

## 環境試料に対するグアニジン系化合物の分析法

01 論文誌品名 環境衛生学雑誌 著者名 沼田 一  
(0791) 08-08

雨宮 英子

一般的に、メチルグアニジン (MG) は加工された動物食品中に高濃度に含まれており、その N-ニトロ化合物 (methylnitroso cyanamide, methylnitroso urea) また、加熱分解産物は極めて強い突然変異誘起性を持っている<sup>1,2)</sup>。Kawabataら<sup>3,4)</sup>は、ヘキサフルオロアセチルアセテート (HFAA) 誘導体として食品中の MG 含量を測定、くん製魚類製品中から最高 178 mg/kg を検出している。

一方、グアニジン (G)、シアノグアニジン (cyano G) 等は、防炎加工、肥料、油脂防腐剤、合成原料等として、また、ジフェニルグアニジン (DiP-G) は、加硫促進剤として年間 1,800 トン生産されており<sup>5)</sup>、これらのグアニジン系化合物は難分解性として知られているが<sup>6)</sup>、環境中における挙動は明らかでない。DiP-G に関しては、先に高速液体クロマトグラフィーにより、環境試料 (水質・底質) に対する調査を行ったが<sup>7)</sup>、今回、G, MG を中心とし HFAA 誘導体として、環境試料に対する分析方法について検討を行ったので、この結果を報告する。

### 実 験 方 法

#### 1. 試 薬 ・ 試 液

HFAA : (ワコー)

ピリジン : シリル化用 (日本クロマト)

ワコーゲル S-1 : (ワコー), 130°C, 3 時間加熱活性化後、デシケータ中で 1 時間放冷後使用

アンバーライト XAD 2, 4, 8 : 大型ソックスレー抽出器を用い、メタノール、アセトニトリル、次いでエチルエーテルを用いて洗浄後、メタノール中に貯蔵

3 N-HCl : 精密分析用塩酸 (20%) を水で 2 倍に希釈  
G・MG 混合標準液 : 塩酸 G および MG をそれぞれ 0.100 g 採取、エタノールを用いて溶解後、50 ml の定容とし標準原液を調製する。この標準原液から塩酸 G 16.17 mg, MG 10 mg 相当量を採取し、エタノールを用いて 100 ml とし混合標準液を調製する。この標準液 1 ml 中には、G および MG それぞれ 100 μg を含有する。

ベンゼン, n-ヘキサン : 残留農薬分析用

#### 2. 器 具

ECD ガスクロマトグラフ : 日立 073 型

水平振とう器 : ヤヨイ Model 8-1

リアクティブ・サーモヒーター : ピアス化学 (鋳製)

サンプル・コンセントレーター

シリ・サーモヒーター

5 ml ミニバイアル (テフロン・ラバーディスク付)

マイクロシリンジ (50 μl, 250 μl)

共通すり合せ濃縮用試験管 (内容量約 30 ml, 口径 24/40)

ピペット : 1 ml 駒込ピペットの先端を細くのはしたものの。

#### 3. 試料の前処理

##### (1) 水 質 試 料

pH を 3~4 に調整した試料水 200 ml を分液漏斗中に採取し、n-ヘキサシ 40 ml を加え 10 分間振とう、静置後分離した水層をガラス蒸発皿中に移し、水浴上で蒸発乾固した。次いで、蒸発残留物にエタノール約 3 ml を加え、軽くかくはんして抽出、この抽出液をミニバイアル中に移し、シリ・サーモヒーターおよびコンセントレーターを用い、60°C 以下、窒素気流中で蒸発乾固、更にこの抽出操作を 1 回繰り返した。

##### (2) 底 質 試 料

底質 20 g (湿) を 500 ml 共栓三角フラスコ中に採取し、水 (pH 3~4 に調整) 150 ml を加え、水平振とう器を用いて 20 分間振とう後ろ過 (ろ紙 No. 5 A) した。残留物は同一水約 50 ml を用いて洗浄し、洗液はろ液に合した。このろ液に n-ヘキサン 40 ml を加え 10 分間振とう静置後、分離した水層について、以下水質試料と同一操作によって試料を調製した。

