Nichrome wire in the atomizer, and are oxidized to formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, glyoxal, and methylglyoxal. In some cases, these hazardous compounds are generated with extremely high concentrations. Suppliers and users of E-cigarettes should pay attention to this phenomenon.

Acknowledgements

The authors thank Ms. Sayuri Yanai for her technical assistance. This research was partially supported by Ministry of Health, Labour, and Welfare of the Japanese Government, the Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Health Security Control and Third Term Comprehensive Control Research for Cancer).

References

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), "CDC Newsroom, About one in five U.S. adult cigarette smokers have tried an electronic cigarette", February 28, 2013, http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0228_electronic_cigarettes.html.
- L. Alderman, "E-Cigarettes Are in Vogue and at a Crossroads", *The New York Times*, 2013, http://www.nytimes.com/2013/06/13/business/e-cigarettes-are-in-vogue-and-at-a-crossroads.html?_r=1&.
- S. Uchiyama, Y. Inaba, and N. Kunugita, *J. Chromatogr., A*, **2010**, 1217, 4383.
- K. Ohta, S. Uchiyama, Y. Inaba, H. Nakagome, and N. Kunugita, *Bunseki Kagaku*, **2011**, 60, 791.
- Health Canada Official Method T-115, "Determination of "Tar", Nicotine and Carbon Monoxide in Mainstream Tobacco Smoke", 1999, Ottawa, Canada.
- Y. Sayato, K. Nakamuro, and H. Ueno, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **1987**, 189, 217.
- L. Dorado, M. Ruiz Montoya, and J. M. Rodríguez Mellado, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **1992**, 269, 301.
- R. Shapiro and J. Hachmann, *Biochemistry*, **1966**, 5, 2799.
- C. Furihata, S. Yoshida, and T. Matsushima, *Jpn. J. Cancer Res.*, **1985**, 76, 809.
- M. Takahashi, H. Okamiya, F. Furukawa, K. Toyoda, H. Sato, K. Imaida, and Y. Hayashi, *Carcinogenesis*, **1989**, 10, 1925.
- S. Teng, K. Beard, J. Pourahmad, M. Moridani, E. Easson, R. Poon, and P. J. O'Brien, *Chem. Biol. Interact.*, **2001**, 130 - 132, 285.

年間特集「空」：技術論文

空气中化学物質測定用拡散サンプラーの 安定性評価及び実試料測定への応用

山田 智美^{1,2}, 内山 茂久^{®1}, 稲葉 洋平¹, 瀬戸 博², 櫻田 尚樹¹

4種類のガス状化学物質測定用拡散サンプラー(カルボニル化合物測定用 DSD-DNPH, オゾン測定用 DSD-OZONE, 酸性ガス測定用 DSD-TEA, 塩基性ガス測定用 DSD-NH₃)の捕集後における安定性を検討した。また、検討した安定性に基づき、60戸の住宅でガス状化学物質の実態調査を行った。DSD-TEA(二酸化窒素)を除く拡散サンプラーは、室温保存の場合、4週間における捕集量の増減は約7.2%以内であった。DSD-TEAを用いた二酸化窒素の室温保存における安定性は、他の拡散サンプラーより変動が大きく、4週間後の減少率は9.0%を示した。この原因として、室温保存中にNO₂⁻がNO₃⁻に酸化されたことが推測される。したがって、捕集後のDSD-TEAは、2週間以内に分析しない時は、冷蔵、冷凍保存する必要がある。住宅の屋内外でガス状化学物質の実態調査を行ったところ、二酸化窒素を除くほとんどの化学物質は、夏季の方が冬季に比べ濃度が高い傾向を示した。冬季における二酸化窒素の屋内の平均濃度は、夏季の約15倍と高濃度を示し、主な発生源は燃焼系ストーブであることが示唆された。

1 緒 言

1980年代より、建物に使用される建材や家具などから発生する揮発性有機化合物(VOC)が原因で体調不良を引き起こすシックハウス症候群が社会問題となっている。厚生労働省による指針値の策定など、様々な対策が実施され、ホルムアルデヒドなどの規制物質(13物質)によるシックハウス症候群の被害は沈静化してきたが、一方で、未規制物質による健康被害が報告されるようになった。建材、施工剤、家具等の使用状況によっては、室内に未規制物質が多量に存在することもある。個人家屋を対象とした過去の全国調査において、 α -ピネンやリモネンを始めとするテルペン類が室内で高濃度であることが報告されている¹⁾²⁾が、これらのテルペン類はオゾンとの反応性が高く、二次生成物質を生じるとの報告^{3)~5)}もある。また、近年では空気清浄機や脱臭器、コピー機などオゾンの発生が推測される家庭用機器が室内で用いられることも多い。一方、環境大気中では、オゾンとオレフィン類が反応してアルデヒド類、カルボン酸類を生成する二次生成機構が知られている。したがって、室内の二次生成機構を解明するには、室内空気中のオゾンの測定が不可欠である。しかし、その測定報告は非常に少なく、二次生成関連物質(オゾン、アルデヒド類、カルボン酸類)の同時測定や、二次生成機構に関する

報告も非常に少ない。環境大気中の酸性ガス(二酸化窒素、二酸化硫黄、塩化水素)や塩基性ガス(アンモニア、トリメチルアミン)は酸性雨の原因物質であるが、室内環境においても、これらの物質は刺激性物質、悪臭物質として重要である。このような背景において、人体への健康影響や発がんリスクを評価する上でも、ガス状有害化学物質を正確に同定、定量し、汚染の実態を把握することは、極めて重要である。

室内濃度や個人暴露濃度の測定には、ポンプ等の動力や電力を必要とせず、分子拡散の原理に基づきガス状化学物質を捕集する拡散サンプラーが適している。また、拡散サンプラーは、郵送等により遠隔地での捕集や、同時多地点での測定などの利点もある。しかし、捕集から分析までの時間が長い場合、保存中に捕集成分が変化することが懸念される。そこで本研究では、オゾン測定用拡散サンプラー(DSD-OZONE)、カルボニル化合物同時測定用拡散サンプラー(DSD-DNPH)⁶⁾⁷⁾、酸性ガス測定用拡散サンプラー(DSD-TEA)、塩基性ガス測定用拡散サンプラー(DSD-NH₃)⁸⁾を作製し、拡散サンプラーの捕集後の安定性を検討した。さらに、これらを用いて、60戸の住宅で、夏季及び冬季に同時に屋内、屋外のカルボニル化合物、オゾン、酸性ガス、塩基性ガスを同時測定することにより、汚染の実態、発生源について検討を行った。

® E-mail: uchiyama@niph.go.jp

¹ 国立保健医療科学院: 351-0197 埼玉県和光市南 2-3-6

² 東京顕微鏡院: 190-8535 東京都立川市高松町 1-100-38

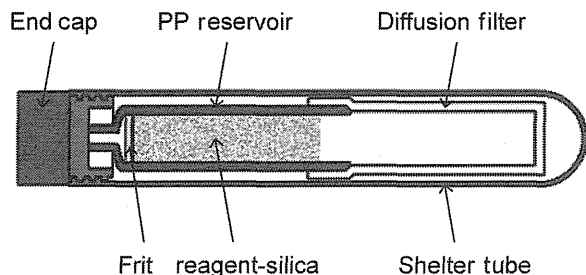


Fig. 1 Schematic drawing of the DSD-sampler

2 実 験

2.1 試 薬

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 (>98.0%), *trans*-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレン (BPE, >98.0%) は東京化成工業製, トリエタノールアミン (>99.5%), リン酸 (85% 水溶液), アセトニトリル (>99.9%), 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH, >97%) はシグマアルドリッチ製, シリカ (60/80 mesh, 120 Å) は AGC エスアイテック製を使用した。

2.2 装 置

高速液体クロマトグラフ (HPLC) は, LC-20AD 送液ポンプを 2 台, SPD M20A フォトダイオードアレイ検出器を備えた島津製作所製 Prominence LC-20 を使用した。分離カラムは Ascentis Express RP-Amide (2.7 μm particle size, 150 mm × 4.6 mm i.d., Supelco 製) を用い, カラムオーブン温度を 40 °C, 注入量を 10 μL とした。移動相にはアセトニトリル (40%) と水 (60%) の混合溶液 (A 溶液) 及び 5 mmol L⁻¹ の酢酸アンモニウムを含むアセトニトリル (75%) と水 (25%) 混合溶液 (B 溶液) を用い, A 溶液 100% を 8 分間保ち, 37 分間で B 溶液 100% にした後, 15 分間 B 溶液 100% を保つグラジエントモードで分析を行った。

イオンクロマトグラフ (IC) は日本ダイオネクス製 DX-120 を使用した。陰イオン分析には, 分離カラムに IonPac AS14 (4 × 250 mm), サプレッサーに ASRS 300 (4 mm) を使用し, 移動相には, 3.5 mmol L⁻¹ 炭酸ナトリウム/1.0 mmol L⁻¹ 炭酸水素ナトリウム溶液を用い, 1.2 mL min⁻¹ の流量で分析を行った。陽イオン分析には, 分離カラムに IonPac CS16 (5 × 250 mm), サプレッサーに CSRS 300 (4 mm) を使用し, 移動相には, 30 mmol L⁻¹ メタンスルホン酸溶液を用い, 1.0 mL min⁻¹ の流量で分析を行った。

紫外可視分光高度計は島津製作所製 UV-mini-1240 を使用した。

2.3 拡散サンプラー

DSD (diffusive sampling device) -sampler は拡散浸透媒体である diffusion filter, 分析時に抽出容器になる PP reservoir, 反応吸収剤試薬を含浸させたシリカゲルから構成される。DSD-sampler の構造と, 測定手順の概要を Fig. 1 に示す。大きさは直径 1.2 cm, 全長 9 cm であり, diffusion filter の吸収剤が接触する有効面積は 3.93 cm², 厚さは 1 mm である。反応試薬含浸シリカゲルを diffusion filter より PP reservoir へ移動させてから抽出操作を行う。各種の反応試薬を含浸させたシリカゲルを使用することにより, カルボニル化合物, オゾン, 酸性ガス, 塩基性ガスを選択的に捕集することが可能である。

捕集方法は, 捕集場所に, 太さ 1 mm の糸をに固定する。DSD-sampler の入ったアルミ製保存袋からサンプラーを取り出し, 拡散フィルター部が床から約 1.5 m になるように糸の先端に取り付ける。捕集開始時にサンプラーを覆っている shelter tube を取り外す。捕集終了時に shelter tube を取り付け, アルミ製保存袋に入れる。

