

フタル酸エステルの検出法について

Detection of Some Phthalic Acid Esters

金島 弘恭 小川 廣 山岸 喬
木下 良裕 森 三佐雄

Hiroyasu Kaneshima, Hiroshi Ogawa, Takashi Yamagishi,
Yoshihiro Kinoshita, and Misao Mori

緒 言

近年、新しい環境汚染物質としてフタル酸エステル (PAE) が問題となっているが、この PAE による環境汚染の実態や毒性評価に関する資料は未だ十分ではない。われわれは、PAE の食品汚染調査ならびに生体影響に関する研究をはじめにさきだち、まず迅速でしかも精度の良い検出法を確立する目的で薄層クロマトグラフィー (TLC)、シンクログラフィー (TCG) およびガスクロマトグラフィー (GLC) による検出法を検討した。またこれらの応用例として市販の食品、医薬品について PAE の検出を試みた。その結果、一応満足する方法を得たのでここに報告する。

実験方法

1. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

1-1 標準品

用いた標準品は、Di-methyl phthalate (DMP), Di-ethyl phthalate (DEP), Di-n-butyl phthalate (DBP), Di-iso-butyl phthalate (DiBP), Di-n-octyl phthalate (DnOP), Di-2-ethylhexyl phthalate (DOP) の6種でいずれも東京化成工業の特級品であり、標準液は 1 mg/ml エタノール溶液を使用した。

1-2 薄層板

蛍光剤を添加したメルク社製 Kieselgel HF₂₅₄ を用いた。薄層板は常法に従って作り、活性化は 105° で1時間行なった。

1-3 展開溶媒

- i) Hexane : Ethylether = 4 : 1
- ii) Hexane : Ethylacetate = 5 : 1
- iii) Benzene : Ethylacetate = 10 : 1
- iv) Benzene
- v) Ethylene chloride

1-4 検出

- i) 紫外線ランプ (2450 Å)

- ii) ヨウ素蒸気

- iii) 10%硫酸を噴霧後、ホットプレート上で加熱。

- iv) リンモリブデン酸—アニスアルデヒド試薬を噴霧後ホットプレート上で加熱。

1-5 リンモリブデン酸—アニスアルデヒド試薬の調製¹⁾
試薬A, 氷酢酸 90 ml にアニスアルデヒド 4.5 g を溶かす。これにメタノール 800 ml を加え、さらに濃硫酸 45 ml を攪拌しながら滴下する。

試薬B, 10%リンモリブデン酸のメタノール溶液。試薬Aに 10 ml の試薬Bを加え数日間放置後使用する。

1-6 濃度勾配 TLC²⁾

6種のPAEの最適の分離能を求めめるため、吸着性の異なる Kieselgel HF₂₅₄ と Aluminiumoxid GF₂₅₄ の19種の濃度勾配をもつ薄層板を TL-5 G 形 (ヤマト化学製) アプリケータで作製し、105° で1時間活性化したものを使用した。

1-7 TLC 用試料液の調製

食用乾燥のり 10 g を Hexane 100 ml で振盪抽出した。しょう油、日本酒はそれぞれ 100 ml を量り、Hexane 100 ml で3回抽出後、溶媒を減圧留去し、残留物を少量の Ether に溶かし TLC の試料液とした。

医薬品のカプセル剤はカプセル内部の薬物を除去後、10個のカプセルを細切し、錠剤の場合は10錠を乳鉢で粉碎しそれぞれ 100 ml の Ether でソックスレー抽出器を用い、8時間抽出を行なった。抽出後、Ether を留去し残留物を少量の Ether に溶かし TLC の試料液とした。

2. 薄層自動検出装置 (シンクログラフ)

試料液 1 μl を薄層棒 (0.9 mm × 15 cm の石英製棒の表面にシリカゲルを焼結) にスポットし、Hexane : Ether = 10 : 1 で30分間展開する。薄層棒上分離された試料は水素炎イオン化検出器 (FID) により検出した。

