

生体試料中の非イオン界面活性剤ポリオキシエチレン・ アルキル・フェニル・エーテルの分析法

三 浦 平 則[※] 小 林 裕[※]
三 浦 竹治郎[※] 滝 沢 行 雄^{※※}

は じ め に

昭和53年度に環境庁が実施した「化学物質に関する環境調査」の結果の中に、非イオン界面活性剤の一種であるポリオキシエチレン・アルキル・フェニル・エーテルは分解性が不良で、広い地域の水質および底質から検出されているという報告があり、水性動植物への影響や哺乳動物への濃縮性の有無に関する確認の必要性が示されている。このような背景をふまえて、滝沢らは環境庁の委託研究として、この難分解性物質について小動物を対象とした消化管吸収およびその蓄積性に関する調査研究を行った。この調査研究に際し、実験動物中の本物質の化学分析を秋田県公害技術センターが分担したが、生体試料の分析法は文献上未知であり、その確立のためにさまざまな検討を要した。この分析法の検討過程で得られた知見および実際に実験動物試料に適用した方法についてここに報告する。

1 底質試料分析法の応用

沼田ら¹⁾は底質試料中の非イオン界面活性剤の分析法として図-1に示す方法を提案している。そこでこの条件を標準添加生体試料に応用し、回収率を求めた上で実用可能か判断することにした。

<実験>

装 置 日立分光光度計139型（ガラスセル30mm）

標準液

ポリオキシエチレン・ノニル・フェノール・エーテル（商品名：花王アトラスKK、エマルゲン909、酸化エチレン付加モル数9.00、構造式：図-2）5gを秤取し、メチルアルコールで定容500mlとする。これを適宜メチルアルコールで希釈して測定用標準溶液とする。なお、添加回収実験用標準はこの標準溶液を使用した。

※秋田県公害技術センター

※※秋田大学医学部公衆衛生学教室

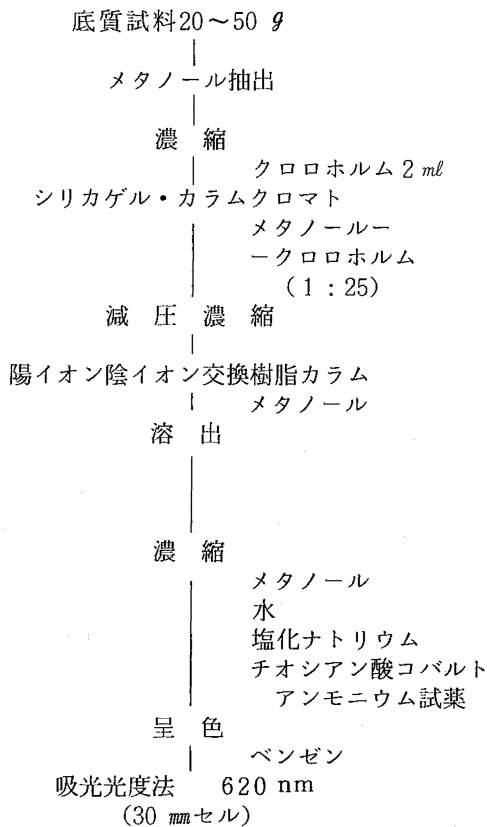


図-1 底質試料分析フローチャート

一般試薬

チオシアン酸コバルトアンモニウム試薬

チオシアン酸アンモニウム（特級）620 g と硝酸コバルト（特級）280 g を水に溶かして 1 ℓ とする。ベンゼン約 50 ml で 2 回抽出し、不純物を除去してから使用する。

シリカゲル

カラムクロマトグラフィー用ワコーゲル S-1 を 130℃ で 3 時間加熱し、活性化したものを使用する。

陽イオン交換樹脂

ダウエックス 50W-X 4、20~50 メッシュ H 型 500 ml を 5% 塩酸を満たし底部にガラスウールをつめたカラムに流し込み充填する。2.5 ℓ の 5% 塩酸を 2 ml/min の流速で流し、同様に順次 5% NaCl 2.5 ℓ、5% 塩酸 2.5 ℓ、5% NaCl 2.5 ℓ、5% 塩酸 2.5 ℓ で処理後、精製水を通して流出水が中性になるまで洗浄する。これを水を満たしたビーカー中に保存し、使用に際しては一定量をカラムに取りメタノールを流してアルコール系に置換する。