分析方法は, 捕集後の DSD-sampler をアルミ製保存袋から取り出し, 4, 5 回振った後, 拡散フィルター側を上にして shelter tube を取り外す。DSD-sampler のキャップ側を実験台などでタッピングした後, 拡散フィルターを取り外し, 各サンプラーに対応する溶出液を満たした 10 mL の注射筒を取り付け, 2~5 mL min⁻¹ の流量で溶出し, 5 mL 定容した後, 溶出液の分析を行った。

2.3.1 カルボニル化合物測定用拡散サンプラー DSD-DNPH 原理として, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) はカルボニル炭素に求核付加し, 安定な 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体を生成する⁹⁾。この誘導体を HPLC で分析しカルボニル化合物を定性, 定量する。

作製方法は, シリカゲル 100 g を水, メタノール, アセトニトリルでよく洗浄した後, アセトニトリル 50 mL, リン酸 1 mL, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン二塩酸塩 0.5 g の混合溶液を添加する。窒素ガス雰囲気中でロータリーエバポレーター (40 °C) を用いて減圧乾固させてから密封容器に保存した。この DNPH-silica 250 mg を PP reservoir に充填し, diffusion filter を取り付け shelter tube に入れて DSD-DNPH とする⁶⁾⁷⁾。DSD-DNPH はアルミ製保存袋に入れ密閉した。

分析方法は, アセトニトリル 5 mL で DSD-DNPH を溶出し, HPLC で分析する。この際, DNPH 誘導体の異性化^{10)~12)}を考慮し, これらの標準溶液にリン酸を 0.1% 添加して異性体比を一定にした後, 分析を行った。ホルムアルデヒド, アセトアルデヒド, アセトン, プロパナル, ブタナル, ベンズアルデヒド, *i*-ペンタナル, ペンタナル, *o*-トルアルデヒド, *p*-トルアルデヒド, ヘキサナル, 2,5-ジメチルベンズアルデヒド, ヘプタナル,

オクタナール, ノナナール, デカナール, *o*-フタルアルデヒド¹³⁾の計17成分をHPLCで定量可能である。

2・3・2 オゾン測定用拡散サンプラー (DSD-OZONE)
原理として, 大気中のオゾンは捕集剤の *trans*-1,2-ビス(2-ピリジル)エチレン (BPE) と反応し, オゾニドを生成する。このオゾニドは加水分解されてピリジン-2-アルデヒドを生成する¹⁴⁾¹⁵⁾。これを3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH) で誘導体化し, 比色分析することにより定量する。

作製方法は, シリカゲル100 gを純水, アセトニトリルでよく洗浄した後, BPEを1 g添加した。40℃でロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固させてから, 密封容器に保存した。このBPE-silica 250 mgをPP reservoirに充填し, diffusion filterを取り付け, shelter tubeに入れてDSD-OZONEとする。DSD-OZONEはアルミ製保存袋に入れ密閉する。

分析方法は, リン酸を0.2%添加した5%のMBTH溶液5 mLでDSD-OZONEを溶出し, 溶出液を20分間放置してから440 nmの波長で吸光度を測定する。

2・3・3 酸性ガス測定用拡散サンプラー (DSD-TEA)
原理として, 大気中の二酸化窒素, 二酸化硫黄, 塩化水素などの酸性ガスはトリエタノールアミン (TEA) と反応し, 対応する陰イオンを生成する。この各種陰イオンをICで分析することにより, 酸性ガスを定性, 定量する。

作製方法は, シリカゲル100 gを純水, アセトニトリルでよく洗浄した後, トリエタノールアミンを10 mL添加する。40℃でロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固させてから, 密封容器に保存した。このTEA-silica 250 mgをPP reservoirに充填し, diffusion filterを取り付け, shelter tubeに入れてDSD-TEAとする。DSD-TEAはアルミ製保存袋に入れ密閉した。

分析方法は, 純水5 mLでDSD-TEAを溶出した後, 溶出液中の陰イオンをICで定量する。

2・3・4 塩基性ガス測定用拡散サンプラー (DSD-NH₃)
原理として, 大気中のアンモニアやトリメチルアミンなどの塩基性ガスはリン酸と反応して, 対応する陽イオンを生成する。この陽イオンをICで分析することにより, アンモニアを定性, 定量する。

作製方法は, シリカゲル100 gを純水, アセトニトリルでよく洗浄した後, リン酸を5 mL添加する。40℃でロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固させてから, 密封容器に保存した。このリン酸-silica 250 mgをPP reservoirに充填し, diffusion filterを取り付け, shelter tubeに入れてDSD-NH₃とする⁸⁾。DSD-NH₃はアルミ製保存袋に入れ密閉した。

純水5 mLでDSD-NH₃を溶出した後, 溶出液中の陽イオンをICで定量する。

2・4 4種の拡散サンプラーの捕集後の安定性

DSD-DNPH及びDSD-TEAについては, 各30個を同時に24時間暴露した後, 室温(22℃), 冷蔵(4℃), 冷凍(-30℃)保存した。室温で保存したサンプラーは1週間ごとに, 冷蔵で保存したサンプラーは1日ごとに, 冷凍で保存したサンプラーは1か月後に分析し, 各期間における経時変化を測定した。なお, DSD-DNPHは実際の室内で, DSD-TEAは石油ファンヒーターを使用した実際の室内で暴露を行った。

DSD-OZONE及びDSD-NH₃については, 各10個を同時に24時間暴露した後, 室温(22℃), 冷凍(-30℃)保存した。室温で保存したサンプラーは1週間ごとに, 冷凍で保存したサンプラーは1か月後に分析し, 各期間における経時変化を測定した。なお, DSD-OZONEとDSD-NH₃は温湿度等を制御できる人工気候室内(気温25℃, 湿度60%)にオゾン発生器, アンモニア発生器を設置して暴露を行った。

暴露濃度は, ホルムアルデヒド65 µg m⁻³, アセトアルデヒド29 µg m⁻³, オゾン43 µg m⁻³, 二酸化窒素1.8 mg m⁻³, アンモニア41 µg m⁻³であった。なお, DSD-DNPHによる分析の再現性(相対標準偏差)⁷⁾は, ホルムアルデヒド2.4%, アセトアルデヒド2.0%, DSD-NH₃の再現性⁸⁾は4%である。

2・5 各種拡散サンプラーを使用した居住環境濃度調査

首都圏60戸の住宅を対象に調査を行った。なお, 調査は国立保健医療科学院研究倫理審査委員会において審査承認(NIPH-IBRA#09018)を受けてから行った。調査期間は平成21年12月から平成22年1月の冬季と, 平成22年7月から8月の夏季にかけて2回実施し, DSD-DNPH, DSD-OZONE, DSD-TEA, DSD-NH₃の4種類の拡散サンプラーを屋内, 屋外に24時間設置してサンプリングを行った。屋内の測定は居間の中心付近で, 屋外はベランダ又は建物に隣接した場所で行った。

3 結果と考察

3・1 拡散サンプラーの捕集後の安定性

各種の拡散サンプラーを用いて捕集したホルムアルデヒド, アセトアルデヒド, オゾン, 二酸化窒素及びアンモニアの濃度(分析値)の経時変化をFig. 2に示す。

DSD-DNPHでは, ホルムアルデヒドの場合, 室温保存時の経時変化の回帰直線は $y = 65 - 0.11x$ を示し, 4週間後で4.8%減少した。室温保存中にDNPHピークの減少に対応して, DNPHのピークの直後にピークが現れ, 時間とともに増加した(Fig. 3)が, これは2,4-ジニトロベンゼン(DB)及び2,4-ジニトロアニリン(DA)である。すなわち, DNPHが分解して生成した物質であるが, 他のヒドラゾン

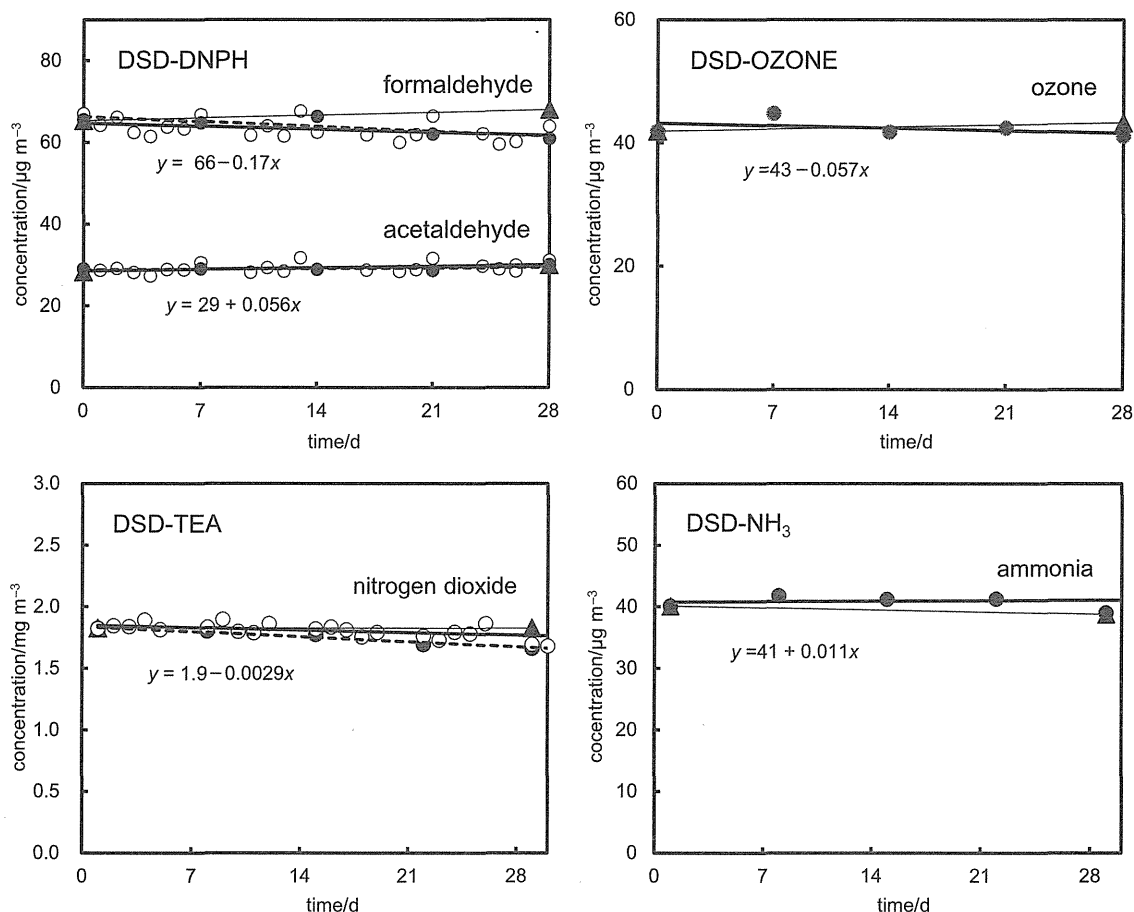


Fig. 2 Changes of formaldehyde, acetaldehyde, ozone, nitrogen dioxide and ammonia collected in DSD-samplers. The closed circle, open circle and triangle indicate those samples stored at room temperature, in a refrigerator and in a freezer, respectively.

