〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
27 (5) 285-295 (1981)

生理食塩水中でのエチレンオキシドの長期間加温中に生じる
エチレンクロロヒドリン, エチレングリコールおよび
その他の反応生成物の定性的および定量的知見¹⁾

新谷英晴, 鈴木 宏, 大場琢磨
国立衛生試験所 療品部

Qualitative and Quantitative Aspects of Ethylene Chlorohydrin,
Ethylene Glycol and the Other Reaction Products of Ethylene
Oxide in Saline during the Prolonged Incubation¹⁾

HIDEHARU SHINTANI, HIROSHI SUZUKI
and TAKUMA OBA

National Institute of Hygienic Sciences, Department of Medical
Sciences,²⁾ 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo

(Received June 13, 1981)

Ethylene oxide (EO) is widely used as sterilizer for many products including medical devices which are to be brought into direct contact with body fluid. Chemical change of EO in saline was investigated in relation to its residual toxicity.

EO was dissolved in saline (pH 5.8) to give the final concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ and the solution was warmed at 40°C for various periods. Formation of various compounds from EO and their quantitative changes were studied qualitatively and quantitatively by using gas-liquid chromatography, mass spectrometry and chemical test. Changes of the amounts with time for 24 hours of ethylene chlorohydrin (ECH) and ethylene glycol (EG), which are both members of the main products from EO in saline, were as follows: amount of EG was smaller than that of ECH for the initial 7.5 hours, and it was greater than that of ECH for the remainder of the experimental period. Amount of EG increased markedly from hour 16 and reached about 140 $\mu\text{g/ml}$ at hour 21, while amount of ECH reached its maximum (50 $\mu\text{g/ml}$) at hour 16 and thereafter decreased gradually. The pH of the solution rose rapidly to about 10.3 for the initial 8 hours, and thereafter kept constant. These results suggest that EG was mainly formed directly from EO through the addition of H^+ to EO for the early period, and that EG was mainly formed from ECH through the substitution of Cl in ECH by OH under basic conditions for the later period.

Formation of the two compounds which have not been reported to be formed from EO was found after hour 8. These compounds were identified as β -hydroxyethoxy acetaldehyde and its tautomer, monohydroxy dioxan. They seem to be formed by oxidation of diethylene glycol, which was produced by the addition of EO to EG, with air.

As oxidation products of EG, glyoxal and glycolaldehyde monomer were detected after hour 8, and then glyoxylic acid, and glycolic acid were detected in a week.

Acetaldehyde, rearrangement product of EO, was also detected.

Keywords—ethylene oxide; ethylene glycol; ethylene chlorohydrin; saline; gas-liquid chromatography; gas chromatography-mass spectrometry; β -hydroxyethoxyacetaldehyde; monohydroxy dioxan; oxidation products of ethylene glycol; acetaldehyde

緒 言

滅菌剤として広く使用されているエチレンオキシド (EO) の残留量に関して FDA 等より規制の提案がな

されている。²⁾ EO の反応生成物であるエチレンクロロヒドリン (ECH) も毒性が強くその生成および残留は重大な問題である。²⁾ EO が軟質ポリ塩化ビニル (PVC)

中の塩素イオンと反応して ECH を生成することが報告されている。³⁾ 従って医療用具中の残留 EO が血液中の塩素イオンと反応して ECH を生成することが考えられる。それゆえ血液にかえて生理食塩水を用いた場合でも EO からの ECH の生成が予想される。⁴⁾ しかし、生理食塩水中での EO の ECH および エチレングリコール (EG) への長時間にわたる経時変化をガスクロマトグラフィ (GLC) で測定した報告はない。それゆえ我々は体温に近い 40°C に加温した生理食塩水中での EO から ECH および EG への 24 時間にわたる経時変化を GLC を用いて検討した。その結果、これまでに報告されていない ①10 数時間目以降の EG の存在量⁵⁾ (量) の顕著な増大, ②EG 量のシグモイド型の増加, および ③ECH 量の経時的減少を見出した。

また EO 滅菌した医療用具から検出される化合物⁶⁾ および EO あるいは EG の水中での反応生成物⁶⁾ としては報告されていない。EG とほぼ同じ GLC の保持時間 (*t_R*) を有する化合物およびその互変異性体の生成を同時間内に見出した。さらに 24 時間以上の加温で EG が酸化されて生じたと考えられる化合物⁶⁾ も検出した。これらの化合物に関して検討したので合わせて報告する。

実験方法

1) 試薬 β -ハイドロキシエトキシアセトアルデヒド: Seidlitz⁷⁾ および Gierer⁸⁾ の方法で合成した。さらに Gierer⁸⁾ および Summerbell⁹⁾ の方法により 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとし、その融点を測定したところ、136—137°C であって文献値 (136°C)⁹⁾ とよく一致することが確かめられた。