ダウエックス1-X8、50~100メッシュC1型500mlを5%NaOHの入ったカラムに充填した後、5%NaOH、5%(NH₄)₂SO₄、5%HC1、5%(NH₄)₂SO₄、5%NaOHの順に各々2.5ℓ流し、最後に流出水が中性となるまで水洗する。以下前記同様に処理する。

すべて試薬特級を使用した。

マウスホモジネートを凍結乾燥したものを使用した。

マウス凍結乾燥試料に標準物質を 1,000 μ g 添加してメチルアルコールにより24時間ソックスレー抽出し、抽出後メチルアルコールを減圧下留去した残渣について沼田らの方法を参考として組み立てた図-3に示すフローチャートに従って処理し、定量を試みた。なお、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの流出液については、TLCをCHCl₃:メチルアルコール=15:1で展開後ドラージェンドルフ試薬の噴霧によるオレンジ色の発色で標準物質のスポットをチェックした。

結果を表-1に示す。

検量線によると 1,000 μg に対応する吸光度は 0.240 付近であるが、標準 1,000 μg 添加試料の場合はそれをはかるに上回り、検量線の範囲を越えていた。単純に外そうとしたとしても平均回収率は 285 % 程度となる。この過大値を与えた原因として、チオシアンコバルトアンモニウム試薬による発色の際に青緑色の沈殿が生成し、これが抽出操作によってベンゼン層に溶解したことが考えられた。チオシアン酸コバルトアンモニウム比色法における青色沈殿の原因物質としてはカチオン界面活性剤が知られている。²⁾ そこでイオン交換樹脂カラムの延長を行って同様の実験を試みたが改善はみられなかった。また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの繰り返し、溶媒系の変更等の検討も加えたが、小数例を除いて大部分は過大値を与えバラツキも大きかった。

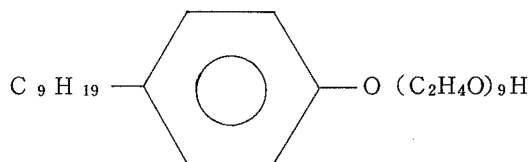


図-2 ポリオキシエチレン・ノニル・フェノール・エーテルの構造式

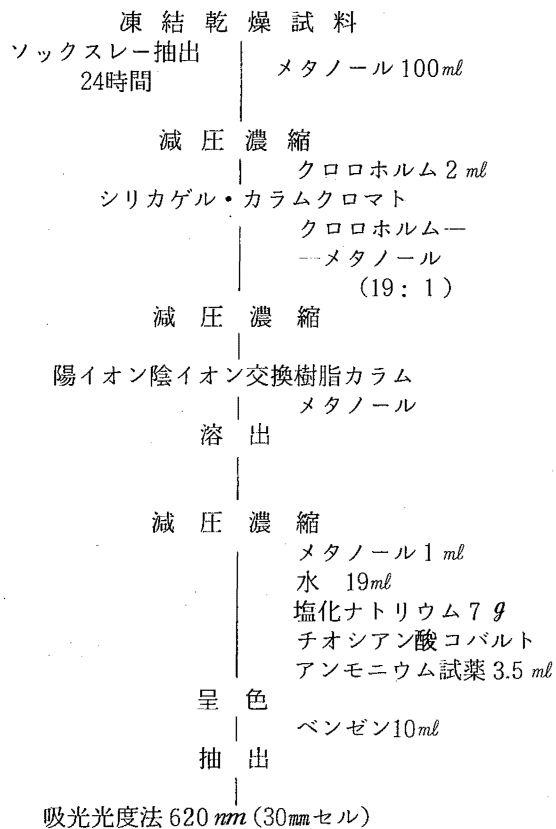


図-3 底質試料分析法の生体試料への応用

表-1 底質試料分析法の応用結果

標準物質 (μg)	吸 光 度 (620nm)	試料No	吸 光 度 (620nm)
0	0	1	0.740
400	0.094	2	0.640
800	0.193	3	0.519
1,200	0.285	4	1.148
1,600	0.377	5	0.512

