

研究活動

1

液体クロマトグラフィーによる 芳香族塩素化合物異性体の分離

無機廃液処理主任 田 中 信 男

はじめに

芳香族塩素化合物の環境動態は公衆衛生の観点から多くの関心を集めている。カネミ油症の事例が発端となって、ポリクロロビフェニル (PCB) を含有する製品が市場から姿を消して久しいが、イタリアのセベソ、アメリカのラブカナルなどでの事故、汚染があり、さらに最近では都市のゴミ焼却場での芳香族塩素化合物の発生、土壌からの検出など調査研究が進むにつれて、ハロゲンを含む芳香族化合物が環境に蓄積し、生体系に大きな影響を与えつつあるのではないかという危惧も一部に高まりつつある。その実情の把握のためには正確な分析手段が不可欠であるが、ここでその基礎に関するCenters for Disease Control (Atlanta, U. S. A.) との共同研究の一環として、最近特に関心をもたれているダイオキシン、PCBなど芳香族塩素化合物について、液体クロマトグラフィーおよびElectrokinetic クロマトグラフィーによる異性体分離を検討した結果を紹介する。

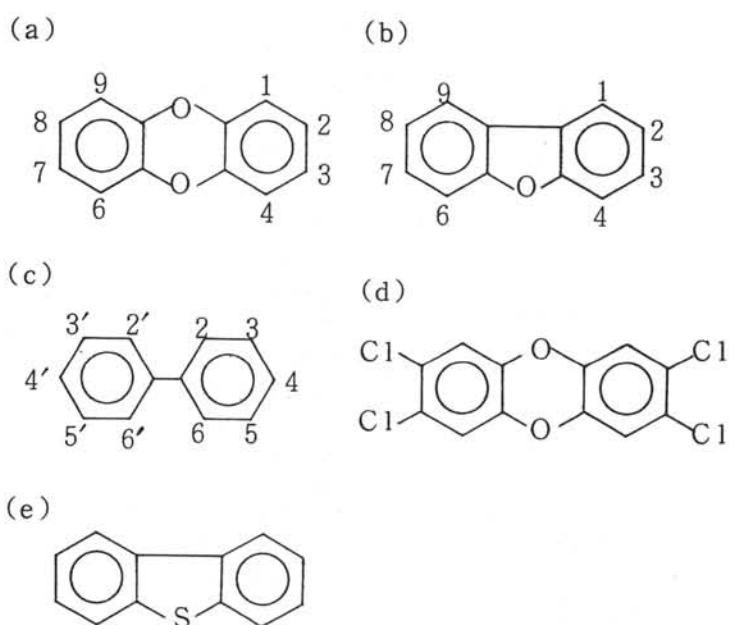


図1 芳香族化合物の構造 (a) dibenzo-p-dioxin, (b) dibenzofuran, (c) biphenyl, (d) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, (e) dibenzothiophene.

1. 芳香族塩素化合物

芳香族塩素化合物とは、塩素で置換された芳香環をもつ化合物の総称であり、図1に示すビフェニル、ジベンゾ-p-ダイオキシンなどのほか、ナフタレン、ピレンなどの誘導体を含む。塩素を置換基としてもつビフェニル、ジベンゾダイオキシン、ジベンゾフランをここではそれぞれポリクロロビフェニル(PCB)、ポリクロロジベンゾダイオキシン(PCDD)、およびポリクロロジベンゾフラン(PCDF)と呼ぶ。これらのほか、ベンツピレンなどの多環芳香族化合物、およびトリハロメタンなどのアルキル系ハロゲン化合物はその発ガン性において、またフッ素を含むハロゲン化合物がオゾン層の破壊に関連して環境上の問題となっている。

環境科学において関心をもたれている芳香族塩素化合物の特徴の一つは、それぞれの系統の芳香族塩素化合物に多くの congener (同族体)が存在し、その中の特定の congener が非常に大きな毒性と変異原性をもつことである。図1に示すジベンゾダイオキシン、ジベンゾフラン、ビフェニルの骨格に塩素が結合したPCDD(C₁-C₁₈)、PCDF(C₁-C₁₈)、PCB(C₁-C₁₀)の congener の数は、それぞれ75、135、209にのぼる。