モノヒドロキシジオキサン: Seidlitz⁷⁾ Palomaa¹⁰⁾ および Parham¹¹⁾ の方法により合成した。この化合物の性状に関しては成書¹²⁾を参考にした。

ヨウ素-ヨウ化カリウム水溶液: 市販試薬特級を使用した。ヨウ素 10 g, ヨウ化カリウム 20 g を水 80 ml に溶解した。

アセトアルデヒド: 市販試薬一級を使用した。

その他の試薬は市販試薬特級を使用した。

2) 装置 GLC: 島津 GC-6AM を特に断らない限り下記の条件で使用した。

カラム: ガラス製, 3 mm × 200 cm

液相: PEG 20 M, 3% (w/w)

担体: Chromosorb W/AW (80—100 メッシュ)

検出器: FID

キャリアーガス: 窒素ガス, 20 ml/min

カラム温度: 180°C

ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS): 島津

LKB-7000 を下記の条件で使用した。

GC 条件 GLC と同様。

MS 条件

電子エネルギー: 70 eV

イオン化電流: 60 μ A

pH メーター: 電気科学計器 HG-3

ヘッドスペースボトル: 杉山元伸

3) 実験操作 500 μ g/ml の EO を含有する生理食塩水 10 ml を数個の耐圧容器 (ヘッドスペースボトル,¹³⁾ 容量 20 ml) にそれぞれ入れ、シリコンゴム栓で密栓し 40°C に加温した。反応開始後各時間経過毎に、サンプリングのつど容器を変えてシリコンゴム栓を通して注射器で内容液を採り、これを試料 1 とした。これをそのまま GLC の試験液とした。ECH および EG をガスクロマトグラムのピーク面積より絶対検量線法で定量した。

EO を含む生理食塩水 (pH 5.8) 中で生成する EG および ECH 以外の化合物の同定は、GLC, GC-MS および化学的手段を用いて行なった。

結果および考察

1) 生理食塩水中での ECH 量および EG 量の経時変化

EO と ECH および EG の間の反応についての報告⁶⁾ を Chart 1 にまとめた。また EO に酸を加えて EO から ECH および EG への転換¹⁴⁾ または EO に塩基を加え

Chart 1 Reactions of Ethylene Oxide (EO), Ethylene Chlorohydrin (ECH), and Ethylene Glycol (EG) in Saline

* Sulfuric acid, added to adjust the saline to pH 3.1, reacts with EO as follows and H⁺ from sulfuric acid accelerates the reaction (4) and (1).

It has been reported that metal ions such as Fe³⁺, Mg²⁺, or Cu²⁺ accelerate the reaction (4) and (1) as catalysts.²³⁾

Fig. 1. Changes of Amounts of Ethylene Chlorohydrin (ECH) and Ethylene Glycol (EG) and Change of the pH in the Saline during the Incubation Period

Saline, initially adjusted to pH 3.1, 5.8, or 10.1 and containing 500 μg of ethylene oxide per ml, was warmed at 40°C for 24 hours.

Symbols Lines
 □: pH ——— initial pH 3.1.
 ○: EG - - - initial pH 5.8.
 △: ECH ..... initial pH 10.1.

(b) is the magnified figure of the lower left part of (a).

TABLE I. Range of Linearity, Detection Limit and Coefficient of Variation (CV) of the Determination of Ethylene Oxide (EO), Ethylene Chlorohydrin (ECH) and Ethylene Glycol (EG) by the Gas-Liquid Chromatography

Compound	Range of linearity (μg/ml)	Detection limit (S/N ratio=2, $\times 10^{-9}$ g)	CV (%)
EO	5—5000	6.9	—
ECH	5—5000	2.5	2.8 (n=12)
EG	5—5000	6.7	6.0 (n=9)

てEO からEG への転換¹⁵⁾に関する反応速度論的考察はすでになされているが、Chart 1の(1)から(4)の反応をすべて包括した生成速度論的考察はなされていない。¹⁶⁾

予試験において、生理食塩水 (pH 5.8) 中でEO からのECH およびEG の生成と同時にpH が上昇する (最大値ほぼ10に達して一定となる) ことを見出した。

そこでChart 1の反応(1)から(4)のECH およびEG 生成に対する寄与の多少とそれに及ぼすpHの影響を考察するために、生理食塩水 (pH 5.8) およびそれより低いpH (3.1), 高いpH (10.1, 上記の到達pH とほぼ等しくした) に調整した生理食塩水にEO を溶解加温 (40°C) しEG 量, ECH 量およびpH (これら経時的に変化するpH に対し, 上記の, 初めに調整したpH を以後初期pH と呼ぶ) を経時的に測定して (Fig. 1) 相互に比較した。またEG およびECH の検出限界および変動係数をTable I に示した。