2 Rosenの方法の検討

上の実験結果から、過大値をもたらす原因は生体内の非イオン性物質、すなわちある種の脂質であろうと考えられた。

Rosen³⁾は鉱油・綿実油などの非イオン性物質と数種類の非イオン界面活性剤より成る混合物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと7種類の溶媒系を用いてこれらを相互に分離、定量している。この方法にならって、前と同様に標準添加しソックスレー抽出後メチルアルコールを留去した残渣について図-4のフロチャートに従い分析を試みた。しかしこの方法も再現性が悪く、ルーチン化することは無理と考えた。

3 アルカリケン化条件における

安定性

1および2の検討より、ソックスレー抽出後に直接シリカゲルカラムクロマトグラフィーでクリーンアップすることは困難であると判断し、妨害物質が脂質である場合の前処理としてアルカリケン化を考えた。そこでまずケン化条件における標準物質の安定性を確認する目的で、次のような実験を行った。

<実験>

装置・試薬・標準溶液

1の実験に準じた。

方法

標準物質 1,000 μ gを図-5に示したフローチャートに従って処理し、1の実験と同様にチオシアン酸コバルトアンモニウム試薬で発色させ定量して回収率を求めた。

<結果>

定量値・回収率を表-2に示す。

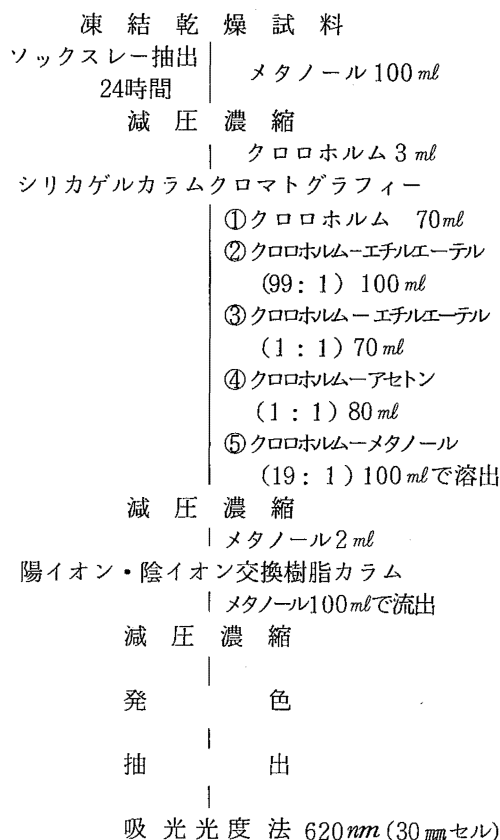


図-4 Rosenの方法の応用

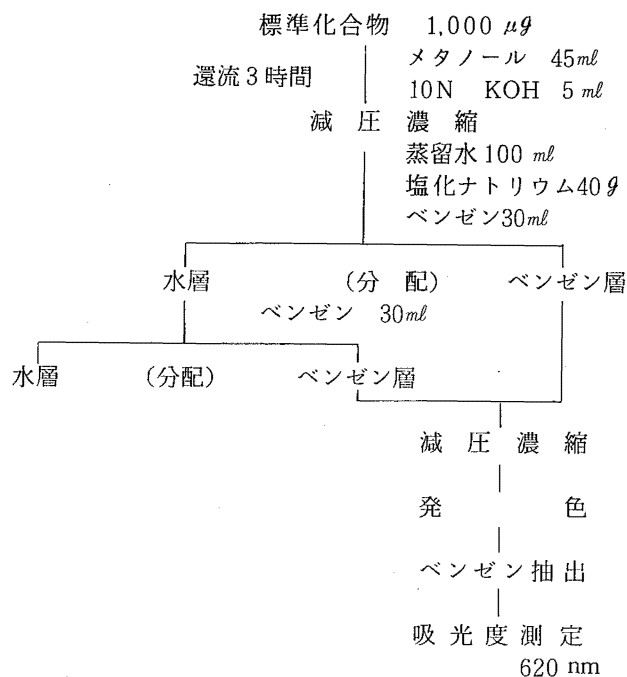


図-5 ケン化処理と標準物質の回収

表-2 ケン化条件における回収率

統計量 添加量	n	$\bar{x}$ (μg)	R (μg)	σ_{n-1} (μg)	c. v. (%)
1,000 μg	6	1,023	1,003~ 1,046	15	1.5
回収率		102 %	100~ 104%		

