ポリ塩化ナフタリン (PCN) の環境汚染に関する研究 (第2報)
ガスクロマトグラフィーによる生体試料中の PCN 定量法¹⁾

竹下隆三,^{2a)} 吉田 博^{2b)}

国立公衆衛生院衛生薬学部,^{2a)} 関東学院女子短大^{2b)}

Studies on Environmental Contamination by Polychlorinated Naphthalenes(PCN). II.
Determination of PCN in Biological Samples by Gas-Liquid Chromatography¹⁾

RYUZO TAKESHITA^{2a)} and HIROSHI YOSHIDA^{2b)}

*The Institute of Public Health, Department of Public Health Pharmaceutics^{2a)}
and Kanto-gakuin, Womens Junior College^{2b)}*

(Received May 24, 1977)

A method for gas-liquid chromatographic determination of polychlorinated naphthalenes (PCN) in biological samples were investigated. This method is based on saponification of the sample with an alkaline ethanolic solution, extraction of PCN with hexane, treatment of the extract with concentrated sulfuric acid, clean-up of the extract by silica gel column chromatography, the separation from polychlorinated biphenyls by thin-layer chromatography on polyamide, and then the determination by gas-liquid chromatography using an electron-capture detector.

Fatty biological samples fortified with PCN at a level of 10 ppb were analyzed by this method, with recoveries of 83.6—89.3 %.

Keywords—column chromatography ; determination ; polychlorinated naphthalenes (PCN) ; ECD-GLC ; biological samples ; clean-up ; polychlorinated biphenyls (PCB) ; polyamide-TLC ; saponification

緒 言

PCN の生産はわが国では既に中止されているが、その輸入量は不明であり、加えて利用された PCN がどのように環境に放出されているかは全く明らかにされていない。

ポリ塩化ビフェニル (PCB) に性質が類似する PCN が環境を汚染するときは、生態系へとその影響が波及することが予想され、PCN の環境中の動態なかでも蓄積性に関する情報が必要となる。

著者らは既に薄層クロマトグラフィーによる PCN と PCB の分離法を確立し、水中の低レベルにある PCN の濃縮方法と合わせて報告したが、³⁾生体試料特に脂質を多量に含む試料について PCN を分析する場合には、PCN

を脂質から分離することが大きな課題である。

生体試料中の PCB の分析においてはアセトニトリル—ヘキサン分配あるいはアルカリによる齡化处理により脂質除去がなされている。⁴⁾ 後者は前者よりも操作が簡便であり、また脂質除去効率も優れていることから有機塩素系農薬を同時に分析する必要がある時には積極的に後者の処理法が選択される。

著者らは脂質齡化处理における PCN の安定性およびシリカゲルクロマトグラフィーにおける PCN の挙動を調べ、不齡化物除去のための硫酸処理およびポリアミド薄層クロマトグラフィーによる PCN と PCB の分離方法を組み合わせ、生体試料中の PCN の分析法を確立した。

1) 本報告は日本薬学会第97年会、東京、昭和52年4月発表。

2) Location ; a) Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo (東京都港区白金台4丁目6番1号) ; b) Mutsuura-machi, Kanazawa-ku, Yokohama (横浜市金沢区六浦町4834)。

3) 竹下隆三、吉田 博、衛生化学、**23**, 359 (1977)。

4) PCB 等汚染防止に対処するための分析法に関する特別研究報告書 (科学技術庁研究調整局), 1973。

実験の部

I. 標準操作法

試薬 ① PCN: PCN 標準品 (和光純薬規格一わが国で工業的に生産された PCN を、環境汚染物質分析における基準物質として販売している)。

② PCN 標準溶液: PCN 標準品をヘキサンに溶かし、10—100 ppb 溶液を調製する。

③ ヘキサン、エタノールおよびメタノール: 残留農薬分析用 (和光純薬)。

④ 水酸化カリウム: 試薬特級 (和光純薬) をヘキサンで洗浄する。

⑤ 炭酸水素ナトリウム: 同上。

⑥ 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用 (和光純薬)。

⑦ 硫酸: 試薬特級 (和光純薬) をヘキサンと振り混ぜて洗う。

⑧ 水: 水道水をヘキサンと振り混ぜて洗う。

⑨ シリカゲル: シリカゲル S-1 (和光純薬) を 130°, 1 昼夜加熱し、乾燥剤を入れたデシケーター中に貯える。

⑩ ポリアミド薄層: ポリアミド 11 F₂₅₄ (メルク) を薄層クロマトグラフィー操作における 15 分間薄層懸垂操作を省略し、ヘキサンを展開溶媒とし 15 cm 展開する。展開後、風乾し使用する。展開後の薄層は長時間室内に放置しないようにする。