(1) 7.5時間目までのECH 量およびEG 量の経時変化 [初期pH 3.1の場合] EG の量はECH の量より多かった。5時間目まではEG の増加速度¹⁷⁾はECH の増加速度より大きい, それ以降 (10時間目まで) はECH の増加速度はEG の増加速度より大きかった。

[初期pH 5.8および10.1の場合] EG の量はECH の量より少なかった。2時間目まではEG の増加速度は

ECHの増加速度より小さく、4時間目まで両者はほぼ等しくそれ以降前者は後者より大きかった。7.5時間目でEGの量はECHの量に等しくなった。

初期 pH 3.1 の場合は初期 pH 5.8 および 10.1 の場合より EG および ECH の量が多かった。これは Chart 1 の反応(1)および(4)が H^+ の添加で促進されたためと考えられる。また、化学量論が支配的ならば OH^- あるいは添加した HSO_4^- と、 Cl^- との濃度比¹⁸⁾ から、EG より ECH の方が多くなると考えられるが、 HSO_4^- あるいは OH^- の方が Cl^- より反応性に富んでいる¹⁹⁾ ため EG 生成反応の方が優勢になると考えられる (HSO_4^- と EO との反応は Chart 1 の脚注を参照)。

初期 pH 5.8 の場合も初期 pH 3.1 の場合と同様に H^+ 付加反応がまず起こり、ついで反応(1)で ECH が、反応(4)で EG が生成すると考えられる。前記した OH^- と Cl^- の反応性の差によるよりも化学量論の寄与により²⁰⁾ ECH の量が EG の量より多かったと考えられる。

初期 pH 10.1 の場合は初期 pH 3.1 および 5.8 の場合と比べて H^+ の濃度が低いため H^+ 付加反応 (酸触媒による S_N2 反応²¹⁾) は起こりにくく、ECH および EG の量は少なかったと考えられる。塩基性条件下での EG 生成は、塩基触媒による S_N2 反応²¹⁾ によるものが主であると考えられる。初期 pH 10.1 の場合の EG 量が初期 pH 3.1 の場合の EG 量より少ないことから、塩基触媒による S_N2 反応での EG 生成は酸触媒による S_N2 反応での EG 生成よりも少ないと考えられる。

ECH の量が少ない時点では EG 生成は反応(4)を経て起こると考えられる。一方、反応(1)と(3)を経て EG が生成する経路も存在すると思われる。すなわち、反応(1)で ECH と OH^- が生成し、^{4,6,14)} これらの濃度が反応(3)が進み得る濃度に達した時点から反応(3)により EG が生成して来る²²⁾ と考えられる。しかしながら初期 pH 3.1 の場合は OH^- の濃度が、初期 pH 5.8 および 10.1 の場合は ECH の濃度が反応(3)が進み得る濃度に達していないため、7.5時間以前では反応(3)による EG 生成は少ないと考えられる。また反応(1)と(3)が等量起こるとすれば pH は一定に保たれると考えられる。

(2) 7.5時間目以降24時間目までのECH量およびEG量の経時変化 [初期 pH 3.1 の場合] EG の量は ECH の量より多かった。増加速度は (6時間目から) 10時間目までは ECH の方が大きく、それ以後は EG の方が大きかった。

[初期 pH 5.8 の場合] EG の量および増加速度とも ECH のそれらより大きかった。ECH の量は16時間目を最高にして以後わずかに漸減していった。

[初期 pH 10.1 の場合] EG の量および増加速度とも ECH のそれらより大きかった。

EG の量はシグモイド型に増加した。EG 増加曲線の傾きが減少する範囲 (プラトー) の傾きは、初期 pH が低いほど小さかった。ただし、初期 pH 10.1 の場合はプラトーは明瞭には認められなかった。またプラトーを境にして、その前後で増加曲線の傾きに変化がみられ、プラトー以後、傾きがプラトー以前の傾きより初めて大きくなる時期は初期 pH が高いほど早いと考えられる。ただし初期 pH 3.1 の場合はプラトー以後の EG 増加曲線の傾きはプラトー以前のそれよりも小さかった。初期 pH 3.1 の EG 増加曲線のプラトーの終了時点である 10 時間目の pH は、初期 pH 5.8 の場合の 5 時間目の pH とほぼ等しかったので、初期 pH 3.1 の EG 増加曲線の 10 時間目以降と初期 pH 5.8 の EG 増加曲線の 5 から 10 時間目とで、それぞれの曲線の平均の傾きを比較したところ両者の傾きはほぼ等しかった。それゆえ上記の期間の両者の EG 生成過程は類似していると考えられ、従って初期 pH 3.1 の EG 増加曲線のプラトー以後の傾きが初期 pH 5.8 の EG 増加曲線のプラトー以後の傾きと等しくなるのは、初期 pH 3.1 の場合、実験期間後になると推察される。