表1 ジベンゾダイオキシンとジベンゾフランの毒性¹⁾

Position of chlorination	LD ₅₀ (μ mol/kg)	
	Guinea pig	Mice
Dibenzodioxins		
2,8-di-	>1180	-
2,3,7-tri-	120	>10
2,3,7,8-tetra-	0.006	0.88
1,2,3,7,8-penta-	0.009	0.94
1,2,4,7,8-penta-	3.2	>14
1,2,3,4,7,8-hexa-	0.19	2.1
1,2,3,6,7,8-hexa-	0.18-0.26	3.2
1,2,3,7,8,9-hexa-	0.15-0.26	>3.7
1,2,3,4,6,7,8-hepta-	>1.4	-
Dibenzofurans		
2,3,7,8-tetra-	0.016-0.032	19.6
2,3,4,7,8-penta-	0.009-0.029	-

LD₅₀は半数致死量を表す。

数多い芳香族塩素化合物の中で、軸方向に4個の塩素をもつ2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)は、マスコミいわく史上最強の毒物である。その毒性の強さとともに、催奇形性の強さならびにそれらの種への依存性が非常に大きいこともよく知られている。また表1¹⁾に示すように、生物学的効果の大きさが芳香族塩素化合物の塩素の位置に大きく依存している。PCDD, PCDFにおいて軸方向の2,3,7,8位に一個以上塩素が欠ける場合、毒性は非常に小さい。したがって、各 congener の分離定量は重要な課題である。

2. 逆相液体クロマトグラフィーによるTCDD標準試料の調製

芳香族塩素化合物の分離定量には、キャピラリーガスクロマトグラフィー(Capillary GC)とマスペクトル分析(MS)との組合せが用いられている。MSは最も信頼できる検出法であるが、同一の質量数をもつ分子種はクロマトグラフィーによって分離されなければならない。MS分解能約10000で同定検出を行うと妨害は非常に少なくなるが、この感度でも、例えばポリクロロジベンゾチオフェン(PCDT:図1)は、PCDDの検出定量を妨害する。キャピラリーGCが現時点で最も分離能力の大きな分離法と考えられるが、例えば22種存在するTCDDの中で数個のTCDDはこの方法によっても分離できないので、それらについては一括して定量し、グループとして生物学的効果が推定されている。

それぞれの芳香族塩素化合物 congener の毒性や催奇形性など生物学的効果、ならびに環境動態などを研究するためには、それぞれの congener の標準品の供給が必要である。キャピラリーGCは高い分離能を有するが、分取は困難である。ここでは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって、22種類存在するTCDD異性体を分離精製した結果を記す。²⁾ 標準試料調製のためのTCDD類は実験室で合成した。(PCDDなど高い毒性を有する芳香族塩素化合物を取り扱う実験は、すべてCDCにおいて行ったものである。)

TCDDは、トリクロロフェノールの縮合で合成されるが、図2に示すような転位反応によって複数の異性体が生成する。従来から有機化合物の分離に使用されている順相クロマトグラフィー用のシリカゲル充填剤、あるいは逆相クロマトグラフィー用のオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS充填剤)を用いた場合には、表2が示すように、合成反応で