⑪ *p*-フェニルフェノール溶液: *p*-フェニルフェノール (試薬 1 級, 東京化成) 1 mg をアセトン (試薬特級, 和光純薬) 20 ml に溶かす。

器具および装置 ① クロマト管: 内径 1 cm, 長さ 10 cm のコック付クロマト管。

② 小クロマト管: 駒込ピペット球部下 5 cm の位置を加熱して引き伸ばし、先端口径 2 mm としたもの。

③ 展開槽: ハンギング式展開槽 204 型 (東洋科学産業)。

④ 紫外線照射ランプ: 紫外線 (253.6 nm) を照射できるもの (マナスル化学工業)。

⑤ ガスクロマトグラフィー用カラム: ガラスカラム (内径 3 mm, 長さ 1.5 m) に 2% シリコン OV-225 (または OV-1)/Gas Chrom Q (100—120 メッシュ) を充填し、250° において 48 時間エージングしたもの。

操作法 ① 齢化——動物組織は肉挽きで細かく切り刻みその 25 g を、脂肪組織は細切しその 5 g を採取する。これを 200 ml ナス型フラスコに入れ、0.5 N 水酸化カリウム・エタノール溶液 100—150 ml を加え、還流冷却器を付し、水浴上で 60—90 分間加熱還流させる。齢化終了後、分液漏斗に移し、フラスコ内をヘキサン 100 ml で

洗い、洗液を分液漏斗に移す。

ヘキサン抽出および硫酸処理——齢化に用いた 0.5 N 水酸化カリウム・エタノール溶液の液量の 2 倍量の水を分液漏斗に加え、振り混ぜて抽出する。下層を別の分液漏斗に移し、ヘキサン 100 ml で同様に抽出する。全抽出液を合わせ、1 N 水酸化カリウム溶液 100 ml ずつで 2 回振り混ぜて洗浄し、さらに水 50 ml ずつで 3 回洗う。ついで硫酸 10 ml を加え、1 分間激しく振り混ぜて洗浄する。この硫酸処理は硫酸層が淡黄色となるまで洗浄を繰り返す (通常 3—4 回)。ヘキサン溶液を別の分液漏斗に移し、水 50 ml で洗った後、炭酸水素ナトリウム 1 g を加えて振り混ぜ、さらに無水硫酸ナトリウム適量を加えて脱水する。ヘキサン溶液をクデルナ・ダニッシュ型 (K. D.) 濃縮器を用いて約 5 ml に濃縮する。

シリカゲルクロマトグラフィー——シリカゲルをヘキサンを用いてカラム (内径 1 cm, 高さ 10 cm) を調製し、この上に無水硫酸ナトリウムを 1 cm 積層させる。このカラムに前項で得た濃縮液をのせ、濃縮器リシーブフラスコ内を少量ずつのヘキサンで洗いながら順次カラムにのせる。さらにカラム上部に分液漏斗を接続し、ヘキサン 120 ml を用いて溶出を続ける。全溶出液 100 ml を分取し、K. D. 型濃縮器を用いて濃縮する。この濃縮液をリシーブフラスコ下部が内径 3 mm, 長さ 2 cm のものを用いて室温または水浴中に浸し、エバポレーターを用いて濃縮する。K. D. 型濃縮器リシーブフラスコ内を少量ずつヘキサンで洗い、先のフラスコに移し濃縮し、殆んど乾固させる。

薄層クロマトグラフィーによる PCN と PCB の分離とガスクロマトグラフィー用試料溶液の調製——前報³⁾の同項に従って操作する。

ガスクロマトグラフィーによる定性および定量——ガスクロマトグラフ装置の注入口、カラムおよび検出器温度をそれぞれ 230°, 180° および 250° に設定し、キャリアガス (超高純度窒素) 流量を 1 分間 60 ml とする。

試料溶液 5.0 μ l をガスクロマトグラフィーに付し、得られたガスクロマトグラム上の各ピークの保持時間を PCN 標準溶液から得られたそれと比較して定性し、また試料溶液から得られた各ピーク高の総和を求め、検量線法により定量する。

II. 実験方法の検討

1. PCN のアルカリに対する安定性 0.5 N および 1 N 水酸化カリウム・エタノール溶液それぞれ 100 ml に PCN 1 ppm ヘキサン溶液 1.0 ml (PCN として 1 μ g) を加え、水浴上で加熱還流し、加熱時間を 30 分, 60 分, 90 分および 120 分とした。加熱終了後直ちに冷却し、各