誘導体ピークと重なることがないので、HPLC分析に与える影響はない。冷蔵保存時における経時変化の回帰直線は $y = 66 - 0.17x$ を示し、4週間後で7.2%減少した。冷凍で4週間保存したサンプラーの分析値は $68 \mu\text{g m}^{-3}$ を示し、4.6%の増加が見られた。一方、アセトアルデヒドの場合は、保存時間に対応して濃度が僅かに増加した。室温保存の場合は、 $y = 29 + 0.023x$ を示し、4週間後で2.2%増加した。冷蔵保存の経時変化の回帰直線は $y = 29 + 0.056x$ を示し、4週間後で5.5%の増加を示した。また、冷凍で4週間保存したサンプラーの分析値は $30 \mu\text{g m}^{-3}$ を示し、3.4%の増加が認められた。増減の割合が有意であるかの検定は行っていないが、DSD-DNPHの再現性を考慮すると、ホルムアルデヒド・アセトアルデヒドともに、室温・冷蔵・冷凍保存すべてにおいて4週間の保存期間では、ほとんど変化しないことが示唆される。

DSD-OZONEでは、室温保存時におけるオゾンの経時変化の回帰直線は $y = 43 - 0.057x$ を示し、4週間後で3.7%減少した。また、冷凍で4週間保存したサンプラーの分析値は $43 \mu\text{g m}^{-3}$ であり、保存開始時と同じ分析値を示した

ため、冷凍保存による増減は確認されなかった。DSD-OZONEの再現性は求めているが、DSD-DNPHと同様に4週間の保存期間では、室温・冷蔵保存双方においてほとんど変化しないことが示唆される。

DSD-TEAでは、室温保存時における二酸化窒素の経時変化の回帰直線は $y = 1.8 - 0.0059x$ 、4週間後の減少率は9.0%を示し、他のサンプラーと比較して大きな減少が観測された。室温保存のイオンクロマトグラフィーによる分析結果から、 NO_2^- 濃度の減少に伴い NO_3^- 濃度が増加していることが確認された (Fig. 4)。このことから、保存中に NO_2^- が NO_3^- に酸化されたことが推測される。冷蔵保存時における経時変化の回帰直線は $y = 1.9 - 0.0029x$ 、4週間後で4.4%の減少を示し、室温保存時の半分の値になった。冷凍で4週間保存したサンプラーの分析値は 1.8 mg m^{-3} であり、保存開始時と同じ分析値を示したため、冷凍保存による増減は確認されなかった。捕集後のDSD-TEAは、2週間以内に分析しない時は、冷蔵、冷凍保存する必要がある。

DSD-NH₃では、室温保存時におけるアンモニアの経時変化の回帰直線は $y = 41 + 0.011x$ 、4週間後で0.76%の増

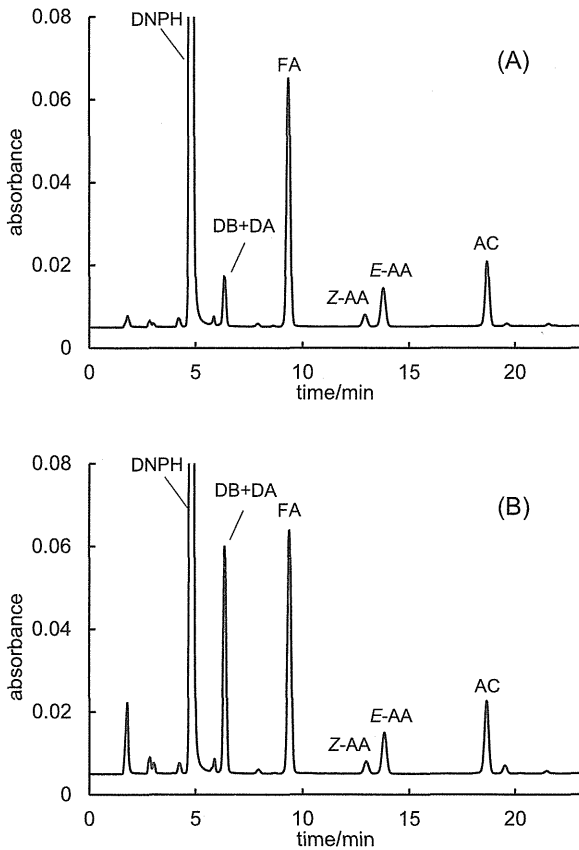


Fig. 3 Chromatographic profiles of carbonyl-DNPhydrazones eluted from DSD-DNPH
 Panel (A) shows a sample stored for 24 hours and panel (B) shows one stored for 40 days in room temperature. FA, formaldehyde; AA, acetaldehyde; AC, acetone; DB, 2,4-dinitrobenzene; DA, 2,4-dinitroaniline.

加を示した。冷凍で4週間保存したサンプラーの分析値は $39 \mu\text{g m}^{-3}$ を示し、保存開始時と比較して4.9%の減少が見られた。増減の割合が有意であるかの検定は行っていないが、DSD-NH₃の再現性を考慮すると、室温・冷凍保存双方において4週間の保存期間では、ほとんど変化しないことが示唆される。

3.2 各種拡散サンプラーを使用した居住環境濃度調査

平成21年12月から平成22年1月の冬季と、平成22年7月から8月の夏季にかけて60戸の住宅の屋内・屋外でカルボニル化合物、カルボン酸、オゾン、酸性ガス、塩基性ガス濃度を測定した。測定期間はすべて24時間である。調査した60戸の住宅のうち戸建ては32戸、集合住宅は28戸であり、木造住宅が31戸、鉄筋住宅が28戸(未回答1戸)であった。また、築年数が10年以上の住宅が36戸、10年未満が19戸(未回答5戸)であった。

調査した60戸の住宅における屋内と屋外の化学物質の

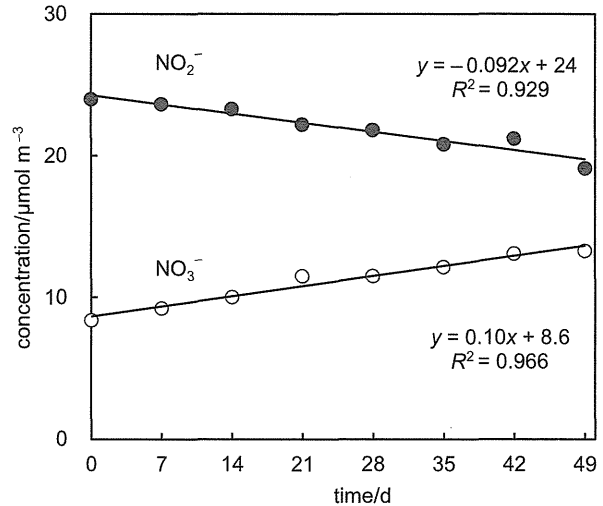


Fig. 4 Changes of the nitrite and nitrate concentrations in DSD-TEA stored at room temperature

濃度(平均値)及びI/O比(屋内平均濃度/屋外平均濃度)をTable 1に示す。全体的に、夏季の方が冬季に比べ濃度が高い傾向が認められた。

カルボニル化合物は、厚生労働省のホルムアルデヒド濃度指針値 $100 \mu\text{g m}^{-3}$ を超えた住宅は冬季には存在しなかったが、夏季には1戸存在した ($130 \mu\text{g m}^{-3}$)。また、アセトアルデヒド濃度の指針値 $48 \mu\text{g m}^{-3}$ を超えた住宅は冬季では4戸、夏季では6戸存在した。その他、ノナールの暫定指針値である $41 \mu\text{g m}^{-3}$ を超えた住宅は夏季、冬季ともに無かった。

オゾンは、冬季におけるオゾンの屋内平均値は $5.2 \mu\text{g m}^{-3}$ 、夏季の屋内平均値は $25 \mu\text{g m}^{-3}$ であり、夏季の屋内濃度は冬季より5倍程度高い。一方、冬季の屋外平均値は $39 \mu\text{g m}^{-3}$ 、夏季の屋外平均値は $51 \mu\text{g m}^{-3}$ を示し、大きな差は認められなかった。夏季は、窓を開放する機会が多く、外気の流入が多くなるため、オゾン濃度が高くなったことが推測される。また、冬季、夏季ともに、屋内のオゾン濃度は屋外より低かった。オゾンは反応性が高いため、換気などにより外気から流入したオゾンが、屋内の化学物質と反応して減少したことが推測される。

酸性ガスは、二酸化窒素の冬季の屋内の平均値は $280 \mu\text{g m}^{-3}$ 、最大値は $1400 \mu\text{g m}^{-3}$ であった。二酸化窒素については、環境基準値及び学校保健法において、60 ppb ($113 \mu\text{g m}^{-3}$) という基準値が設けられているが、全体の約43%(26戸)の住宅で基準値を上回る汚染が明らかになった。燃焼系暖房器具を使用している住宅で、濃度が高くなる傾向が認められた。燃焼系暖房器具を使用しない夏季の屋内の平均値は $21 \mu\text{g m}^{-3}$ 、屋外の平均濃度は $22 \mu\text{g m}^{-3}$ で、あまり差が認められなかった。

塩基性ガスは、塩基性ガスとしてはアンモニアのみ検出

Table 1 Mean concentrations of target compounds found both indoor and outdoor air at 60 houses

compounds	Indoor air/ $\mu\text{g m}^{-3}$		Outdoor air/ $\mu\text{g m}^{-3}$		I/O	
	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer
formaldehyde	12.0	35.0	2.4	4.9	5.0	7.2
acetaldehyde	22.0	21.0	3.8	5.1	5.8	4.1
acetone	46.0	32.0	7.1	9.8	6.4	3.3
propanal	1.6	2.6	0.9	1.8	1.9	1.4
butyraldehyde	1.8	2.7	1.4	1.2	1.3	2.2
benzaldehyde	2.4	4.8	1.2	2.3	2.1	2.1
<i>i</i> -valeraldehyde	0.5	0.3	0.3	0.1	1.5	2.7
valeraldehyde	1.1	1.8	0.8	1.1	1.4	1.7
<i>o</i> -tolualdehyde	0.1	0.3	n.d.	0.1	n.d.	2.5
<i>p</i> -tolualdehyde	0.6	1.7	0.1	0.8	11.0	2.0
hexanal	3.1	6.8	0.8	1.2	3.7	5.8
2,5-DMBA	1.6	7.5	1.4	6.0	1.1	1.2
heptanal	1.6	1.1	0.1	0.3	19.0	4.1
OPA	0.9	3.8	1.1	4.1	0.9	0.9
octanal	1.7	2.3	0.7	0.6	2.3	3.8
nonanal	4.7	9.5	2.1	3.5	2.3	2.7
decanal	1.4	4.4	n.d.	0.3	n.d.	14.0
ozone	5.2	25.0	39.0	51.0	0.1	0.5
nitrogen dioxide	280.0	21.0	34.0	22.0	8.2	1.0
ammonia	31.0	84.0	5.5	39.0	5.6	2.2

I, indoor air; O, outdoor air; n.d., not detected.