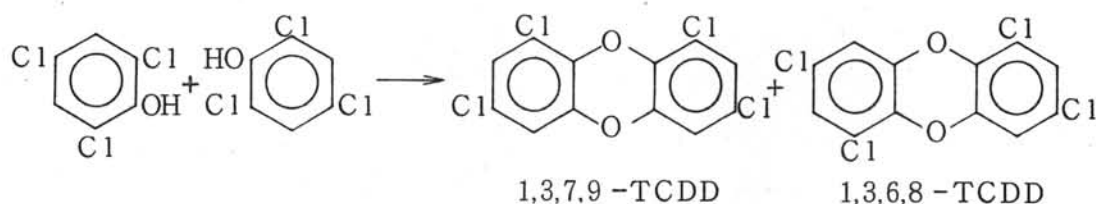


図2 テトラクロロジベンゾダイオキシン類の合成

表2 TCDDの順相および逆相クロマトグラフィーによる分離

TCDD isomer	relative retention time		
	PYE(methanol)	ODS(methanol)	silica gel(hexane)
1234	1.152	1.065	1.248
1278	1.272	0.888	1.288
1378	1.067	0.964	1.000
2378	1.000	1.000	1.000
1239/1236	1.027/1.177	0.958	1.350/1.356
1247/1248	0.976/1.052	0.939	1.154/1.199
1237/1238	0.952/0.990	0.971	1.100/1.128
1246/1249	1.047	0.917	1.328/1.441
1268/1279	0.870/0.952	0.942	1.238/1.291
1368/1379	1.237/1.047	1.068/1.038	0.997/0.940
1267/1269/1289	0.818/0.928/0.693	0.803/0.780/0.803	1.627/1.702/1.795
1369/1268/1279	1.217/0.870/0.953	0.942	1.220/1.238/1.291
1478/1278	0.865/1.272	0.888	1.340/1.288
1469/1269	0.988/0.928	0.780	1.497/1.702

相対保持時間は、それぞれの異性体の 2,3,7,8-TCDD に対する相対的保持時間である。

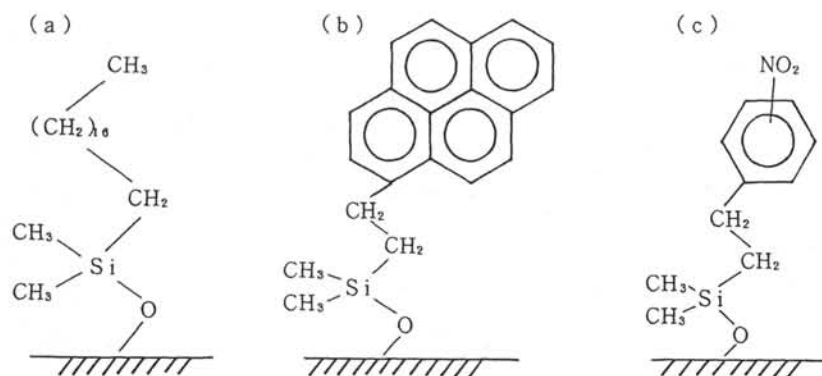


図3 逆相クロマトグラフィー用充填剤の構造

(a)ODS, (b)PYE, (c)NPE

生成するTCDD異性体混合物をすべて分離することは困難であった。(表2において混合物中の異性体間の相対的保持係数の比が1.05以下であれば分離は困難である。)また合成時の溶媒(Glyme)と他の有機溶媒に対するTCDDの溶解度とを考慮すると、逆相クロマトグラフィー充填剤の使用が好ましい。

これまでに芳香族化合物であるピレンをシリカゲル表面に化学結合した2-(1-ピレニル)エチルシリル化シリカゲル(PYE充填剤:図3)を開発し、これを逆相クロマトグラフィーを使用して構造の類似した化合物相互間の分離を行ってきたが、³⁻⁵⁾このPYE充填剤をTCDD異性体の分離に適用したところ、図4に示すように、非常に広い範囲の異性体を