プラトー前後で EG 増加曲線の傾きが変化したのは、反応開始直後よりプラトーの前までは反応(3)が起こり得る OH^- 濃度あるいは ECH 濃度に達していないため反応(4)による EG 生成が、プラトーの後では反応(1)により ECH と OH^- が増加し、反応(3)が起こり得る濃度に達した時点で反応(3)による EG 生成が進行したと考えられる。すなわち OH^- 濃度あるいは ECH 濃度、もしくはその両方が反応(3)を進める決定因子となっていると思われる。初期 pH 3.1 の場合の EG 量の増加には OH^- 濃度が、初期 pH 5.8 の場合の EG 量の増加には両方の濃度が、初期 pH 10.1 の場合の EG 量の増加には ECH 濃度がそれぞれ決定因子となっていると考えられる。ここで反応(1)と反応(3)が同時に等量起こるとすれば pH に変化がみられないことになると考えられる。

一方、プラトー以後における ECH は Fig. 1 に示した実測値よりも実際は多く生成したと推察されるが、その生成した一部は反応(3)で EG に変化するため ECH 存在量 (=生成量 - 変化量)⁹⁾ はほぼ一定ないし漸減したと考えられる。

ここで興味深いことに、初期 pH がいずれの場合でも反応開始後約 14 時間目から反応系の pH はほぼ同じ値 (約 pH 10) に収れんするので、pH は動的に一定値をとると考えられる。これは前述のとおり反応(1)と反応(3)

が同時に等量起こっているためと考えられる。

以上の結果 EG 生成には、①主として初期 pH 3.1 の場合の 7.5 時間目までで考えられる H^+ 付加によるもの（酸触媒による S_N2 反応）と、②主として初期 pH 10.1 の場合に考えられる 塩基触媒による S_N2 反応によるもの（主に 7.5 時間目まで）と、③塩基性条件下で考えられる ECH を経るもの（反応(3). 主として 10—16 時間目以後）とがあると考えられる。①、②、③の EG 生成への寄与の多少は、増加曲線 (Fig. 1) の傾きの比較により、①の寄与 > ③の寄与 >> ②の寄与と考えられる。

初期 pH 5.8 の EG 増加曲線の 16 時間目以後 (EG 生成は主として反応(3)による) と 7.5 時間目まで (EG 生成は主として反応(4)による) の各傾きを比較したところ、前者の傾きは後者の傾きよりも大きく、このことから反応(1)を経由しての反応(3)による EG 生成が、反応(4)による EG 生成よりも大きいと考えられる。16 時間目以後では 7.5 時間目までに比べて EO 濃度が小さく (EO の一部はすでに EG あるいは ECH に変化している)。EO 濃度についての化学量論からいえば EG の増加速度はより小さくなるはずであるが、実際はより大きかった。このことは前述の反応(3)の寄与が大きいということを支持すると考えられる。

反応開始後 10—16 時間目 (初期 pH により異なる) に降 EG 量が急激に増大していったこと、および ECH 量が EG 量の増大に対し、EG 量より低い値でほぼ一定かあるいは経時的に緩慢に減少していったという実験結果は、毒性の強い ECH²⁾ の生理食塩水中での残留の問題を考察する際の重要な実験事実を提供するものと考えられる。

またアルカリ金属、鉄、銅などの金属イオンが触媒となって反応(1)あるいは(4)を促進することが報告されている。²³⁾ 血液にはこれらの金属イオンが多量存在する²⁴⁾ため、血液中では生理食塩水中よりも、同量の EO からより多くの ECH および EG が生成すると予想される。

2) 初期 pH 5.8 の生理食塩水中で EO から生成する ECH および EG 以外の生成物について

ECH および EG を含む、EO の生理食塩水中での種々の反応生成物⁶⁾を Chart 2 に示した。ただし、実線で囲んだ部分は本研究により見出された知見であり、破線で囲んだ部分は本研究で検出されなかった化合物である。

(1) ガスクロマトグラム上で EG とほぼ同じ t_R を有する化合物 (x と略) の同定

x は試料 1 中に反応開始後約 8 時間目より出現し、EG 量の増加とほぼ平行して増加し、30 時間目に最大量 (約 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$) となり、以後 1 週間目にもほぼ同量存在

Fig. 2. Gas-Liquid Chromatograms of the Reaction Solution and of the Aqueous Solution of Diethylene Glycol (DEG) aerated with O_2 Gas

a) Saline, pH 5.8 and containing 500 μg of ethylene oxide per ml, was warmed at 40°C for 30 hours.

※ Att. was changed from $10^4 \times 16$ to $10^4 \times 128$.

1 Ethylene chlorohydrin

2 Compound x

3 Ethylene glycol (EG)

b) One % (v/v) of aqueous solution of DEG was aerated with O_2 gas at 40°C for 10 hours.