された。冬季における屋内のアンモニア濃度平均値は $31 \mu\text{g m}^{-3}$ 、最大値は $770 \mu\text{g m}^{-3}$ を示した。一方、夏季における屋内濃度平均値は $84 \mu\text{g m}^{-3}$ 、最大値は $1100 \mu\text{g m}^{-3}$ を示した。冬季は 97% の住宅で、夏季は 95% の住宅で屋内濃度が屋外より高かった。また、屋内、屋外ともにすべての住宅で、夏季のほうが冬季よりも濃度が高かった。特に、ペットを飼育している住宅で高濃度になる傾向が認められ、夏季、冬季共に、屋内濃度最大値を示した住宅では、室内に犬を 6 頭飼育していた。

4 結 言

4 種の拡散サンプラー (DSD-DNPH, DSD-OZONE, DSD-TEA, DSD-NH₃) で空気の捕集を行い、冷蔵及び室温で保存した時の安定性を検討した。その結果、DSD-DNPH, DSD-OZONE, DSD-NH₃ に捕集された物質は、4 週間の保存期間では、ほとんど変化しないことが明らかになった。しかし、DSD-TEA に捕集された NO₂⁻ (二酸化窒素) は、4 週間後の減少率は 9.0% を示し、他のサンプラーと比較して大きな減少が観測された。NO₂⁻ 濃度の減少に伴い NO₃⁻ 濃度が増加したことから、保存中に NO₂⁻ が NO₃⁻ に酸化されたことが推測される。したがって、捕集後の DSD-TEA は、2 週間以内に分析しない時は、冷蔵、冷凍保存する必要がある。

夏季と冬季に、4 種類の拡散サンプラー DSD-DNPH, DSD-OZONE, DSD-TEA, DSD-NH₃ を用いて、カルボニル化合物、オゾン、酸性ガス、塩基性ガス濃度の調査を行った。なお、サンプラーの捕集後の安定性を考慮し、捕集後

2 週間以内に分析を行った。その結果、室内のホルムアルデヒドやアセトアルデヒドは、他のアルデヒド類に比較して濃度が高い傾向にあることが明らかになった。また、オゾン濃度は、屋外より室内の方が圧倒的に低かった。この理由として、外気で生成したオゾンが室内に流入したと考えられた。二酸化窒素については、冬季において全体の約 43% (26 戸) の住宅で基準値を上回った。冬季は換気が不十分になりがちであることから、換気に注意を払うことが必要である。アンモニアは室内にペットを飼育している住宅で高濃度になる傾向が観測され、ペットからの発生が示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究「シックハウス症候群の発生予防・症状軽減のための室内環境の実態調査と改善対策に関する研究」及び基盤研究 (C)「室内環境におけるオゾンおよび二次生成物質の化学的挙動と人体への影響評価」の助成を受けたものである。関係各位及びサンプリングにご協力いただいた方々に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 安藤正典：化学物質過敏症等室内空气中化学物質に係わる疾病と総化学物質の存在量の検討と要因解明に関する研究，平成 13 年度総括・分担研究報告書，厚生科学研究研究費補助金生活安全総合研究事業，(2002)。
- 2) 安藤正典：化学物質過敏症等室内空气中化学物質に係わる疾病と総化学物質の存在量の検討と要因解明に関する研究，平成 14 年度総括・分担研究報告書，厚生科学研究研究費補助金健康化学総合研究事

- 業, (2003).
- 3) B. C. Singer, B. K. Coleman, H. Destailats, A. T. Hodgson, M. M. Lunden, C. J. Weschler, W. W. Nazaroff : *Atmos. Environ.*, **40**, 6696 (2006).
 - 4) M. Nicolas, O. Ramalho, F. Maupetit : *Atmos. Environ.*, **41**, 3129 (2007).
 - 5) Z. Fan, P. Lioy, C. Weschler, N. Fiedler, H. Kipen, J. Zhang : *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1811 (2003).
 - 6) S. Uchiyama, S. Hasegawa : *Atmos. Environ.*, **33**, 1999 (1999).
 - 7) S. Uchiyama, S. Aoyagi, M. Ando : *Atmos. Environ.*, **38**, 6319 (2004).
 - 8) T. Yamada, S. Uchiyama, Y. Inaba, N. Kunugita, H. Nakagome, H. Seto : *Atmos. Environ.*, **54**, 629 (2012).
 - 9) C. F. H. Allen : *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 2955 (1930).
 - 10) S. Uchiyama, M. Ando, S. Aoyagi : *J. Chromatogr. A*, **996**, 95 (2003).
 - 11) S. Uchiyama, E. Matsushima, S. Aoyagi, M. Ando : *Anal. Chim. Acta*, **523**, 157 (2004).
 - 12) M. Behforouz, J. L. Bolan, M. S. Flynt : *J. Org. Chem.*, **50**, 1186 (1985).
 - 13) S. Uchiyama, E. Matsushima, H. Tokunaga, Y. Otsubo, M. Ando : *J. Chromatogr. A*, **1116**, 165 (2006).
 - 14) S. Uchiyama, Y. Otsubo : *Anal. Chem.*, **80**, 3285 (2008).
 - 15) S. Uchiyama, S. Naito, M. Matsumoto, Y. Inaba, N. Kunugita : *Anal. Chem.*, **81**, 6552 (2009).

Storage Stability of Diffusive Samplers and Application to Real Air Samples

Tomomi YAMADA^{1,2}, Shigehisa UCHIYAMA^{®1}, Yohei INABA¹, Hiroshi SETO² and Naoki KUNUGITA¹

[®] E-mail : uchiyama@niph.go.jp

¹ National Institute of Public Health, 2-3-6, Minami, Wako-shi, Saitama 351-0197

² Tokyo Kenbikyo-in Foundation, 1-100-38, Takamatsu-cho, Tachikawa-shi, Tokyo 190-8535

(Received January 16, 2013; Accepted February 26, 2013)

The storage stabilities of four kinds of diffusive sampling devices, (DSD-DNPH for carbonyls, DSD-OZONE for ozone, DSD-TEA for acid gases and DSD-NH₃ for basic gases), were evaluated. Based on the resulting storage stability, chemical substances found both indoor and outdoor air were measured by using DSD-samplers. Almost all DSD-samplers, except for nitrogen dioxide (DSD-TEA), showed degradation in less than 7.2 % for four weeks at room temperature. The storage stability of nitrogen dioxide collected in the DSD-TEA showed degradation in 9 % for four weeks at room temperature. It is suggested that nitrite was oxidized to nitrate during the storage term at room temperature. In measurements of acid gases using DSD-TEA, when the analysis is not performed within two weeks, the samplers should be stored in a refrigerator at 4 °C. In applications to real air samples, it was observed that almost all chemical substances, except for nitrogen dioxide, were higher in the summer than in the winter. The mean nitrogen dioxide concentration was significantly higher at 15 times in the winter than in the summer. It was suggested that the primary sources indoors are combustion processes, such as unvented combustion appliances, e.g. gas stoves.

Keywords: diffusive sampling device; storage stability; indoor air quality.

喫煙と室内環境

国立保健医療科学院 生活環境研究部
稲葉洋平、内山茂久

はじめに

我々の日常生活におけるリスク要因の1つとして喫煙があり、我が国における喫煙のほとんどが、紙巻たばこを吸う行為を指す。これまでにこの喫煙による健康影響が懸念され、世界的にこれまで数多くのたばこ対策と先行研究が実施されてきた。我が国でも2012年度の次期がん対策推進基本計画の素案において10年後の喫煙率を数値目標として12.2%にすることが盛り込まれた。また、地方自治体でも2010年4月から神奈川県が、「公共的施設における受動喫煙防止条例」を施行し、さらなるたばこ対策を推進している。さらに世界保健機関(WHO)の付属機関である国際がん研究機関(IARC)は、発がん性の網羅的な分類において「喫煙」、「たばこ煙」と「受動喫煙」は、分類最上位のグループ1の「発がん性がある」としている。この喫煙とがんに関する問題は、たばこの煙に有害化学物質が数多く含まれていることに起因している¹⁾。たばこの煙は喫煙者が生体内に吸い込む「主流煙」とたばこの先端から発生する「副流煙」の2種類に大別される。主流煙は「喫煙者」の健康影響に及ぼす大きな因子であり、副流煙は「受動喫煙者」の健康に大きな影響を及ぼす因子となる。特に副流煙は、

室内環境の汚染における発生源となりうるものである。そこで今回は、本シリーズの「建築と健康」のテーマに関連して、室内環境の空気汚染に関わるたばこ煙とこれに含まれる有害化学物質の解説及び受動喫煙そして「三次喫煙」といった最近の話題について説明する。

たばこの煙に含まれる有害化学物質について

たばこ主流煙は、喫煙者が喫煙時にたばこの末端(吸い口)から吸い込む煙をさす。一方で副流煙は、紙巻たばこの燃焼時にたばこの先端から発生する煙を指す。現在までにたばこの主流煙には5,300種類以上の化学物質が含まれていると報告されている²⁾。RodgmanとPerfettiらの報告²⁾によるとその化学物質はガス相に95.5%、粒子相に4.5%が含まれている。ガス相の内訳は、水分4.0%、窒素59%、酸素13%、二酸化炭素12.5%、一酸化炭素4.0%、アルゴン、ヘリウム、水素を合計して1.5%そしてカルボニル類などその他の化合物が1.5%である。一方、粒子相の内訳は、水分0.70%、ニコチン0.28%そしてタールが3.52%である。そしてガス相のその他の化合物と粒子相のタールには、IARCの発がん性リスク一覧に