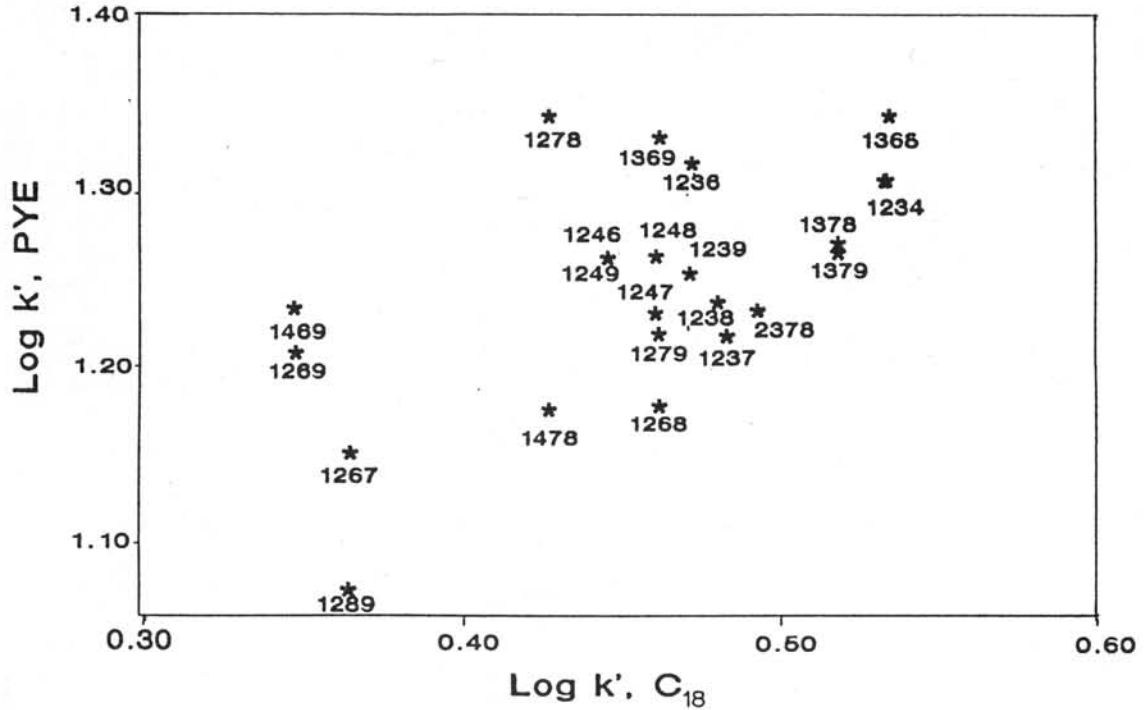


図4 ODS 充填剤とPYE 充填剤とによるTCDD 異性体の分離

k' は、それぞれの分離系における分配係数を表し、 k' に差がある場合にはそれらの化合物は分離され得る。

相互分離することができた。これにより 1,2,4,6/1,2,4,9-TCDD の組み合わせを除くすべての異性体を、少なくともミリグラムスケールで分取することができた。

逆相クロマトグラフィーによる分離において、共通のトリクロロフェノールから合成されたTCDD 異性体混合物は、ODS 充填剤ではほとんど分離されなかったが、PYE 充填剤では分離可能であった。ODS 充填剤においては固定相が直鎖アルキル型の柔軟な構造をもち、主に溶質の疎水性を識別して分離を行うのに対して、PYE 充填剤においては剛性の大きなピレン環が、立体的および電荷移動相互作用によって異性体の構造を識別しているものと考えられる。

ODS, PYE 充填剤いずれにおいても分離されなかった1,2,4,6/1,2,4,9-TCDD の組み合わせについては、ニトロフェニルエチル型固定相 (NPE: 図3) によって、図5のように容易に分離することができた。⁶⁾ 芳香族塩素化合物との電荷移動錯体生成において、PYE 充填剤が電子供与型の寄与をするのに対して、NPE 充填剤は電子受容型の寄与をして、おもに電子密度の偏りを識別して分離をもたらしたものと考えられる。

このように性質の異なるカラム充填剤を使用して、さらにPCB, PCDD, PCDF ならびにPCDTなどのcongenerのHPLCによる分離精製を行っている。^{7,8)}