Att. : $10^4 \times 32$

2 Oxidation product of DEG (found to be identical to x)

3 EG (impurity in the reagent)

Chart 2. Reaction Products of Ethylene Oxide in Saline (pH 5.8)

- I : ethylene oxide.
- II : acetaldehyde.
- III : ethylene chlorohydrin.
- IV : ethylene glycol.
- V : glycolaldehyde monomer.
- VI : glyoxal.
- VII : glyoxylic acid.
- VIII : glycolic acid.
- IX : diethylene glycol.
- X : β-hydroxyethoxy acetaldehyde.
- XI : monohydroxy dioxan.
- XII : 2,5-dihydroxy dioxan (glycolaldehyde dimer).
- XIII : ethanol.
- XIV : oxalic acid.
- XV : dioxan.

Compounds surrounded with the continuous line were found to be reaction products of ethylene oxide by this experiment. Compounds surrounded with the dotted line were not detected under our experimental conditions.

していた。30時間目に測定した x のガスクロマトグラムおよびマススペクトルを Fig. 2 (a) および Fig. 3 にそれぞれ示した。

マススペクトルより、 x は分子量 104 で分子式 $C_4H_8O_3$ あるいは $C_5H_{12}O_2$ を有する、EG 及びその類縁化合物の

誘導体と考え、次の5種の化合物の可能性を検討した。

エチレングリコールモノノルマルプロピルエーテル；エチレングリコールモノ酢酸エステル；グリコール酸エチルエステル；β-ヒドロキシエトキシアセトアルデヒド (X)；モノヒドロキシジオキサン (XI)。Table II

Fig. 3. Mass Spectrum of Compound *x*

Background peaks were subtracted.

TABLE II. Retention Time (*t_R*) of Compounds

Number of compounds	Compounds	Retention time (<i>t_R</i> , min)
	<i>x</i>	6.9
I	: Ethylene oxide	1.2
II	: Acetaldehyde	1.0
III	: Ethylene chlorohydrin	5.9
IV	: Ethylene glycol	7.5
V	: Glycolaldehyde monomer	3.2
VI	: Glyoxal	2.0
VII	: Glyoxylic acid	16.2
VIII	: Glycolic acid	22.2
X	: β-Hydroxyethoxy acetaldehyde	6.9
XI	: Monohydroxy dioxan	16.0
XIII	: Ethanol	1.4
XIV	: Oxalic acid	36.0
XV	: Dioxan	6.2
	Dichloroethane	3.7
	Ethylene glycol mononormal-propyl ether	8.4
	Ethylene glycol monoacetate	7.2
	Ethyl glycolate	7.6
	Chloroacetaldehyde	2.8

に上記の5種を含む種々の化合物の GLC の *t_R* (実測値)を示した。

同時に官能基の定性試験も行なったところ、*x*を含む試料1のヨードホルム反応²⁵⁾は陰性であった。また試料1に亜硫酸水素ナトリウム水溶液を添加し、GLCに導入したところ*x*のピークは認められなくなったことから*x*の官能基としてアルデヒド基の存在が示唆された。それゆえX以外の可能性は否定された。

-H ₂ O	→	OHC-CH ₂ -O-CH ₂ -CH ⁺	86
-CHO	→	CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -OH	75
CH ₂ OH	→	OHC-CH ₂ -O-CH ₂ ⁺	73
-CHCHO	→	HO-CH ₂ -CH ₂ -OH	62
-CH ₂ CHO	→	O ⁺ -CH ₂ -CH ₂ -OH	61
-CHCH ₂ OH	→	OHC-CH ₂ -OH ⁺	60
-CH ₂ CH ₂ OH	→	OHC-CH ₂ -O ⁺	59

Chart 3. Mass Fragmentation Pattern of Compound *x*

The peaks shown in Fig. 3 were assigned as illustrated above.

また上記5つの化合物の市販品および合成品の GLC およびマススペクトルを測定した結果、Xのクロマトグラムおよびマススペクトルが*x*のそれらと一致した。Chart 3 に*x*の開裂様式を示した。Xはアルデヒド基を有するので*x*の定性試験の結果ともよく一致する。

XはEGにEOが付加して生成したジエチレングリコール (DEG)⁶⁾の一方のアルコール性水酸基が空気酸化されて生成したものと考えられる。そこで確認のため、1% DEG 水溶液に酸素を通じながら40℃に10時間加温したのちの溶液(試料2)をGLCに導入したところ、Fig. 2 (b) に示したように*x*と同じ *t_R*: 6.9 min を有するピークの出現を認めた。このピークのマススペクトルを測定したところ、Fig. 3 と同じスペクトルが得ら

れた。

試料1および試料2に2,4-ジニトロフェニルヒドラジン溶液を添加したところ、いずれの場合も融点137°Cを有する黄色の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの結晶の生成を確認した。この融点はXの2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの融点⁹⁾と同じであった。