試料に水 200 ml を加え、ヘキサン 100 ml および 50 ml を用いて 2 回抽出し、抽出液を合わせ標準操作法における水洗、硫酸処理、水洗、炭酸水素ナトリウム処理および脱水を行なった後、濃縮し、ヘキサンを用いて全量を 10.0 ml とした。各ヘキサン溶液についてガスクロマトグラフィーを行ない、得られたガスクロマトグラム上の各ピークの高さを測定し、PCN のアルカリ・エタノール溶液による加熱時の安定性を調べた。

2. PCN のシリカゲルクロマトグラフィー シリカゲルをヘキサンを用いてカラム (内径 1 cm, 高さ 10 cm) を調製し、PCN 100 ppm ヘキサン溶液 1.0 ml (PCN として 100 μ g) をのせ、ヘキサンにより溶出を行ない、溶出液を 5 ml ずつ分画した。分画液を適宜ヘキサンを用いて希釈し、ガスクロマトグラフィーを行ない、各分画液中の PCN 含有量を測定した。

3. 人体脂肪組織へ添加した PCN の回収率 慶応義塾大学病院において法医解剖された男性 (38 才) の脂肪組織の細切試料 5 g を 200 ml ナス型フラスコに入れ、PCN 10 ppb ヘキサン溶液 5.0 ml (PCN として 0.05 μ g) を添加し、これに 0.5 N 水酸化カリウム・エタノール溶液 100 ml を加えて加熱還流した。

加熱時間を 60 分および 90 分とし、以下標準操作法により PCN を定量した。なお同一人体脂肪組織 5 g について同様 PCN を定量し、添加した試料の PCN 回収率を算出した。

結果および考察

アルカリによる脂質酸化時における PCN の安定性

生体とくに脂肪組織中に取り込まれている PCB などを効率よく抽出するために脂質の酸化が行なわれ、またガスクロマトグラフィーに付される試料溶液中に脂質が含まれるときは、ECD 検出器を用いても妨害ピークとして現われ、加えて検出器の汚染を招くので酸化処理はクリーンアップのために必要である。

酸化処理を PCN 分析に導入するにあたり、PCN のアルカリに対する安定性を知る必要がある。0.5 N および 1 N 水酸化カリウム・エタノール溶液中で PCN を加熱した時の安定性を Fig. 1 に示す。

PCN 標準物質について得られたガスクロマトグラム (Fig. 2) と 0.5 N 水酸化カリウム・エタノール処理を行なったときの PCN のガスクロマトグラムとを各ピークについて比較すると Fig. 3 のようになる。加熱 30 分後においてはピーク No. 10 の物質は急激に減少するが、その他のピークは 10% 以下の変化にとどまる。その後の加熱においても遅い保持時間帯に出現する塩素置換数の多い PCN のピーク (No. 7—10) 高はかなりの減少を続

Fig. 1. Stability of Polychlorinated Naphthalenes (PCN) in Boiling 0.5 N and 1.0 N Potassium Hydroxide Ethanolic Solutions

●—○: 0.5 N potassium hydroxide ethanolic solution.
●---●: 1.0 N potassium hydroxide ethanolic solution.

Fig. 2. Gas-Liquid Chromatogram of Polychlorinated Naphthalenes

Column: 2% Silicone OV-225 on Gas Chrom Q (100—120) mesh (1.5m×3mm I.D.).
Column temp.: 180°, Injection port temp.: 230°,
Detector temp.: 250°.
Carrier gas flow: N₂ 60 ml/min.

けるのに反して、早い保持時間帯に出現する塩素置換数の少ない PCN のピーク (No. 1—4) 高は時間の経過に伴ない増加する傾向が見られる。この傾向はアルカリ濃度が増加すると、より顕著になることが観察された。

Fig. 3. Behaviour of the Components of Polychlorinated Naphthalenes on Heating in 0.5N Potassium Hydroxide Ethanolic Solutions.

The number in this figure shows the peak numbers on the gas-liquid chromatogram in Fig. 2.

この現象は PCN が水酸化カリウム・エタノール溶液中で加熱されるとき、置換基 Cl に対して *o*-および *p*-位の Cl が活性化され、求核交換反応を受けて $-\text{OC}_2\text{H}_5$ に置換したとすると説明しやすい。すなわち塩素置換数の多い PCN 程その反応を受けやすいため、塩素置換数の少ない $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 化 PCN に変換し、それが早い保持時間帯に出現してピーク No. 1—4 におけるピーク高の増大をもたらすものと考えることができる。

Table I に見るように、PCN のガスクロマトグラムにおけるピーク No. 6 以外のピークのピーク No. 6 に対するピーク高比は極めて小さいので、アルカリ処理におけるピーク No. 6 以外の変化は PCN 定量値に大きな影響

TABLE I. Relative Peak Heights of Polychlorinated Naphthalenes to Peak No. 6

Peak No.	Relative peak height
1	0.037
2	0.040
3	0.080
4	0.034
5	0.035
6	1.000
7	0.092
8	0.041
9	0.044
10	0.006