において70種類以上の化学物質が含まれている。表-1には、IARCの発がん性リスク一覧のグループ1とされた「ヒトに対する発がん性が認められる」16化合物とグループ2Aとされた「ヒトに対する発がん性がおそらくある」とされた8化合物を示した。グループ1には、厚生労働省によって室内濃度指針値が定められているホルムアルデヒド、大気汚染物質として知られている多環芳香族炭化水素類のベンゾ[a]ピレンとたばこに特有の有害物質であるたばこ特異的ニトロソアミンであるN'-ニトロソノルニコチン

(NNN) および4-(N-ニトロソメチルアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK) などが含まれている。グループ2Aには、多環芳香族炭化水素であるシクロペンタ[cd]ピレン、ジベンゾ[a,h]アントラセンとジベンゾ[a,l]ピレンやN-ニトロソ化合物であるN-ニトロソジエチルアミン、N-ニトロソジメチルアミンなどが含まれている。以上のように、たばこの煙にはガス相、粒子相のそれぞれから多数の有害化学物質が排出されることが報告されている。次に、国内で販売されているたばこについて旧厚生省が

表-1 たばこに含まれる発がん性物質の一覧 (一部抜粋)

グループ1 (ヒトに対する発がん性が認められる)	グループ2A (ヒトに対する発がん性がおそらくある)
4-アミノビフェニル	アクリルアミド
塩化ビニル	シクロペンタ[cd]ピレン
酸化エチレン	ジベンゾ[a,h]アントラセン
ベンゼン	ジベンゾ[a,l]ピレン
1,3-ブタジエン	IQ (2-アミノ-3-メチルイミダゾ [4,5-f] キノリン
ホルムアルデヒド	無機鉛化合物
2-ナフチルアミン	N-ニトロソジエチルアミン
ベンゾ[a]ピレン	N-ニトロソジメチルアミン
N'-ニトロソノルニコチン (NNN) および4-(N-ニトロソメチルアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK)	
ニッケル化合物	
カドミウムおよびカドミウム化合物	
ヒ素および無機ヒ素化合物	
ベリリウムおよびベリリウム化合物	
6価クロム	
ポロニウム-210	
たばこの喫煙	
たばこの煙および受動喫煙	
無煙たばこ	

1) より一部変更

実施した「平成11-12年度たばこ煙の成分分析について」³⁾の一部測定結果を表-2に示す。ここではたばこ外箱表示量がニコチン0.3mg、タール3mgのマイルドセブンエクストラライトとニコチン0.8mg、タール10mgのマイルドセブンの2銘柄についての測定結果を抜粋した。また、上記のたばこの外箱に表示されている値は、たばこ1本を消費する際に発生する主流煙中の

タール・ニコチン量であり、我が国では、たばこ事業法施行規則に基づき「財務大臣の定める方法により測定したたばこ煙に含まれるタール及びニコチン量」と定義されている。そして、これら主流煙の捕集法は国際標準化機構(International Organization for Standardization; ISO)の手法に基づいている⁴⁾。その手順は、まず図-1(A)に示す機械喫煙装置を用いてたばこの末端

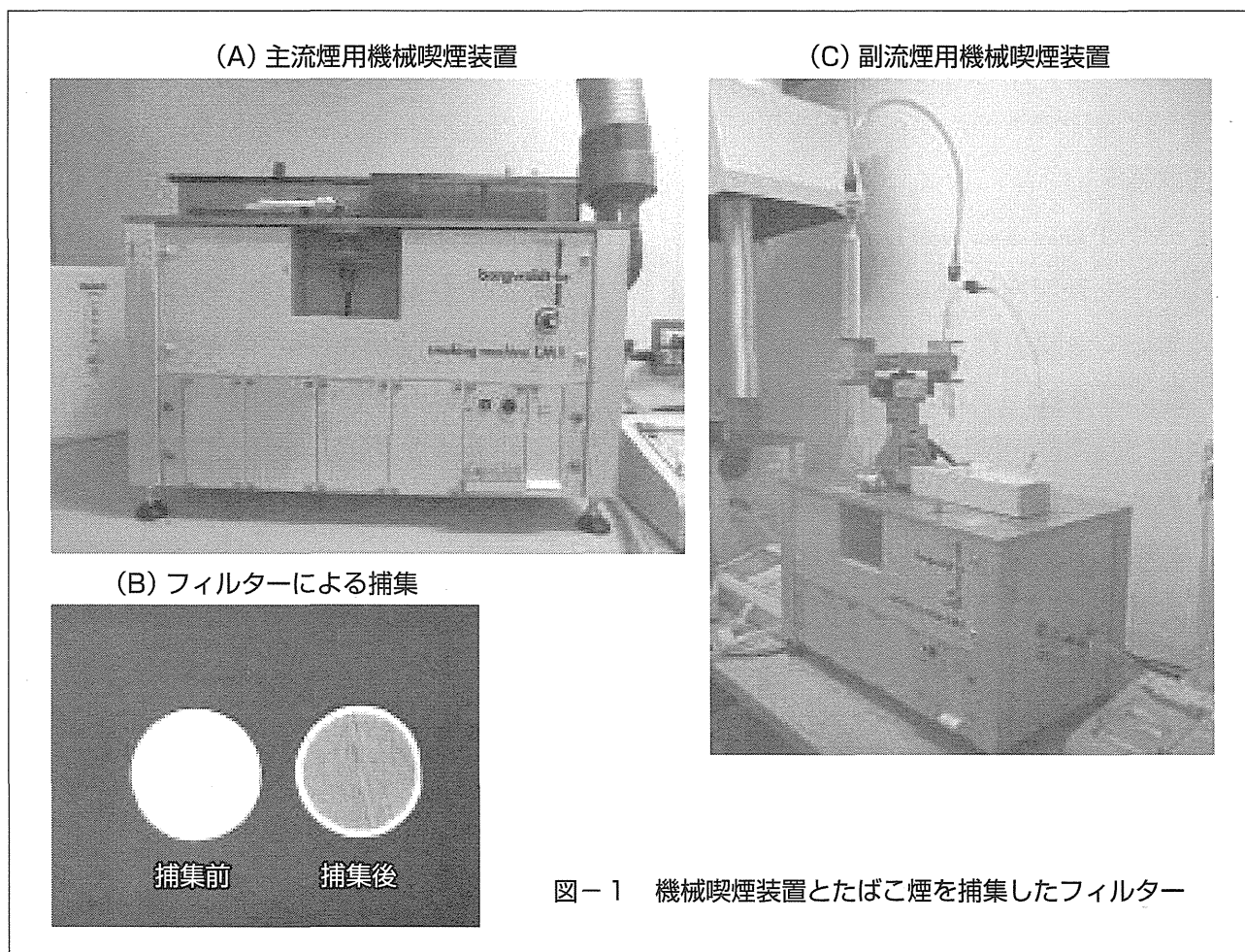
表-2 たばこ1本に含まれる化学物質の重量及び副流煙(SS)と主流煙(MS)の比率(SS/MS)

	主流煙		副流煙		比率(SS/MS)	
	マイルドセブン エクストラライト	マイルドセブン	マイルドセブン エクストラライト	マイルドセブン	マイルドセブン エクストラライト	マイルドセブン
一酸化炭素 (mg)	3.81	11.6	46.8	48.7	12.3	4.2
ニコチン (mg)	0.30	0.96	5.79	5.03	19.2	5.3
タール (mg)	3.19	11.8	21.5	24.4	6.7	2.1
カルボニル類 (μg)						
ホルムアルデヒド	7.64	37.9	459	439	60.1	11.6
アセトアルデヒド	228	560	1711	1689	7.5	3.0
アセトン	142	295	936	957	6.6	3.2
アクロレイン	18.9	47.6	307	310	16.2	6.5
プロピオンアルデヒド	21.4	44.4	172	172	8.0	3.9
クロトンアルデヒド	2.23	12.3	54.5	64.2	24.4	5.2
メチルエチルケトン	23.0	55.0	178	190	7.7	3.5
ブチルアルデヒド	14.4	35.4	111	114	7.7	3.2
窒素酸化物 (μg)						
NO	54.8	125	2011	1973	36.7	15.8
NOx	55.3	128	2155	2080	39.0	16.3
アンモニア (μg)	4.80	15.5	7047	6701	1468	432
有機化合物 (μg)						
1,3-ブタジエン	17.4	37.4	426	363	24.5	9.7
イソプレン	148	272	3203	2547	21.6	9.4
アクリロニトリル	2.27	5.77	104	93.5	45.8	16.2
ベンゼン	14.9	25.8	339	294	22.8	11.4
トルエン	18.7	35.9	645	583	34.5	16.2
ベンツピレン (ng)	3.72	11.4	128	92.0	34.4	8.1
ニトロソアミン類 (ng)						
NNN	45.6	81.0	92.9	92.4	2.0	1.1
NAT	44.4	96.2	47.5	44.9	1.1	0.5
NAB	9.90	15.9	16.3	15.7	1.6	1.0
NNK	27.7	47.7	137	116	4.9	2.4

3) より一部抜粋

(吸い口)部より放出されるたばこ主流煙をガラスフィルターに捕集する(図-1(B))。次に各種化学物質を分析装置によって測定する。このとき重要なのが捕集法である。ISOによる捕集法は、吸煙量が35mL、吸煙時間が2秒、吸煙間隔が60秒と指定されている。同様に副流煙も副流煙専用の喫煙装置(図-1(C))で捕集することで、たばこ先端から排出される煙成分のほとんどを捕集している。マイルドセブンエクストラライトとマイルドセブンの主流煙測定結果を比較すると各化学物質共に外箱タール・ニコ

チン量と同様にマイルドセブンの方が高くなった。一方で、2つの銘柄の副流煙の測定結果を比較すると各種有害化学物質成分においてほぼ同じ値となった。この結果は、たばこ先端から発生する副流煙が、たばこ外箱表示には依存しないことを示している。次に、副流煙測定結果と主流煙測定結果の比率(SS/MS)を示した。SS/MS比の数値の高さから分かる通り、2つの銘柄ともに副流煙が主流煙より多くの有害化学物質を含むことが分かった。また、マイルドセブンエクストラライトの方が、主流煙