機種 : IATORON THINCHROGRAPH TFG-10

Flow rate, H₂, 160 ml/min, Air, 2200 ml/min

Scanning speed 2 cm/min

3. GLC

3-1 機器および測定条件

機器；日立ガスクロマトグラフ063形 (FID 付)
 カラム；3mm×2m (ガラス製)
 充てん剤；1.5%OV-17, Gaschrom Q (60~80 mesh)
 カラム温度；140-250° (7.5°/min)
 試料注入口および検出器温度；250°
 キャリヤーガス；N₂ 40 ml/min

3-2 試料液の調製

試料が水溶液の場合は試料 100 ml, 固型試料の場合はその乾燥粉末10gを量り, 100 ml の n-ヘキサンで3回振盪抽出を行なった。溶媒を合わせたのち減圧留去, 残留物にエタノール 1.0 ml または 50 ppm のステアリン酸メチルエステルを含むエタノール溶液を加えて溶解し GLC 用試料液とした。なお, 試料調製の際, 使用した器具, 試薬はすべて n-ヘキサンで洗浄し, 洗浄液を減圧濃縮したのち GLC で PAE のチェックを行なった。

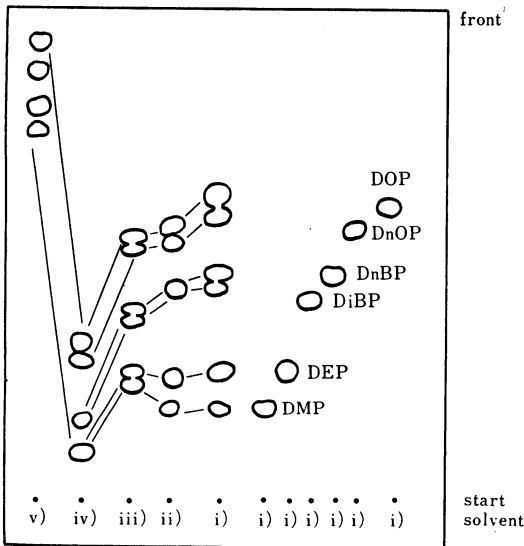
実験結果ならびに考察

1. TLC による PAE の検出

1-1 展開溶媒の検討

TLC による PAE の分析は多く報告されている³⁾⁴⁾。これらの報告にある TLC の展開溶媒と, さらに, 新たな溶媒を検討した結果を Fig. 1 に示した。i) がもっとも良い分離を示し, 6 種の PAE を同時に分離することができた。

Fig. 1 Thin-layer chromatogram of PAEs



Developing solvent

- i) Hexane : Ethylether = 4 : 1
- ii) Hexane : Ethylacetate = 5 : 1
- iii) Benzene : Ethylacetate = 10 : 1
- iv) Benzene
- v) Ethylene chloride

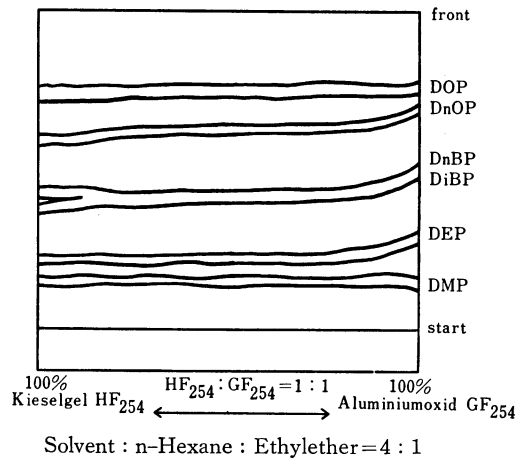
1-2 検出試薬

検出感度は iv) が一番高く DOP, DnOP, DiBP に対して 0.2-0.5 μg, i) ii) iii) は, それぞれ 0.5-1 μg, 5-10 μg, 1-3 μg で検出可能であった。iv) は DnOP, DOP に濃青紫色, DiBP に対して赤紫色を呈し発色に特異性を示した。また, 他に比較して検出感度が高い点からも PAE の検出には iv) がもっともすぐれていると考える。