以上の実験結果は、我々の行なったXの同定とその生成機構の推定を支持すると考えられる。

Xは、ヘミアセタール化して閉環した化合物であるXIと互変異性体の関係にある。¹²⁾ XIのGLCの t_R はTable IIに示した通り、Xの t_R より長く、定性試験の結果からもXはモノハイドロキシジオキサン(XI)ではなく、 β -ハイドロキシエトキシアセトアルデヒド(X)と同定できた。

なおSawickiはDEGの酸化生成物としてDEGの両方の水酸基が酸化されてアルデヒドになったジグリコールアルデヒド(分子量102, 極性はXより低い)を報告している。²⁶⁾

EOからEGが一定量生成した時点からXはEGを中間体として生成して来ると考えられる。それゆえXが反応開始後8時間目に出現し、それ以後30時間目までEGの増加とほぼ平行な増加を示したのはXの生成がEGの生成およびその量に依存するためと考えられる。

XはFig. 2に示したように t_R がEGのそれとほぼ等しいので、EGの定量を妨害することが考えられる。Xの量は8時間目以後はEGの量の約3% (30時間目で約9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 2 (a)) に対しEGの量は約250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とEG量に比べ少ないためEG定量に及ぼす影響は少ないと考えられる。EGの定量に際してXの生成を防ぐには容器の空間を窒素で充填するなど酸化を防ぐ手段を講じる必要があると考える。

また、最近40年間のケミカルアブストラクトを検索した限りではXの毒性に関する報告はなかったが、構造から推察して毒性の強い化合物とは考えにくい。

(2) EGの酸化生成物⁶⁾の同定 7日目に試料1をGLCに導入したところFig. 4に示したとおり、クロマトグラム上に更にいくつかのピークの出現を認めた(t_R はTable IIに示した)。それらのピークのマススペクトルを同時に測定しFig. 5に示した。それらのピークはEGの誘導体のピークであると考えて、推定される化合物⁶⁾の市販品の t_R およびマススペクトルと比較した結果、EGの酸化生成物であるグリコールアルデヒドモノマー(V)、グリオキサルモノマー(VI)、グリオキシル酸(VII)、およびグリコール酸(VIII)のピークと同定された。なおV, VIは反応開始8時間目から試料1

Fig. 4. Gas-Liquid Chromatogram of Reaction Products formed from Ethylene Oxide (EO) in Saline, pH 5.8, during the Incubation at 40°C for One Week

- 1 ethylene oxide, acetaldehyde and ethanol
- 2 glyoxal
- 3 glycolaldehyde monomer
- 4 ethylene chlorohydrin
- 5 X (identified as β -hydroxyethoxy acetaldehyde)
- 6 ethylene glycol
- 7 monohydroxy dioxan
- 8 glyoxylic acid
- 9 glycolic acid

中に検出された (Fig. 2 (a)). これらの化合物の生成経路を検討するため1% EG水溶液に酸素を通じながら40°Cに約30時間加温した後GLCに導入したところ、 t_R : 3.2 (V), 2.0 (VI), 16.2 (VII), および22.0 (VIII) minのところにピークを検出した。この実験結果はこれらの化合物がEGの酸化生成物であるという生成機構の推定を支持するものと考えられる。

EGの酸化生成物として他にVの二量体である2,5-ジハイドロキシジオキサン(XII)が報告されている¹²⁾が、本実験条件下では検出されなかった。

(3) EOの転位反応生成物とその誘導体の同定

EOの加熱による転位反応生成物であるアセトアルデヒド(II)⁹⁾とその還元生成物であるエタノール(XIII)の生成⁶⁾が考えられるが、前述のGLC条件では、これらのピークは多量に存在するEOのピークと重なるため、カラム温度150°C、キャリアーガス流速20 ml/minとして検討した。試料1を30時間目と7日目にGLCに導入したところ、両時点で検出されるピーク(t_R : 1.5 min)と、7日目に検出されるピーク(t_R : 2.1 min)を見出した。市販品のガスクロマトグラムの t_R と比較して前者

Fig. 5. Mass Spectra of Peak 2, 3, 8 and 9, shown in Fig. 4

をII, 後者をXIIIと同定した. IIの生成には①ヘッドスペースボトル内(40℃)でのEOからの生成, ②GLCのカラムでの加熱によるEOからの生成, という2通りの経路が考えられる. ②は, カラム温度を40–150℃に変化させ, 500 µg/ml EO水溶液を導入してIIのピーク面積の増加を調べたところ, カラム温度の上昇によりピーク面積が増加したことから支持された. ただしカラム温度40℃でもピークは認められた. XIIIの生成は還元剤として作用すると考えられる7日目に検出されるV–VIII(実験結果2)の(2)参照)の消長と, 何らかの関係があるかもしれない.

以下EOから生成すると考えられるその他の反応生成物について述べる. EOが2分子付加して閉環した化合物であるジオキサン(XV)⁶⁾のGLCのピークは全実験期間を通じて試料1からは検出されなかった. また, ECH以外のクロルを含む化合物(たとえばジクロルエタン等)の生成の可能性も考えられるが, それらのピークも同様に検出されなかった.