<考 察>

回収率平均が102 %であり、C. V. (%) が1.5であることからこの標準化合物がケン化条件で安定であり、かつ塩析剤の存在下でアルカリ溶液からきわめてよくベンゼンに抽出されることを確認できた。

4. ケン化を前処理とした添加回収実験

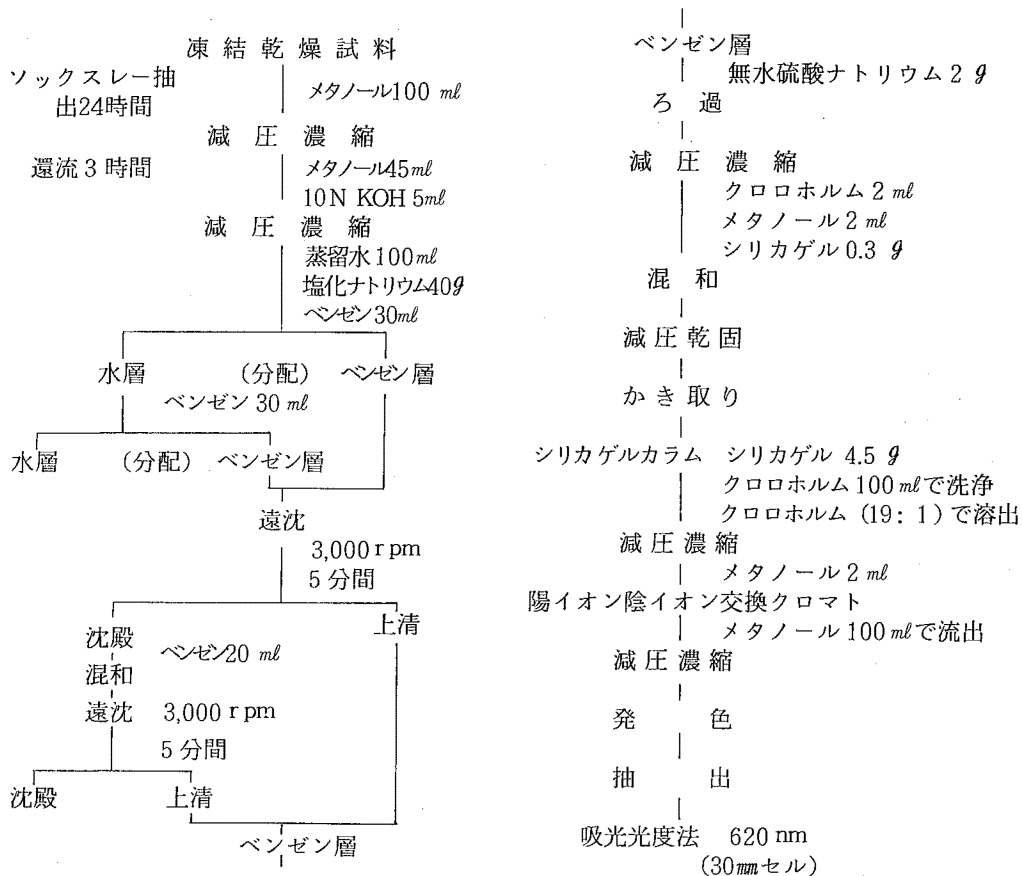
3の実験によって標準物質のポリオキシエチレン・ノニル・フェノール・エーテルがアルカリケン化条件においても安定であると判断したので、前と同様に動物試料に標準添加を行い、ケン

化処理によって妨害物質が分解しかつクリーンアップ操作により除去可能か否か検討することにした。

＜実験＞

装置・試薬・標準溶液

1の実験に準じた。



図ー6 生体試料分析法フローチャート

動物試料

1の実験に同じ

方法

1の実験同様に標準物質 1,000 μg を添加した動物試料をメチルアルコールで24時間ソックスレー抽出し、アルカリケン化処理後ベンゼン抽出を行い、引続きシリカゲルカラムクロマトグラフィー・イオン交換クロマトグラフィーによりクリーンアップを行う。次いでチオシアン酸コバルトアンモニウム比色法により定量を行った。(図ー6参照)