1-3 濃度勾配 TLC による吸着剤の検討

TLC のより良い分離能を持つ吸着剤を検討する目的で濃度勾配 TLC を行ない Fig. 2 に示す結果を得た。吸着剤として Kieselgel HF₂₅₄, Aluminiumoxid GF₂₅₄ の両者とも PAE の分離により成績を示した。DEP と DMP の分離は, Aluminiumoxid GF₂₅₄ の方が Kieselgel HF₂₅₄ より良い分離を示したが, DBP と DiBP, DOP と DnOP の分離は, Kieselgel HF₂₅₄ の方がよりすぐれていた。

Fig. 2 Density-gradient thin-layer chromatogram of PAEs



2. TLC による医薬品および食品中の PAE の検出

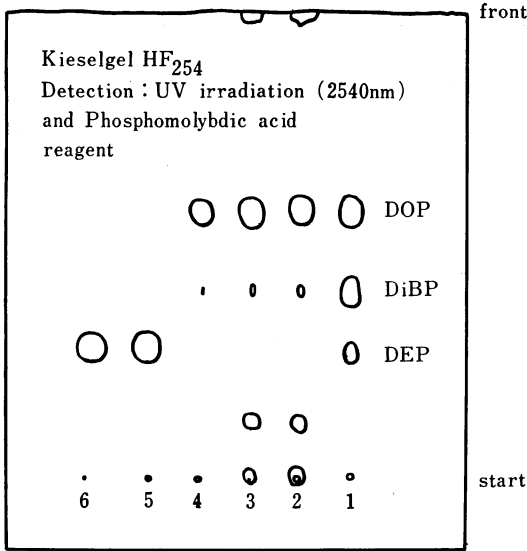
食用乾燥のり, しょう油, 日本酒, カプセル剤, コーティング錠剤について TLC による PAE の検出を試みた。試料溶液を Kieselgel HF₂₅₄ の薄層板にスポットし溶媒 i) で展開したのち, UV 照射, リンモリブデン酸-アニスアルデヒド試薬 iv) を用いてスポットを検出したが, 結果を Fig. 3 に示した。

すなわち, 乾燥食用のり, しょう油, 日本酒から DOP と DBP, また, カプセル剤, コーティング錠剤から DEP が検出された。TLC による分析は迅速で簡易である点から GLC による定量の予試験として有用であると考えられる。

3. TLC-自動検出装置による PAE の検出

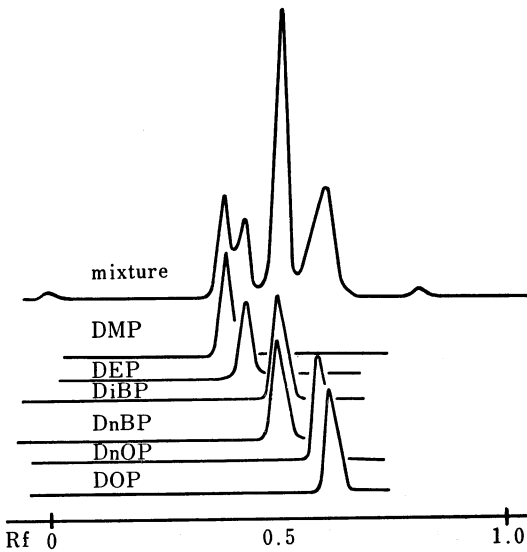
TCG は血液中の脂質の分析を目的に開発された⁵⁾。本研究で PAE の検出に用いた結果約 0.1 μg の検出感度があった。薄層板上における分離は TLC に比較すると劣