毒性が強いこれらハロゲンを含む化合物がECHを除いては検出されなかったという実験結果は, 長時間の加

温でEGが急増するのに比べECHが漸減していったという実験結果の1)と合わせて, これらの化合物の残留毒性を考慮する際の貴重な実験事実を提供するものと考ええる.

現在EO滅菌した血液チューブ中に生理食塩水あるいは血清を循環させることにより生成および溶出して来る, 可塑剤を含む毒性を有する化合物に関する研究を進めている.

結 論

生理食塩水(40℃)中でのEOの反応生成物のうちECHおよびEGを24時間目まで定量した. 反応開始時のpHが5.8の場合, 7.5時間目まではEGの量はECHの量より少なく, 7.5時間目以降はEGの量はECHの量より多くなった. EGの増加速度は2時間目までを除いてECHのそれに等しい(2時間目から4時間目まで)か, より大きかった. pHは8時間目までは顕著に上昇してほぼ10.3に達し, 以後変化しなかった.

EOの生理食塩水中での反応生成物としてECHおよびEG以外にEGの t_R とほぼ同じ t_R を有する化合物のピークを検出した. ガスクロマトグラムおよびマススペ

クトルを合成品と比較して β -ヒドロキシエトキシアセトアルデヒドと同定した。この化合物は EG に EO が付加して生成したジエチレングリコールの一方の水酸基が空気酸化されて生成したと推定される。この化合物の互変異性体であるモノヒドロキシジオキサンも検出した。EG が空気酸化されてできた化合物あるいは EO の転位反応生成物も検出した。ECH 以外にジクロルエタン等 ハロゲンを含む化合物のピークは検出されなかつ

た。Chart 2 に示した各化合物の生成および残留は、今後 EO の残留問題を考察する際の基礎資料となるものと考ええる。

謝辞 本研究にあたり、GC-MS の測定に御助力下さった相模女子大学小川秀子教授に深く謝意を表する。

本研究の一部は昭和55年度厚生省特別研究費に拠った。ここに厚く謝意を表する。

引用文献および注

- 1) 本報告の一部は日本医科器械学会第55回大会，東京，昭和55年5月発表。
- 2) *Federal Register*, 1973. 9. 21, 1977. 1. 23, 1978. 1. 27, 1978. 6. 23; C.W. Brunch, "The Parenteral Drug Association Meeting," New York, N.Y., November 1967; T. Hirose, R. Goldstein, C. Bailey, *J. Thoracic Cardiovas. Surg.*, **45**, 245 (1953); C. Clarke, W. Davidson, J.B. Johnston, *Australian South New Zealand J. Surg.*, **36**, 53 (1966).
- 3) R.V. Petersen, W.W. Epstein, F. Fuller, C.G. Anderson, J. Douglas, *Plast. Med. Surg.*, 3rd., Paper No. 20, 7 pp (1979) [*C.A.*, **92**, 135378z (1979)]; F. Wesley, B. Rourke, O. Darbishire, *J. Food Sci.*, **30**, 1037 (1965); A.C. Cunliffe, F. Wesley, *Brit. Med. J.*, May 27, **1967**, 575.
- 4) D. Porret, *Helv. Chim. Acta*, **27**, 1321 (1944).
- 5) 生成量一変化量(減少量)を意味する。
- 6) E.S. Waight, "Rodd's Chemistry of Carbon Compounds," Vol. 1, ed. by S. Coffey, Elsevier Pub. Comp., Amsterdam, 1965, pp. 1—43; R.E. Parker, N.S. Isaacs, *Chem. Rev.*, **59**, 737 (1959); R.K. O'Leary, W.L. Guess, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 12 (1968); A.B. Metzner, J.E. Ehrreich, *A.I. Ch. E. J.*, **5**, 496 (1959).
- 7) Seidlitz, *Jahrb. Philos. Fakultät II Univ. Bern*, **8**, 59 (1928).
- 8) J. Gierer, I. Pettersson, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 3183 (1968).
- 9) R.K. Summerbell, L.K. Rothen, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 3241 (1941).
- 10) M.H. Palomaa, V. Aalto, *Chem. Ber.*, **66**, 471 (1933).
- 11) W.E. Parham, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2449 (1947).
- 12) G. Baumeier, G. Dittus, E. Müller, "Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)," Georg Thieme Verlag, Inc., Stuttgart, 1966, Band, VI/4, pp. 410—442; "Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie," Springer-Verlag, Inc., Berlin, 1 III, 3182f, 1 IV, 3956, 19 II, 69e.
- 13) 辻 楠雄, 菊池 寛, 新谷英晴, 大場琢磨, 医科器械学, **49**, Suppl., 19 (1979).
- 14) J.N. Brönsted, M. Kilpatrick, M. Kilpatrick, *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 428 (1929); W. Deckert, *Z. Anal. Chem.*, **109**, 166 (1937).
- 15) H.J. Lichtenstein, G.H. Twigg, *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 905 (1948); N.B. Matin, S.M. Davon, R.V. Efremov, *Khim. Prom.*, **48**, 416 (1972).
- 16) 著者らは Chart 1 の反応(1)から(4)までを含めた下記の速度式を求めた、式からも明らかなように ECH および EG の生成速度には、水素イオン濃度のほか種々の分子種およびイオン種の濃度も関与していると考えられる。