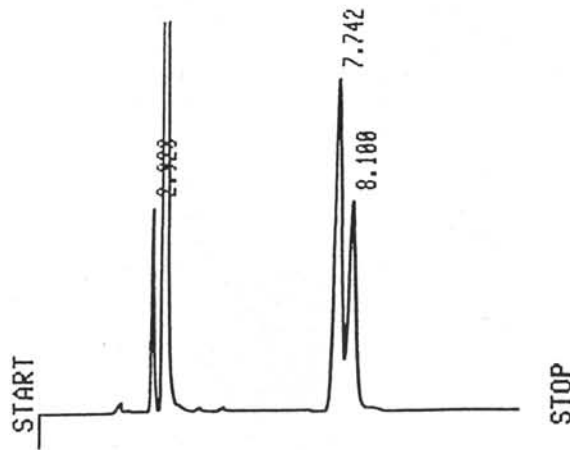


図5 NPE 充填剤による 1, 2, 4, 6 / 1, 2, 4, 9-TCDD の分離
移動相 ; メタノール / 水 = 90 / 10

3. 超高性能分離法による芳香族塩素化合物 congener の一斉分離

標準化合物の分取精製と並ぶ大きな課題は、キャピラリーGCでも分離不可能な異性体の一斉分離を可能とするクロマトグラフィー法の開発である。定量法としてはMSが必要であるので、マイクロHPLCあるいはキャピラリー電気泳動が分離手段として考えられる。

まず液体クロマトグラフィー法にかわる精密分離法として、高性能キャピラリー電気泳動法の芳香族塩素化合物分離への適用を試みた結果を示す。一般的には電気泳動による分離法は、電荷を持たない化合物には適用できないと考えられてきた。京都大学の寺部助教授によって開発されたElectrokinetic (動電) クロマトグラフィー (EKC) は、シリカキャピラリー中に無機電解質を含むミセル水溶液を充填し、水溶性をもつ化合物のミセル水間の分配と、電場の下でのミセルの電気泳動ならびにシリカの表面電荷による電気浸透流とを組み合わせ、電荷をもたない化合物についての高性能分離を可能にしたものである。⁹⁾ この新しい分離法は、短時間に1,000,000段にもものぼる理論段数を与えることも可能で、現在非常に注目を集めている。今回対象とした芳香族塩素化合物のような非水溶性化合物の分離においては、芳香族化合物を選択的に取り込むことのできるシクロデキストリンのような水溶性キャリアーをミセル系に共存させ、ミセル中とキャリアー水溶液中との間の溶質の分配の差を分離に利用している。

γ -シクロデキストリンをキャリアーとして使用し、内径50 μm 、長さ70 cmのシリカ管に、約15,000ボルトの電圧をかける条件下で、EKCによって、TCDDやPCBの異性体が容易に分離された(図6)。¹⁰⁾ 一般的にはEKCは、HPLCやGCと相補的に使用されるものと考えられるが、この分離法とMSとの結合はきわめて興味のある課題である。