の化学物質量が低いためにこの比率が高くなる傾向が認められた。以上のように、受動喫煙の原因となる副流煙の発生量は、捕集法に係らずほぼ一定であり、主流煙より数倍から千倍以上になることが報告されている³⁾。このことから室内環境下でたばこの喫煙がされた場合、副流煙に含まれる有害化学物質が一気に室内空気に拡散することになり、喫煙者を含む多くのヒトの健康に影響を及ぼし、いわゆる受動喫煙問題へと発展していくことになる。

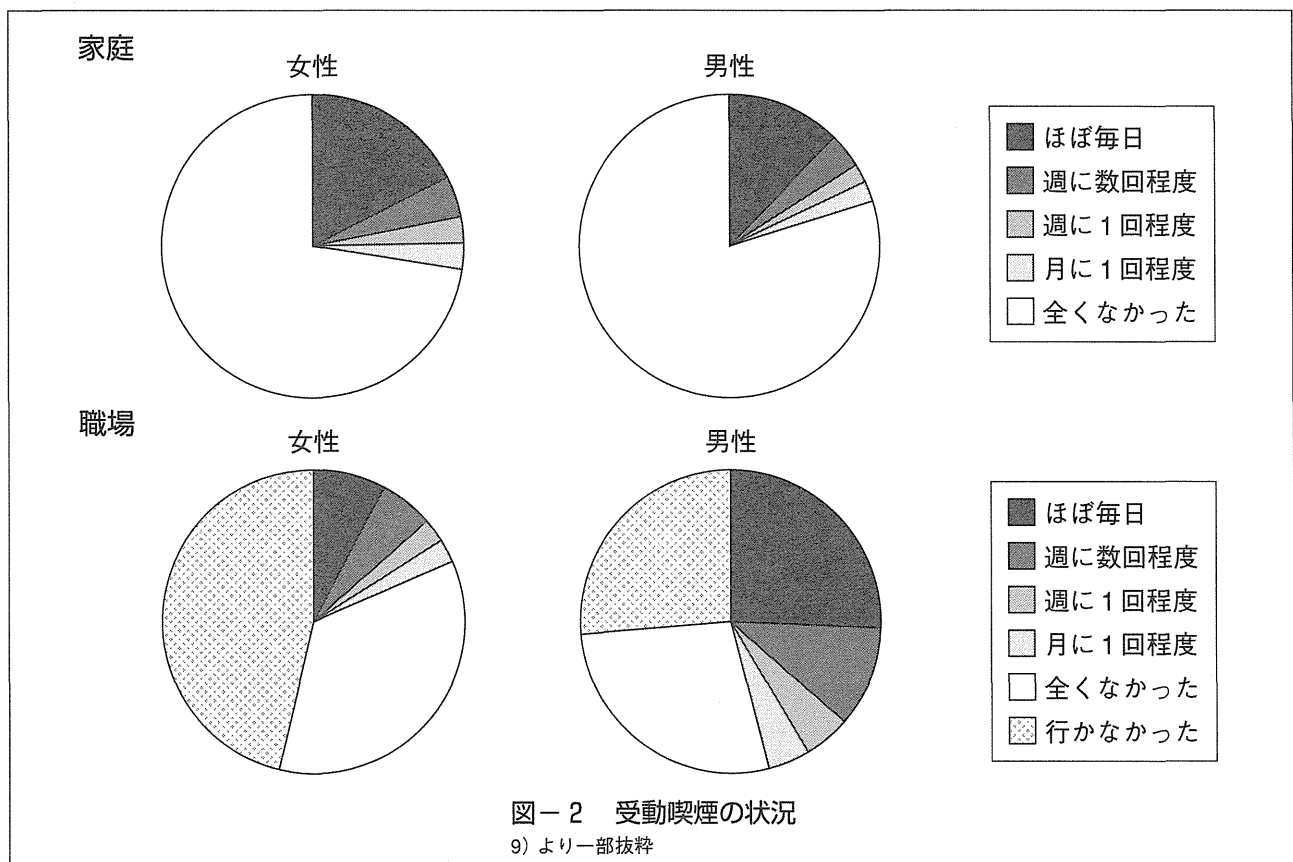
受動喫煙について

ここまで、たばこの煙の有害性について述べてきたが、副流煙に含まれる有害化学物質が室内環境汚染の発生源となり、受動喫煙問題を引き起こしている。次に受動喫煙とその社会背景について説明する。世界的には、受動喫煙はIARCモノグラフ第83号において分類上最上位のグループ1の「発がん性がある」とされ¹⁾、米国の2006年公衆衛生総監報告書「受動喫煙の健康影響」においても各種疾病の原因と報告された⁵⁾。また、我が国も批准している「たばこ規制枠組み条約(FCTC)」の第8条「たばこの煙にさらされることからの保護」には、「屋内の職場、公共の輸送機関、屋内の公共の場所において受動喫煙から保護されるために効果的な措置をとる」の一文が記されている。これらFCTCや先行報告などと合わせて、現況認識として2009年の「受動喫煙防止対

策のあり方に関する検討会」報告書⁶⁾で、「多数の者が利用する公共的な空間については、原則として全面禁煙であるべきである」という基本的な方向性が示された。また2010年2月には、健康増進法第25条に規定された受動喫煙防止対策において上記の全面禁煙とする方向性が、健康局長通知として発出された⁷⁾。さらに2010年5月には、「職場における受動喫煙防止対策に関する検討会」報告書において「快適職場形成という観点ではなく、労働者の健康障害防止という観点から取り組む必要性」⁸⁾と「労働安全衛生法において、受動喫煙防止対策を規定する必要性」が基本的な方向性として示された。このように、我が国を含めた世界各国での受動喫煙に関する科学的研究とそれを受けたたばこ対策が少しずつではあるが進んできている。上記対策を踏まえたうえでの現在の我が国の喫煙、受動喫煙の状況は、2010年「国民健康・栄養調査の概要」によると日本人の喫煙率は19.5%であり、これまでの調査で初めて20%以下となった。一方で、男性の喫煙率は32.2%であり、その内訳は、20-29歳、30-39歳、40-49歳、50-59歳において34.2、42.1、42.4、40.3%と高く3人に1人以上は喫煙をする結果となっている。女性の喫煙率は8.4%であり、その内訳は、20-29歳、30-39歳、40-49歳、50-59歳において12.8、14.2、13.6、10.4%と男性と比較すると低い結果になっている。ここで男性と女性の家庭及

び職場における受動喫煙の状況を図-2に示す。家庭における受動喫煙について「毎日」から「月に1回程度」まで合計した割合は、女性が27.5%と男性が20.2%となり、女性の方が高い結果となっている。また職場における受動喫煙の割合は女性が18.4%、男性が45.9%となり、男性の方が高い結果となっている。以上のことから、日本人全体の喫煙率は毎年徐々に低下しているものの、男性の20-59歳の喫煙率はいまだに高く、喫煙の有害性について認識するための啓蒙普及活動が依然必要であると考えられる。さらに家庭における受動喫煙の割合は女性が高く、職場における受動喫煙の割合は男性が高いことから、家庭、職場と

もに今以上の受動喫煙対策を講ずる必要があると考えられる。しかしながら、たばこの煙にはガス相、粒子相合わせて5300種類以上の化学物質が存在しているため、それら化合物を完全に除去することは困難であるのが実情である。実際に米国暖房冷凍空調学会(American Society of Heating, Refrigerating and Air-conditioning Engineers; ASHRAE)は、2010年の「環境たばこ煙における意見書」¹⁰⁾において家庭における環境たばこ煙を最小限に抑えるために最適な方法は、室内における禁煙を推奨している。今後は、空気環境測定法の高感度化が進むことで、浮遊粉じん濃度と一酸化炭素濃度ばかりではなく、たばこ特有の有害化学物



質であるニコチンをはじめとする各種化学物質の総合結果による評価が確立することが室内環境の衛生対策では望まれる。また、室内環境の基準ばかりではなく、家庭であれば居住者、職場であれば労働者の個人曝露の基準について評価することも必要となってきた。最近の研究報告¹¹⁾では、受動喫煙者の尿中に含まれるニコチン代謝物であるコチニンなどは、尿1mLあたりで0.05ngといった高感度測定で実施されている。今後は、生体試料中に含まれるたばこ特異的なバイオマーカーをもとに受動喫煙の評価をすることも必要となってくるかもしれない。

おわりに

最後に、最近出てきた新しい概念である「三次喫煙」についてご紹介したい。ここまで説明してきた受動喫煙は、たばこの副流煙をはじめとする環境たばこ煙に曝露されることをさすが、三次喫煙とは、副流煙中

に含まれるニコチンなどの化学物質が、室内の壁紙などに吸着し、その後、室内のガス成分と反応し、有害化学物質のニトロソアミンとなって室内に放出され、これを曝露されることを示す¹²⁾。この概念は、比較的新しい概念であり、最近、論文報告¹²⁻¹⁷⁾が増えてきている。しなしながら、まだ我が国における三次喫煙の実態調査は、これからであるため健康影響の評価に関しては今後の研究成果によるものとなる。以上、これまでの喫煙と室内環境の関わりを説明してきた。今後、我が国は、たばこ規制枠組条約を批准し、喫煙による健康影響がより確実に、さらには三次喫煙といった新たなリスクが出てきた現況において、「喫煙と室内環境」について居住者や労働者の健康を確保する視点での対策が急務であると考えている。

今回は、生活環境研究部の小林先生から、「健康・療養とかかわりの深い病院の環境について」の情報提供をしたいと考える。

【筆者紹介】稲葉 洋平 氏

大学院を卒業後、産業技術総合研究所で生体影響を評価するためのバイオマーカー測定法の開発を行う。2008年国立保健医療科学院に移動後は、主にたばこの煙中に含まれる有害化学物質測定法の開発に従事。博士（水産学）。

[参考文献]

- 1) IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 83: 1-1438, 2004.
- 2) Rodgman A, Perfetti TA. Alphabetical Component Index. In: The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. Rodgman A, Perfetti TA, editors. Boca Raton, FL: CRC Press, 1483-1784, 2009.