Fig. 3 Thin-layer chromatogram of PAE in foods and medicines



1. PAE-mixture
2. Dried laver
3. Soy sauce
4. Sake
5. Capsule
6. Coated tablet

Fig. 4 Thin-layer chromatogram of PAEs measured by TLC-autodetector



っていたが、DiBP, DBP が重なる外は Fig. 4 に示すようにほぼ良い分離を示した。TCG は、GLC に比べ分析時間が短かく、操作が容易であり、多くの試料を短時間に処理できる利点を有する。さらに今後、吸着剤、展開溶媒を検討する必要があるが、PAE の定性、定量に有効な手段となりうると考える。

4. GLC による PAE の分析

4-1 測定条件および内部標準法の検討

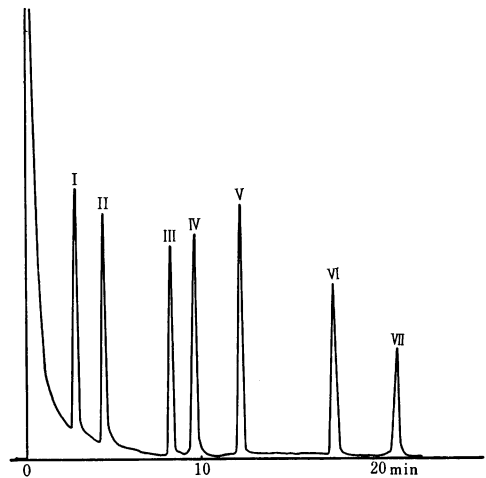
GLC のカラム液相については OV-17, SE-30, XE-60 などを用いて検討を行ない 1.5~3% OV-17, 2.5% SE-30 で良好な結果が得られた。

また、1.5% OV-17 を用いフタル酸および PAE の分析を行なった結果、フタル酸、無水フタル酸については検出可能であったが、1 個のアルコール基が脱離したフタル酸モノエステルではカラムへの吸着がおき検出できなかった。カラム温度に関しては DOP, DBP の 2 成分のみの分析を恒温で行なっている例が大部分であるが、6 種類の PAE の定性・定量分析を同時に行なうために、昇温 GLC を試みた。また、PAE の内部標準法による分析を行なうため、適当な I.S. の検討を行なったが、ステアリン酸メチルエステルが適当であることを認めた。PAE とステアリン酸メチルエステルのガスクロマトグラムを Fig. 5 に示したが、各ピークともシャープな形を示し、分離も良好であった。この際ステンレスカラムを用いると Fig. 6 に示すような形のピークが得られ、これは試料の一部分解や吸着によるものと考えられる。

4-2 検量線の作製

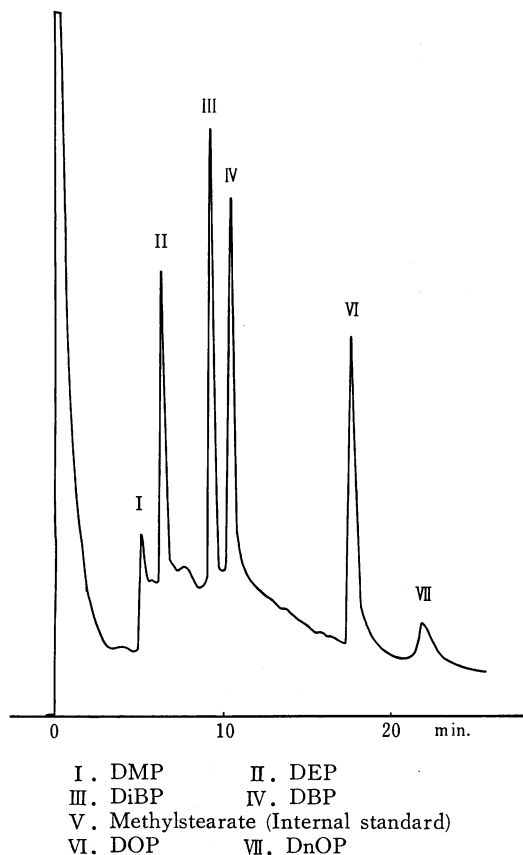
定量は、絶対検量線法と内部標準法により行なった。絶対検量線法では 0.01~10.0 μg の範囲で直線性が認められた。内部標準法では 6 種類の PAE とステアリン酸メチルエステルの濃度をそれぞれ 500 ppm となるようにエタノールにとかし、0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.5:1, 2:1