HPLCによる、芳香族塩素化合物の一斉分離の試みとしては、直鎖アルキル型と芳香族型の充填剤の組み合わせを用いる逆相クロマトグラフィーを検討した。性質の異なる充

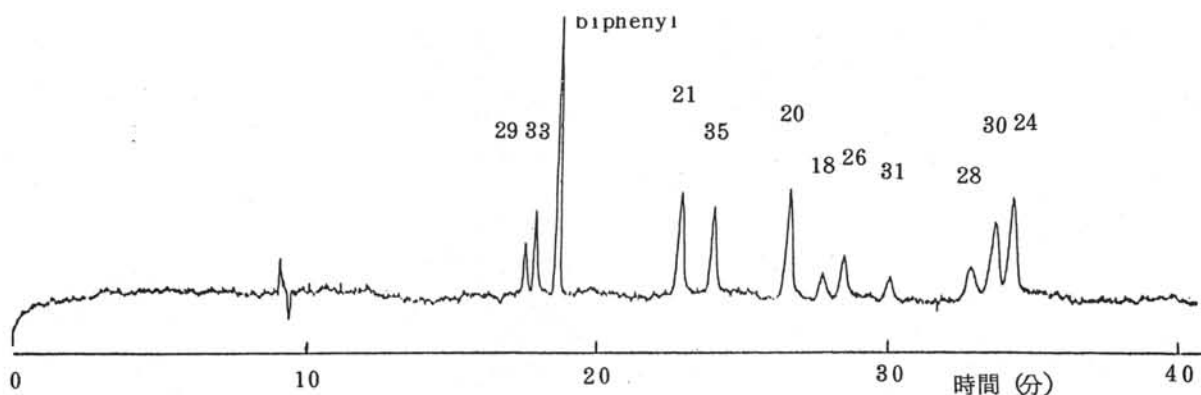


図6 Electrokinetic クロマトグラフィーによる Trichlorobiphenyl の分離
 (番号はPCBの IUPAC No.) 0.1Mホウ酸-0.05Mリン酸緩衝溶液, pH 8.0,
 60mM γ -シクロデキストリン, 100mM SDS, 2M尿素, シリカキャピラリー
 50 μ m ID, 長さ 65 cm, 有効長さ 50 cm. 電圧 15.4kV. 電流 50 μ A.

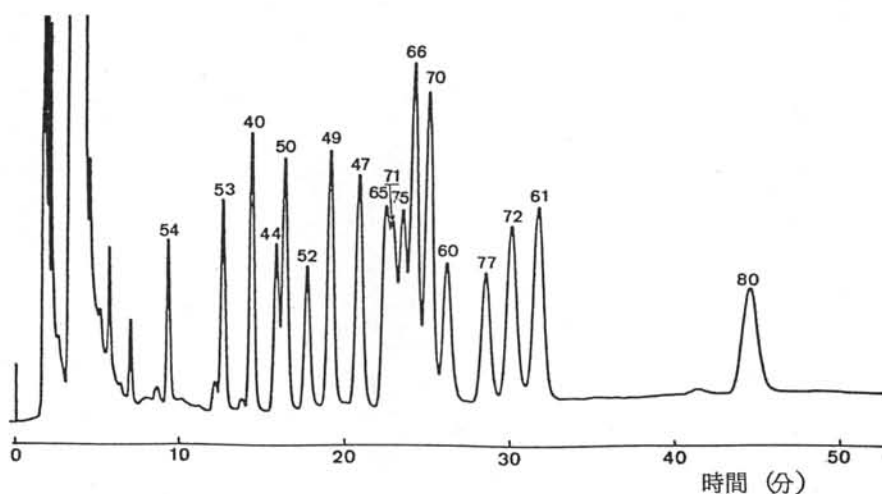


図7 逆相クロマトグラフィーによる tetrachlorobiphenyl の分離
 (番号はPCBの IUPAC No.) 移動相: 80%メタノール.
 カラム: 4.6mm ID, 10 cm ODS + 15 cm NPE.
 流速: 1.0ml/min. 35 $^{\circ}$ C.

充填剤を組み合わせることにより, TCDDについてすべての異性体を分離できる可能性を
 図4と5に示したが, 同様に直鎖アルキル型と芳香族型の充填剤を組み合わせるとPCB異性体
 を分離した結果を示す(図7)。ここではODS充填剤とNPE充填剤とを使用して, 4個の塩素
 をもつPCB異性体42種の中で標準試料が供給されている18種を分離している。¹⁾

このような分離についてカラムスイッチングにより分離を最適化し, 操作を自動化して
 MSと結合することは次の課題である。さらに試料の調製について, ヒトの腹部の脂肪組
 織(約50g)を摘出し, そのサンプルから溶媒抽出と複数のカラムクロマトグラフィー
 分離を経て, キャピラリーGC-MSによる分離定量用のサンプルが調製されるという現

在の試料調製法の自動化を可能とするために、血清を大量に直接注入できるカラム充填剤を合成することもこの分野におけるHPLCの課題として挙げられる。また、EKCにおいては、選択性をさらに向上するための新しいキャリアーの設計と合成に興味もたれる。

おわりに

TCDDのヒトに対する毒性はギネアピッグに対する毒性よりはるかに低いと考えられており、セベソ事件では250gものTCDDが飛散したと推定されているが、住民について主に皮膚症状がみられ死にいたったケースはない。しかし、同時に環境科学で重要視されるPCDD類の強い変異原性は、現在すでにベトナムで問題とされているように、その遺伝的な影響について長期的な検討を必要とするものである。