<結 果>

定量値・回収率を表－3に示す。

表－3 標準添加凍結乾燥試料における回収率

統計量 添加量	n	$\bar{x}$ (μg)	R (μg)	σ_{n-1} (μg)	C. V. (%)
1,000 μg	8	1,014	868~ 1,136	106	10.4
回 収 率		101%	87~ 114%		

<考 察>

回収率平均：101%；C. V. (%)：10.4の数値が示すように過大値は生じておらず、回収率も満足できるものである。また実際にチオシアン酸コバルトアンモニウムによって発色した時点でも青緑色の沈殿は生じなかった。すなわち図－6のフローチャートにおけるケン化処理条件で妨害物質が完全に分解され、その後のクリーンアップ操作によって分解生成物と標準物質を分離できたものと判断し、実際の試料に応用することにした。

5 投与実験動物への応用

滝沢らは哺乳動物における非イオン界面活性剤ポリオキシエチレン・アルキル・フェニル・エーテルの吸収・蓄積性を検討することを目的として次のような実験を計画した。

<吸 収 実 験>

ポリオキシエチレン・ノニル・フェノール・エーテル 1.5 mg / 匹をマウス胃内に投与後、1、3、5、8、24時間における体内（消化管・尾部・毛皮を除く）残存量を各群4匹について測定する。

<蓄 積 実 験>

上記物質 1.5 mg / 匹 / 日をマウス胃内に連日投与し、1、3、7、14、21、28日後における体内（消化管、尾部、毛皮を除く）蓄積量を各群4匹について測定する。

上の実験に使用した動物のホモジネート凍結乾燥試料に図－6の方法をそのまま応用して分析を行った。この結果、投与後1時間群の1匹にのみ460 μg が検出されたが、その他はすべて本比色分析法の定量限界 200 μg （吸光度 0.05に相当）を下回った（図－7 参照）

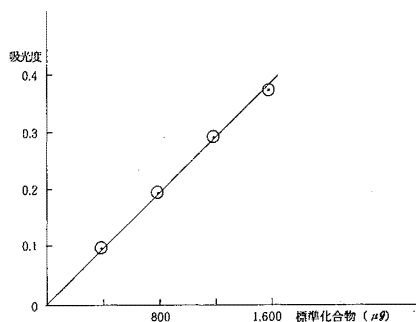


図-7 検量線

6 ま と め

生体試料中の非イオン界面活性剤ポリオキシエチレン・アルキル・フェニル・エーテルの分析法を確立するために、当初、標準添加動物試料について沼田らの底質試料の分析法にならいシリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを用いてクリーンアップした後、チオシアン酸コバルトアンモニウム比色法により定量し回収率を求めた。しかし爽雜物質によるプラスの妨害を受け数倍の高値を与えた。そこで、この妨害をイオン交換カラムの延長・シリカゲルカラムクロマトグラフィーの繰り返し・溶媒系の変更等によって除去することを検討したが、好結果を得ることはできなかった。非イオン性物質と非イオン界面活性剤との混合物からこれらを相互に分離する Rosen の方法も応用してみたがルーチン化は無理であった。この爽雜物が比較的低極性の溶媒系によって目的物質と共に流出することから我々はこれを脂質の一種と考え、目的物質のアルカリに対する安定性を確認した上でケン化処理による妨害物質の分解を試み、クリーンアップ操作後に比色定量を行って好結果を得た。実試料にこの方法を応用したところ、濃度がチオシアン酸コバルトアンモニウム比色法の定量下限に満たなかったため、そのほとんどが不検出となったがここで我々が検討した方法(図-6)を前処理として、定量段階で比色法よりも感度の良い方法、例えば高速液体クロマトグラフィーによる方法あるいは Kaduji と Stead⁴⁾が報告している HBr 分解-ガスクロマトグラフィー定量法などを用いれば低濃度の生体試料の分析も充分可能と考える。

(参 考 文 献)

- 1) 沼田ら、昭和54年版ケミカル・アセスメント・マニュアル・レポート「化学物質と環境」環境庁保健調査室
- 2) 小田良平・寺村一広共著「界面活性剤の合成と其応用」、塙書店刊
- 3) Rosen, M. J., Anal. Chem., 35, 2074, (1963)
- 4) Kaduji, I. I. and Stead, J. B., Analyst, 101, 728, (1976)