- 3) 厚生労働省. 平成11-12年度たばこ煙の成分分析について.
<http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/houkoku/seibun.html>
- 4) ISO 3308 Routine analytical cigarette - smoking machine - Definitions and standard conditions, International Organization for Standardization, 2000.
- 5) US Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. 2006.
- 6) 厚生労働省. 受動喫煙のあり方に関する検討会の報告書.
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/dl/h0324-5b.pdf>
- 7) 厚生労働省. 平成22年2月25日付け健発0225第2号号厚生労働省健康局長通知.
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000004k3v-img/2r98520000004k5d.pdf>
- 8) 厚生労働省. 職場における受動喫煙防止対策に関する検討会の報告書.
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000006f2g-att/2r98520000006f47.pdf>
- 9) 厚生労働省. 平成22年 国民健康・栄養調査結果の概要.
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000020qbb-att/2r98520000021c0o.pdf>
- 10) ASHRAE. ASHRAE Position Document on ENVIRONMENTAL TOBACCO SMOKE, 2010.
http://www.ashrae.org/File%20Library/docLib/About%20Us/PositionDocuments/ASHRAE_PD_Environmental_Tobacco_Smoke_2010.pdf
- 11) Goniewicz ML, Eisner MD, Lazcano-Ponce E, Zielinska-Danch W, Koszowski B, Sobczak A, Havel C, Jacob P, Benowitz NL. Comparison of Urine Cotinine and the Tobacco-Specific Nitrosamine Metabolite 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (NNAL) and Their Ratio to Discriminate Active From Passive Smoking. *Nicotine Tob Res.* 13: 202-208, 2011.
- 12) Sleiman M, Gundel LA, Pankow JF, Jacob P III, Singer BC, Destailats H. Formation of carcinogens indoors by surface-mediated reactions of nicotine with nitrous acid, leading to potential thirdhand smoke hazards. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6576-6581, 2010.
- 13) Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Chatfield D, Ma DS, Romero R, Uribe A. Residual tobacco smoke pollution in used cars for sale: air, dust, and surfaces. *Nicotine Tob Res* 10:1467-1475, 2008.
- 14) Winickoff JP, Friebely J, Tanski SE, Sherrod C, Matt GE, Hovell MF, McMillen RC. Beliefs about the health effects of "thirdhand" smoke and home smoking bans. *Pediatrics* 123:e74-e79, 2009.
- 15) Becquemin MH, Bertholon JF, Bentayeb M, Attoui M, Ledur D, Roy F, Roy M, Annesi-Maesano I, Dautzenberg B. Third-hand smoking: indoor measurements of concentration and sizes of cigarette smoke particles after resuspension. *Tob Control* 19:347-348, 2010.
- 16) Burton A. Does the smoke ever really clear? Thirdhand smoke exposure raises new concerns. *Environ Health Perspect* 119:A70-A74, 2011.
- 17) Matt GE, Quintana PJE, Destailats H, Gundel LA, Sleiman M, Singer BC, Jacob III P, Benowitz N, Winickoff JP, Rehan V, Talbot P, Schick S, Samet J, Wang Y, Hang B, Martins-Green M, Pankow JF, Hovell MF. Thirdhand Tobacco Smoke: Emerging Evidence and Arguments for a Multidisciplinary Research Agenda. *Environ Health Perspect* 119:1218-1226, 2011.

Cite this: *Analyst*, 2012, **137**, 4274

www.rsc.org/analyst

PAPER

Reductive amination of glutaraldehyde 2,4-dinitrophenylhydrazone using 2-picoline borane and high-performance liquid chromatographic analysis

Shigehisa Uchiyama,^{*a} Hironari Sakamoto,^b Akiko Ohno,^c Yohei Inaba,^a Hideki Nakagome^d and Naoki Kunugita^a

Received 18th February 2012, Accepted 8th July 2012

DOI: 10.1039/c2an35230c

A typical method for the measurement of glutaraldehyde (GLA) employs 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form GLA–DNPhydrazone derivatives. However, this method is subject to analytical errors because GLA–DNPhydrazone is a quaternary bis-derivative and forms three geometric isomers (*E–E*, *E–Z* and *Z–Z*) as a result of the two C=N double bonds. To overcome this issue, a method for transforming the C=N double bond into a C–N single bond, using reductive amination of DNPhydrazone derivatives, has been applied. The amination reaction of GLA–DNPhydrzones with 2-picoline borane is accelerated with catalytic amounts of acid and is completed within 10 minutes in the presence of 100 mmol L⁻¹ phosphoric acid. Reduction of GLA–DNPhydrazone by 2-picoline borane is unique and results in the formation of *N*-(2,4-dinitrophenyl)-1-piperidinamine (DNPPA). NMR and LC-APCI-MS data confirmed the product identification. DNPPA is very stable and did not change when stored for at least four weeks at room temperature. DNPPA has excellent solubility of 14.6 g L⁻¹ at 20 °C in acetonitrile. The absorption maximum wavelength and the molar absorptivity of DNPPA were 351 nm and 4.2 × 10⁴ L mol⁻¹ cm⁻¹ respectively. Complete separation between the reduced forms of C1–C10 aldehyde DNPhydrzones, including DNPPA, can be achieved by operating the reversed-phase high-performance liquid chromatograph at 351 nm in gradient mode using a C18 amide column. The reductive amination method for GLA overcomes analytical errors caused by *E–E*, *E–Z* and *Z–Z* geometrical isomers.

Introduction

Glutaraldehyde (GLA) is a colorless, oily, liquid-chemical with a pungent odor and is useful for a number of applications. In pathology, GLA is widely used in biological electron microscopy as a fixative.¹ In the health care industry, GLA is often used to disinfect equipment that cannot be heat sterilized. These include dialysis instruments, surgical instruments, suction bottles, bronchoscopes, endoscopes, and ear, nose, and throat instruments. Although GLA is highly effective, it has been associated with a number of serious health problems among employees, including dermatitis and occupational asthma,^{2–5} which sometimes is due to sensitization.⁶

Various analytical methods for measuring GLA in air have been developed. For the most part, they are based on solid substrate sampling and involve the use of derivatizing agents.^{7–9} The derivatization method exploits the reaction of an amino (NH₂) group with a carbonyl (C=O) moiety to form a stable Schiff base (C=N). For the last few decades, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization methods have been established as the most widely used standard procedures for the determination of carbonyl compounds including GLA.^{10,11} Air sampling is performed by diffusion or aspiration over the adsorbent. At the end of the sampling period, carbonyls, including the GLA–2,4-dinitrophenylhydrazone (GLA–DNPhydrazone) derivative, are eluted from the adsorbent. They are analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet¹¹ or by gas chromatography with flame ionization,⁷ electron-capture⁸ or mass spectrometry detection.^{8,9}

However, the traditional method for the measurement of GLA using DNPH to form GLA–DNPhydrazone derivatives is susceptible to analytical errors. This is because GLA–DNPhydrazone is a quaternary bis-derivative and forms three geometric isomers (*E–E*, *E–Z* and *Z–Z*) as a consequence of possessing two C=N double bonds.¹² The formation of isomeric DNPhydrzones from asymmetric carbonyl compounds in the liquid

^aDepartment of Environmental Health, National Institute of Public Health, 2-3-6, Minami, Wako City, Saitama 351-0197, Japan. E-mail: uchiyama@niph.go.jp; Fax: +81-48-458-6270; Tel: +81-48-458-6262

^bChiba City Institute of Health and Environment, 1-3-9, Saiwaicho, Mihama-ku, Chiba City, Chiba 261-0001, Japan

^cDivision of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^dFaculty of Engineering, Chiba University, 1-33, Yayoicho, Inage-ku, Chiba City, Chiba, 263-8522, Japan

phase is well-known.^{13–15} Behforouz and coworkers¹⁶ and Tayyari and coworkers¹⁷ reported that a trace of acid catalyzed the *E–Z* isomerization, which was detected *via* the melting point anomalies it caused. Uchiyama and coworkers¹⁸ reported that purified aldehyde–DNPhydrazone was present only as the *E*-isomer. However under the influence of acid or UV irradiation, both *E*- and *Z*-isomers were seen. The spectra of *Z*-isomers were different from *E*-isomers and the absorption maxima of the *E*-isomers were shorter (5–8 nm) than the corresponding *Z*-isomers. Equilibrium *Z/E* isomer ratios were observed in 0.02–0.2 v/v% phosphoric acid solutions. In the case of saturated aldehyde DNPhydrzones, the equilibrium *Z/E* isomer ratios were 0.14–0.32.¹⁸ In the case of unsaturated aldehyde DNPhydrzones; the equilibrium *Z/E* isomer ratios were 0.018–0.035 for 2-alkenals and 0.13–0.21 for other alkenals.¹⁹ In the case of ketones, the equilibrium *Z/E* isomer ratios were 0.20–0.26.²⁰ Catalytic amounts of acid, such as phosphoric acid, are required for the reaction of DNPH with carbonyl compounds. Therefore, the preparative solution for HPLC analysis is acidic and the problems arising from the presence of multiple isomers described above are inevitable.

In order to resolve the isomeric problem, it is necessary to transform the C=N double bond to a C–N single bond using a reducing agent. Various reducing agents, such as pyridine-borane (pyr-BH₃),^{21–23} sodium cyanohydridoborate (NaBH₃CN),^{24,25} sodium triacetoxyborohydride (Na(OAc)₃BH),^{26–30} titanium(IV) isopropoxide/sodium borohydride (Ti(Oi-Pr)₄/NaBH₄),^{31–34} borohydride exchange resin,³⁵ zinc borohydride/silica gel (Zn(BH₄)₂/SiO₂),³⁶ and phenylsilane/dibutyltin dichloride (PhSiH₄/Bu₂SnCl₂),³⁷ have been developed for this conversion. The choice of the reducing agent is very critical to the success of the reaction since it must reduce imines selectively. Pyridine-borane has been widely used as a reductive amination reagent for aldehydes and ketones.²³ However, this reagent is quite unstable to heat and attempted distillation of the liquid residue at reduced pressures sometimes results in violent decompositions.^{38–40} Thus, extreme care must be taken if this reagent is handled in large quantities. Sato and coworkers⁴¹ have developed an expeditious, easy-to handle and environmentally friendly approach to the synthesis of a variety of amines through a three-component one-pot reaction of carbonyl compounds, amines, and 2-picoline borane. The latter is a thermally stable transparent solid that can be stored on a shelf for months without appreciable loss of reduction capability. The use of 2-picoline borane eliminates the problems encountered with the use of other less stable reducing agents such as pyridine borane.