芳香族塩素化合物は環境中で非常に安定であり、おもに食物を通じて生体内では脂肪組織に蓄積される。日本では愛媛大学、摂南大学、第一薬科大学、国立公害研究所などで環境分布、生物体内分布、人の摂取の実状などについての研究が進められており、本学でも、工芸学部物質工学科のグループは、この系統を含む有機塩素化合物の分解の研究を進めて成果を挙げている。¹²⁾

アメリカでは、枯葉剤散布作戦に直接的、間接的に参加、遭遇したベトナム帰還兵による訴訟問題もあって、政府の主導の下に研究が進められ、Centers for Disease Control (CDC) 中の Center for Environmental Health Laboratory Sciences (EHLS), Toxicology Branch (毒物学部門)が、芳香族塩素化合物について分布と生物学的効果についての研究調査ならびに標準品の合成を担当している。EHLSは、定期的にPCDD摂取者について体内レベルを測定し、長期的な動態と健康への影響を検討しているが、PCDD類の中でも2,3,7,8-TCDDの体内半減期が非常に長いことが報告されている。現在EHLSの調査対象となっている化合物は芳香族塩素化合物にとどまらず、発ガン性の多環芳香族化合物、受動的喫煙について問題となるニコチンとコチニン（ニコチンの代謝物）なども含まれている。今後、分離法に関する基礎、応用両面における進歩がこのような努力を通じて、環境の改善に役立つことを期待したい。

筆者らは、従来からこのCDCグループと共同研究を行ってきたが、今回科学研究費補助金による補助によって可能となった現地での実験の結果も含めてその内容を紹介させていただいた。ここでは概説にとどめ結果と実験の詳細は省略した。科学研究費補助金（国際学術研究：共同研究）によって本研究の機会を与えられたことに感謝するとともに寺部茂京都大学助教授（現姫路工業大学教授）、細矢憲織維学部助手、D. G. Patterson, E. R. Barnhart, L. R. Alexander 以上CDC研究員、B. L. Karger Northeastern大学教授、P. Haglund スウェーデン国立環境保護機構研究員ら共同研究者の方々、ならびにHPLC用充填剤とカラムを調製し、HPLC分離を実行していただいた、本学大学院博士課程木全一博氏に謝意を表す。（繊維学部高分子学科 助教授）

参考文献

- 1) E. E. McConnell, J. A. Moore, J. K. Haseman, M. W. Harris, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 44, 335 (1978).
- 2) E. R. Barnhart, D. G. Patterson, N. Tanaka, M. Araki, *J. Chromatogr.*, 445, 145 (1988).
- 3) N. Tanaka, Y. Tokuda, K. Iwaguchi, M. Araki, *J. Chromatogr.*, 239, 761 (1982).
- 4) E. R. Barnhart, D. O. Ashley, V. V. Reddy, D. G. Patterson, *J. HRC & CC*, 9, 528 (1986).
- 5) N. Tanaka, K. Hosoya, Y. Tachibana, M. Araki, K. Tanaka, A. Kaji, *J. Chromatogr. Sci.*, 27, 735 (1989).
- 6) K. Kimata, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Araki, E. Barnhart, D. G. Patterson, S. Terabe, *J. HRC & CC*, in press.
- 7) P. Haglund, L. Asplund, U. Jernnas, B. Jansson, *J. Chromatogr.*, in press.
- 8) E. R. Barnhart, et al., 14th International Symposium on Column Liquid Chromatography, 1990.
- 9) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56, 111 (1984). S. Terabe, *Trends Anal. Chem.*, 8, 129 (1989).
- 10) S. Terabe, et al., 2nd International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis, 1990, *J. Chromatogr.*, submitted.
- 11) 木全他, 日本分析化学会第38年会, 1989.
- 12) K. Fukunishi, W. Kawahara, H. Yamanaka, M. Kuwabara, M. Nomura, *Chem. Express*, 4, 101 (1989).