Fig. 5 Gas chromatogram of six kinds of PAEs



- I. DMP
- II. DEP
- III. DiBP
- IV. DBP
- V. Methylstearate (Internal standard)
- VI. DOP
- VII. DnOP

Fig. 6 Gas chromatogram of six kinds of PAEs in stainless column



の割合で混合し、それを試料溶液とし GLC を行なった。縦軸に PAE/I. S. のピーク高さの比をとり横軸に PAE/I. S. の重量比をとって検量線を作製した。その結果 Fig.7 に示すように直線性が認められた。

4-3 PAE の溶出試験

容器からの PAE の溶出について検討するために市販のプラスチック容器を用い、その容器の使用方法を考慮した条件で溶出試験を行なった。PAE の定量は内部標準法により前記の検量線を用いて行なった。実験条件と測定結果は、Table 1 に示すとおりである。

市販のプラスチック容器からは、DBP, DOP のみが検出されたが携帯用魔法ビン (内壁が塩化ビニルで被覆されている) からは DBP 2.74 ppm, DOP 5.9 ppm と最大の溶出が認められた。これは高温で溶出試験を行なったので PAE の水への溶解性が増大したためと考えられる。

また同じ容器を用い、水と10%エタノールの異なる溶媒で試験したところ DOP が水ではこん跡程度、10%エタノールでは 0.68 ppm の溶出が認められた。これは PAE が脂溶性であり水よりアルコールへの溶解性が高いためと考えられる。