Recently, we developed a method for transforming the C=N double bond into a C–N single bond, using reductive amination of DNPhydrazone derivatives with 2-picoline borane.⁴² Reductive amination of aldehyde DNPhydrzones is achieved by adding 2-picoline borane to the acetonitrile solution used to elute the DNPH-cartridge. Aldehyde DNPhydrzones (C₁–C₁₀) are completely converted into their reduced forms within 40 minutes in the presence of 1 mmol L⁻¹ 2-picoline borane and 20 mmol phosphoric acid. Then, we applied reductive amination with 2-picoline borane to reduce DNPhydrazone bis derivatives derived from dialdehydes such as glyoxal, malonaldehyde, GLA and succinaldehyde. As a result of this, it was found that reduced forms of glyoxal–DNPhydrazone and malonaldehyde–

DNPhydrazone were not observed, and reduced form of succinaldehyde–DNPhydrazone has the same chemical structure as monoaldehyde derivative. However, in the case of GLA, reduction of GLA–DNPhydrazone does not produce the corresponding bis-DNPhydrazone derivative, but instead the product is consistent with a piperidine ring. This unique reaction was observed only for GLA. Therefore, in this investigation, we have scrutinized the reductive amination process of GLA–DNPhydrazone with 2-picoline borane and applied to the determination of airborne GLA.

Experimental

Apparatus and reagents

The HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) used included two LC-20AD pumps and a SIL-20AC autosampler. Detection was performed with an SPD-M20A photo-diode array detector and a mass spectrometer (API 2000 LC/MS/MS System, Applied Biosystems) with an APCI-interface. The instrument was run in the negative ion mode. An Ascentis Express RP-Amide, 2.7 μm particle size, 150 mm × 4.6 mm i.d. column (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) was used. Two analytical conditions were adopted. The first was used in gradient mode for the analysis of C₁–C₁₀ aldehyde derivatives. Solution A of the mobile phase mixture was acetonitrile–water (45/55 v/v) containing 10 mmol L⁻¹ ammonium acetate and solution B was acetonitrile–water (75/25 v/v). HPLC elution was carried out with 100% A for 5 min, followed by a linear gradient from 100% A to 100% B in 50 min and then held for 10 min. The mobile phase flow rate was 0.7 mL min⁻¹. The second analytical condition was used in isocratic mode for a more effective separation of isomeric GLA derivatives. In this case, the mobile phase mixture was acetonitrile–water (60/40 v/v) containing 10 mmol L⁻¹ ammonium acetate. The mobile phase flow rate was 0.85 mL min⁻¹. The column temperature was 40 °C, the autosampler temperature was 25 °C and the injection volume was 10 μL. NMR spectra (¹H and ¹³C) were measured on a Varian AS 400 Mercury spectrometer (400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C).

The water used in HPLC analysis and sample preparation was deionized and purified using a Milli-Q Water System equipped with a UV lamp (Millipore, Bedford, MA, USA). Acetonitrile (CHROMASOLV for HPLC, gradient grade), phosphoric acid (85% solution in water), 2-picoline borane complex (95%), and ammonium acetate (99.999%) were from Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA. 2,4-Dinitrophenylhydrazine hydrochloride (>98%) was from Tokyo Kasei Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Anhydrous sodium sulfate and hexane (>96%, for HPLC) were from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). For collection of GLA in air, LpDNPH Rezorian cartridges from Sigma-Aldrich Inc. were used.

Synthesis of *N*-(2,4-dinitrophenyl)-1-piperidinamine (DNPPA)

GLA–DNPhydrazone (0.46 g), 2-picoline borane (1 g) and phosphoric acid (7 mL) were added to acetonitrile (500 mL) in a 1000 mL flask. After stirring at 25 °C for 10 min, the solution was concentrated to 30 mL using a rotary vacuum evaporator at 40 °C. The product was then transferred into a 2000 mL separatory funnel together with water (1000 mL) and hexane (1000 mL).

After shaking for 3 min, the aqueous phase was removed. The remaining hexane phase was washed with pure water (5×1000 mL). In order to remove the last traces of water, anhydrous sodium sulfate (50 g) was added to the hexane solution. After shaking for 3 min, the hexane solution was filtered through a paper filter. The filtrate was evaporated to dryness using a rotary vacuum evaporator at 40°C and the dry extract was dissolved in acetonitrile (20 mL). Finally, the extract (DNPPA) was recovered with a continuous flow nitrogen purge technique. The neat DNPPA product has excellent solubility of 14.6 g L^{-1} at 20°C in acetonitrile. The solubility of DNPPA in acetonitrile is about 30-fold higher than that of GLA-DNPhydrazone (0.467 g L^{-1}).

Reductive amination of GLA-DNPhydrazone derivative

Air sample was collected using a DNPH cartridge at a flow rate of 500 mL min^{-1} . After collection, the DNPH-cartridge was eluted with acetonitrile (4 mL). 2-Picoline borane ($100\text{ }\mu\text{L}$ of a 0.1 mol L^{-1} solution in acetonitrile) and phosphoric acid ($500\text{ }\mu\text{L}$ of a 1 mol L^{-1} solution in acetonitrile) were added to the eluent. This was then diluted to a final volume of 5 mL with additional acetonitrile. After 20 min, the solution was analyzed using HPLC.

Results and discussion

HPLC analysis of GLA-DNPhydrazone and its reduced form

Fig. 1 shows the UV spectra of GLA-DNPhydrazone and its reduced form (DNPPA). The spectral profiles of DNPPA and DNPH are very similar and show the same absorption maxima at 351 nm. The molar absorptivities of DNPPA, DNPH and GLA-DNPhydrazone were 1.6×10^4 , 1.4×10^4 and $4.2 \times 10^4\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, respectively. The molar absorptivity of GLA-DNPhydrazone as a bis-derivative is 2.6-fold larger than that of DNPPA or DNPH.

The GLA-DNPhydrazone derivative ($500\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) was prepared in acetonitrile. A 10 mL vial was charged with a 2 mL portion of this solution. Then, 2-picoline borane ($200\text{ }\mu\text{L}$ of a 0.1 mol L^{-1} solution in acetonitrile) and phosphoric acid ($500\text{ }\mu\text{L}$ of 1 mol L^{-1} solution in acetonitrile) were added and the solution

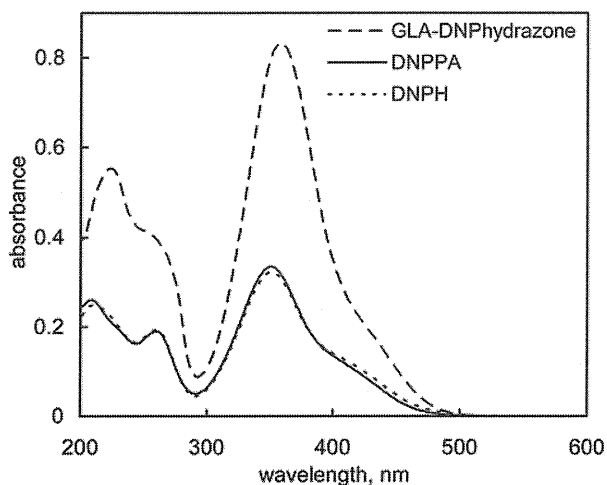


Fig. 1 UV spectra of GLA-DNPhydrazone, DNPPA and DNPH.

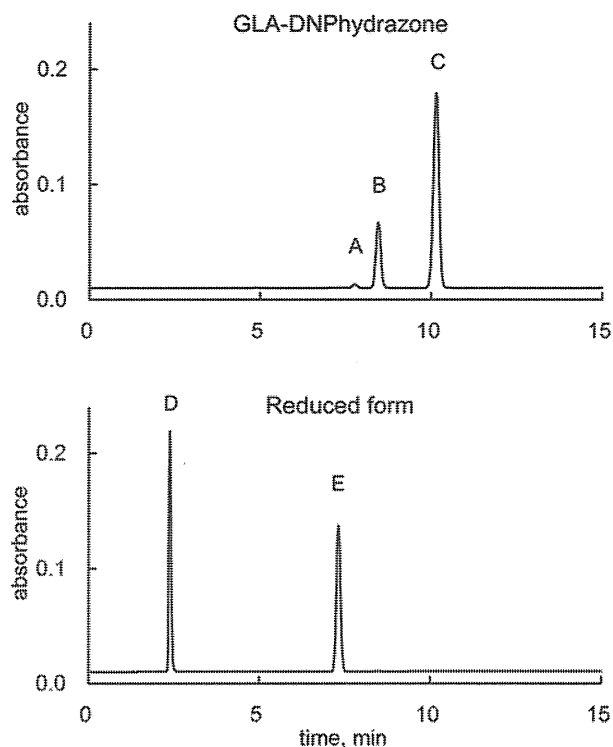


Fig. 2 Chromatograms of the GLA-DNPhydrazone derivative (upper) and its corresponding reduced form (lower). The separation was performed in the isocratic mode. Signals D and E are DNPH and DNPPA, respectively.

was diluted with additional acetonitrile to a volume of 10 mL. After 20 min, the solution was analyzed by HPLC in isocratic mode. Fig. 2 shows the chromatographic profiles of the GLA-DNPhydrazone derivative and its corresponding reduced form. The chromatographic profile of GLA-DNPhydrazone exhibits three peaks—labeled A, B and C. LC-APCI-MS was carried out to identify the five peaks labeled A, B, C, D and E. The mass of peak C (Fig. 3) exhibited the same fragmentation pattern as A and B, with the deprotonated molecule $[\text{M} - \text{H}]^-$ at m/z 459.4. Dialdehydes, such as GLA-DNPhydrazone, may produce mono-DNPhydrazone (M_w : 282.3) and bis-DNPhydrazone (M_w : 460.3) derivatives. However, the mono-GLA-DNPhydrazone was not produced and therefore was not detected. The GLA-DNPhydrazone can exist as three different isomers (*E-E*, *E-Z* and *Z-Z*). Purified aldehyde-DNPhydrazone derivative samples contain only the *E*-isomer. However, the *E*-isomer can partially convert to the *Z*-isomer upon exposure to UV irradiation or addition of acid.¹⁸ In a freshly prepared GLA-DNPhydrazone standard solution containing no acid, the geometric isomer ratios are A: 0.00, B: 0.12 and C: 0.88. However in an acidic solution, the isomer ratios change to A: 0.01, B: 0.23 and C: 0.76. The quantitative analysis of carbonyl compounds, including GLA, in air or water using DNPH is usually conducted in the presence of an acid catalyst. Consequently, the air sampler extraction solution prepared for HPLC analysis will contain both *E*- and *Z*-isomers.

When 2-picoline borane was added to the solution, new peaks for the reduced form of GLA-DNPhydrazone, including three isomers, initially appeared in front of the corresponding DNPhydrazone peaks. Ultimately, all of the DNPhydrazone