を与えず、その定量値はピーク No. 6 の変化に大きく支配される。

このように PCN がアルカリに対して必ずしも安定ではないことを考慮すると、生体試料の齢化に際し、(1)試料を出来るだけ細切し、(2)用いるアルカリ溶液のアルカリ濃度を高めず、液量を必要に応じて増加させること、あるいは(3)抽出率に問題はあるが、PCN を脂質と同時に抽出した後、齢化を行なうことも必要であろう。

PCN のシリカゲルクロマトグラフィー

シリカゲルカラム (内径 1×10 cm) における PCN のヘキサンによる溶出挙動を Fig. 4 に示す。PCB 統一分析法⁴⁾における PCB のクリーンアップにおいても同様の担体、カラムベッドサイズおよび溶出溶媒が用いられ、PCB の溶出画分は 20—120 ml であると記載されている。

Fig. 4. Elution Pattern of Polychlorinated Naphthalenes from a Silica Gel Column (10 x 1 cm I.D.)

PCN 100 μg のカラム負荷において、PCN は PCB よりやや早く溶出する傾向が観察されるが、PCB との分離は全く期待できない。さらに実際の試料の場合は担体の活性度の変動および共存物質により PCN の溶出パターンが変動することが予想されるので溶出液の分取は初めから行なうことが必要である。したがってこのクロマトグラフィーは PCN より極性の大きい物質の除去のみに役立つことになる。

人体脂肪組織に添加された PCN の回収率

人体脂肪組織 5g について標準操作法に従って操作し、試験溶液 5.0 ml とし、ガスクロマトグラフィーにより PCN を定量した。さらに同一試料 5g に PCN 50 ng (試料中 PCN 濃度 10 ppb) を添加し、標準操作法における齢化時間を 60 分間および 90 分間とし、それぞれの回収率を測定した。

前報において PCN ヘキサン溶液を硫酸と振り混ぜた

とき、PCN は全く安定であることを報告した。一方、脂肪組織 5g の齡化处理後の抽出液についてこの処理を適用するとき、硫酸処理を繰り返すにつれて硫酸層は黒褐色～茶色～黄色に変わり、この処理が不純物除去に役立つことが知られた。ついでシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ない、PCN 画分から溶媒を留去したとき、残留物の重量は約 3mg であり、かなり良好にクリーンアップされたことが知られた。この残留物が多い試料の場合には用いるポリアミド薄層の枚数をふやし、一枚当りの負荷量を下げて PCN と PCB の分離再現性を確保する必要がある。

無添加試料から得られたガスクロマトグラムは PCN 保持時間帯に小さな数個のピークを認めるのみであった。また脂肪組織を用いない全工程におけるブランク試験においては特に PCN のピークに妨害となるピークは観察されなかった。

TABLE II. Recovery of Polychlorinated Naphthalenes Added to Human Adipose Tissue

PCN added (ng)	Recovery (%)
50.0	84.8 ^{a)}
50.0	83.6 ^{a)}
50.0	88.8 ^{b)}
50.0	89.3 ^{b)}

^{a)} and ^{b)} show recoveries obtained when the tissues were saponified with 0.5N potassium hydroxide ethanolic solutions for 60 min and 90 min, respectively.

PCN 10 ppb 添加試料についての回収率を Table II に示す。試料のけん化の際の加熱時間を60分間および90分間とした場合の回収率には差が見られなかった。これらの試料について得られたガスクロマトグラムは PCN 標準物質のパターンによく一致し、クリーンアップならびに PCB との分離も良好に行なわれたことを示している。

結 論

生体試料中に含まれる PCN を ECD ガスクロマトグラフィーにより定量する方法を確立した。この方法は、(1)アルカリによる脂質のけん化、(2)PCN の抽出、(3)硫酸処理、(4)シリカゲルカラムクロマトグラフィー、(5)ポリアミド薄層クロマトグラフィーおよび(6)ガスクロマトグラフィーからなっている。

試料のけん化は PCN を数%損失させるが、脂質除去、抽出率の向上と分析操作全般における能率向上の利点を評価することが出来る。一方 PCN は硫酸に対して全く安定であり、シリカゲルクロマトグラフィーと合わせて妨害物質の除去に極めて有効であった。この段階においては一般に PCB が混入し、PCB を PCN と分離しなければならない。これはポリアミド薄層クロマトグラフィーにより解決することが出来た。

人体脂肪組織に PCN を 10 ppb 添加した時の上記操作方法による回収率は平均 86.6% であった。回収率においてやや低い結果を与えているが、本法は生体試料中の PCN 分析方法として推奨し得る方法であると考えられる。