4-4 医薬品、食品中の PAE の分析

市販の医薬品、食品中の PAE の定量を GLC (絶対検量線法および内部標準法) を用いて行なった結果を Table 2 に示した。

DBP, DOP が検出されたが食品では DBP が 0.02~1.50 ppm, の範囲を示した。今回は複雑なクリーンアップ

Fig. 7 Calibration curves of six kinds of PAEs for gas chromatography

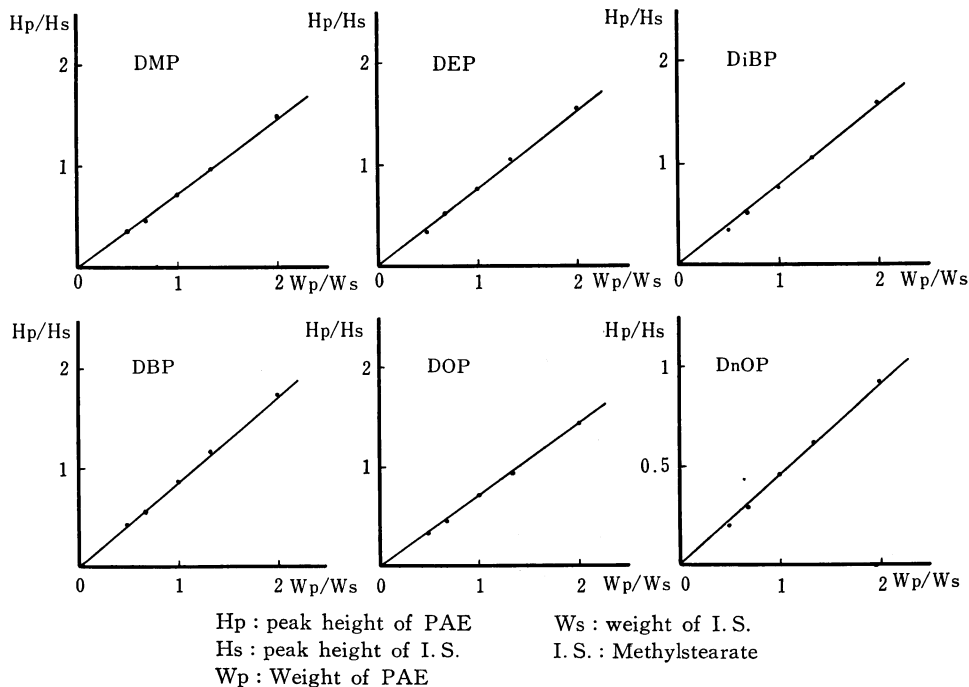


Table 1 Elution test of PAEs

	Condition of Elution test			DBP (ppm)	DOP (ppm)
	Solvent	Temperature	Time		
Vacuum bottle	Water	100° (C)	1 (hr)	2.74	5.91
Sample A	Water	100°	1	0.01	trace
Sample B	Water	20°	72	trace	trace
Sample C	Water	20°	72	trace	trace
Sample D	Water	100°	1	0.51	0.97
Sample E	Water	100°	2	0.76	1.49
	Water	room temp.	48	0.20	trace
Aluminium foil	10% EtOH	room temp.	48	0.31	0.68
	n-Hexane	room temp.	2	19.00	26.00

Table 2 PAEs in foods and medicines

Sample	DBP (ppm)	DOP (ppm)
Soy Sauce	0.02	trace
Dried laver	1.50	0.35
Sake	0.02	trace
Salt	0.28	trace
Substitution infusion A	0.08	—
B	0.02	—
C	0.02	—
D	0.04	—
E	0.09	—
F	0.06	—
Distilled water (A hospital)	0.04	—
(B hospital)	0.02	—
(C hospital)	0.02	—
(D hospital)	0.28	—

を必要としない試料を主として選んで分析を行なったが、現在、脂肪性食品や混合製剤などからの PAE の分離定量について検討中である。

結 語

TLC, TCG, GLC による 6 種の PAE の分析を検討した。その結果、TLC については 0.2-0.5 μg の検出感度で PAE の検出が可能であり、食品、医薬品中の PAE の検出に満足する結果を得た。TLC はスクリーニングの手段として有効と思われる。TCG は 0.1 μg の検出感度を持つが、DiBP, DBP の分離が十分でなかった。しかし TCG は感度が高く操作が容易である点から今後吸着剤、展開溶媒の検討により PAE の分析に有用な手段となり得ると考える。GLC では各 PAE とも 0.01 μg 以上で測定可能であった。絶対検量線法と内部標準法により、医薬品、食品中の PAE の測定を行なったが、GLC は微量な PAE の定量分析に適当であることが認められた。

文 献

- 1) Hans Bohrmann : Egon Stahl and Hiroshi Mitsuhashi. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 15, 1606 (1967)
- 2) 糸川秀治 : ファルマシア, 9, 187 (1973)
- 3) 衛生化学, 19, A-13 (1973)
- 4) FDA BY-LINES 3, 127 (1972)
- 5) 河合忠他 : 臨床病理学会講演要旨, 19, 293 (1971)

Detection of Phthalic Acid Esters

Hiroyasu Kaneshima, Hiroshi Ogawa, Takashi Yamagishi, Yoshihiro Kinoshita, and Misao Mori (Hokkaido Institute of Public Health)

This work was undertaken to establish the rapid and sensitive methods for detecting phthalic acid esters (PAEs) by thin-layer (TLC), gas liquid chromatography (GLC), and thinchrography (TCG).

PAEs could be detected on a thin-layer of silica gel containing a fluorescent substance by UV irradiation or spraying of color reagents. GLC with the stationary liquid of 1.5% OV-17 and TCG using a new apparatus (thin-layer rod of silica gel) equipped with a flame ionization detector were also satisfactorily employed for the detection and determination of PAEs.

Further, these methods described here were found to be useful for the detection of PAEs in foods and medicines.