ここで k_1-k_4 は反応(1)―(4)の反応速度定数
生成(負の生成を含む)速度は、

$$\begin{aligned} d[\overline{\text{CH}_2\text{OCH}_2}]/dt &= -k_1[\overline{\text{CH}_2\text{OCH}_2}][\text{H}^+][\text{Cl}^-] + k_2[\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}] \\ &\quad - k_4[\overline{\text{CH}_2\text{OCH}_2}][\text{H}^+][\text{OH}^-] \end{aligned}$$

$$d[\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]/dt = k_1 [\overline{\text{CH}_2\text{OCH}_2}] [\text{H}^+] [\text{Cl}^-] - k_2 [\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}] - k_3 [\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}] [\text{OH}^-]$$

$$d[\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]/dt = k_3 [\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{OH}] [\text{OH}^-] + k_4 [\overline{\text{CH}_2\text{OCH}_2}] [\text{H}^+] [\text{OH}^-]$$

- 17) ここで記した「増加速度」は反応速度ではなく、16) に述べた「生成速度」と同じ概念で、Fig. 1 の曲線の傾きを意味する。
- 18) $[\text{HSO}_4^-]$ は 2×10^{-3} グラムイオン/l, $[\text{OH}^-]$ は反応開始時において 10^{-11} グラムイオン/l, この期間内の最高値は 10^{-7} グラムイオン/l, $[\text{Cl}^-]$ は 1.5×10^{-1} グラムイオン/l と計算された。
- 19) 湯川泰秀, 花房昭静, 向山光昭, 吉村寿次訳, “クラム有機化学 [1],” 第3版, 広川書店, 東京, 1973, pp. 389—393.
- 20) $[\text{OH}^-]$ が最大の pH 10 の場合でも $[\text{OH}^-]$ と $[\text{Cl}^-]$ の比は, $10^{-4} : 1.5 \times 10^{-1} = 1 : 1500$ であって $[\text{Cl}^-]$ が $[\text{OH}^-]$ より大きい。
- 21) A. V. Willi, *Helv. Chim. Acta*, **56**, 2094 (1973); C. K. Ingold, “Structure and Mechanism in Organic Chemistry,” Cornell University Press, Ithaca, N. Y. 1953; A. A. Frost, R. G. Pearson, “Kinetics and Mechanism,” Wiley, New York, 1961; F. A. Long, J. G. Pritchard, F. E. Stafford, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2362 (1957).
- 22) 中西香爾, 黒野昌庸, 中平靖弘訳, “モリソンボイド有機化学 (中)” 第3版, 東京化学同人, 東京, 1977, pp. 628, 701—702.

ECH と弱塩基の反応による EG の合成 (反応A) はアルコールの合成法として一般的である。一方, ECH が強塩基と反応する場合は EG よりも EO が主として生成する (反応B)。これはハロヒドリンからエポキシンドを製する一般的な反応である。それゆえ pH 10 (弱塩基性) では ECH から主として EG が生成すると思われる。Chart 1 および Fig. 1 に示したように pH が経時的に上昇するにつれて反応(1)の逆反応(2) (EO 合成反応) が起こり得る。しかしながら前述したとおり弱塩基性では反応(2)は起こりにくく, また pH が上昇すると反応(3)が起こり, ECH が EG に変化してゆくので ECH の減少を補う方向の反応 (反応(1)) が進行し, そのため反応(1)と(2)の間の平衡は, 反応(1)と(2)のみから定められる平衡よりも反応(1)の方向に傾くと考えられる。

- 23) W. J. Zimmerschied, D. A. Palmer, R. J. Bertolacini, U. S. Patent 4014945 (1977) [*C. A.*, **87**, 22379 d (1977)]; J. Weber, L. Bruns, G. Schnuchel, Ger. Patent 2141470 (1973) [*C. A.*, **78**, 12400 p (1973)].
- 24) B. Castleman, B. U. McNeely (ed.), *New Eng. J. Med.*, **276**, 167 (1967).
- 25) R. C. Fuson, C. W. Tullock, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 1638 (1934).
ヨードホルム反応により $\text{CH}_3\text{CO}-$ 基および $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})-$ 基が確認される。
- 26) E. Sawicki, C. Sawicki, “Aldehydes—Photometric Analysis,” Vol. 5, Academic Press, New York, 1978, pp. 91—92.