#### 4. HFAA 誘導体試験溶液の調製

前項で得たミニバイアル中の抽出残留物に、マイクロシリンジを用いピリジン 100 μl, HFAA 50 μl を加え密栓後、リアクティブ・サーモヒーターを用いて 100°C, 60 分間加熱した。冷後、n-ヘキサン 2 ml, 次いで 3 N-HCl 2 ml を加え密栓し軽く振とう後放置した。ピペットを用い n-ヘキサン抽出層を濃縮用試験管中に移し入れ、更に n-ヘキサン 2 ml ずつ 4 回同様に抽出操作を繰り返して抽出液を合した。この抽出液をロータリーエバポレーターを用い、40°C 以下で約 2~3 ml に濃縮後、ワコーゲル S-1 カラム (10×300 mm, 活性ワコーゲル S-1 1.5 g および無水硫酸ナトリウム約 1~2 g を層積)

上にのせ、n-ヘキサン 50 ml を流したのち、続いてベンゼン 70 ml を流し、ベンゼン溶出液 0~20 ml (MG 測定検液) および 20~70 ml (G 測定検液) の画分を採取、KD 濃縮器で 5 ml の定容に濃縮した液を GC 試験用検液とした。

## 5. 測定

前項の GC 試験用検液 2  $\mu$ l をガスクロマトグラフに注入、G はピーク面積により、MG はピーク高からその濃度を算出した。検量線は G・MG エタノール標準液 10  $\mu$ g をミニバイアル中に採取、同様な操作によって HF AA 誘導体を生成させ、ワコーゲル S-1 カラムでクリーンアップ、最終液 10 ml に調整 (1  $\mu$ g/ml) 後、この調整液をベンゼンで希釈して作成した。

GC 測定条件:

充てん剤: 10% PEG 6000, Shimalite W 60/80,  
3 mm $\phi$   $\times$  2 m カラム

温度: カラム 150 $^{\circ}$ C, 注入口 180 $^{\circ}$ C, 検出液 180 $^{\circ}$ C

キャリアガス: N<sub>2</sub> 50 ml/min

チャートスピード: 5 mm/min

## 実験結果

### 1. HF AA 誘導体生成条件の検討

グアニジン系化合物および HF AA 試薬との反応条件を検討するため、G 100  $\mu$ g を用い、ピリジン 25~150  $\mu$ l, 反応時間 30~120 分 および 反応温度 60~120 $^{\circ}$ C の条件下で、HF AA $\cdot$ G 生成量を測定した。この結果は Fig. 1 に示したように、ピリジン添加量 25  $\mu$ l 以上、反応時間 60 分以上および 反応温度 100 $^{\circ}$ C 以上で良好の成績が得られ、以降、HF AA 反応は HF AA 50  $\mu$ l, ピリジン 100  $\mu$ l, 100 $^{\circ}$ C 60 分の条件下で実施した。

### 2. HF AA 誘導体クリーンアップの検討

生成 HF AA $\cdot$ G を、直接 GC に注入した場合、多数の妨害ピークの出現が認められたことから、シリカゲルカラムによるクリーンアップ法について検討を行った。すなわち、Fig. 2 に示したように G, MG および cyano G の HF AA 誘導体をワコーゲル S-1 カラム (10  $\times$  300 mm, 活性ワコーゲル 1.5 g) および溶出剤ベンゼンを用いて、各溶出画分を求めた結果、MG 0~20 ml, G 20~60 ml また cyano G は 0~20 ml および 20~80 ml の画分に溶出、2 峰性を示していた。これら HF AA 誘導体のクロマトグラムは Fig. 3 に示したように MG は Rt 2.5 分, G および cyano G は 8.2 分の位置にピークを示し、妨害ピークは認められなかった。

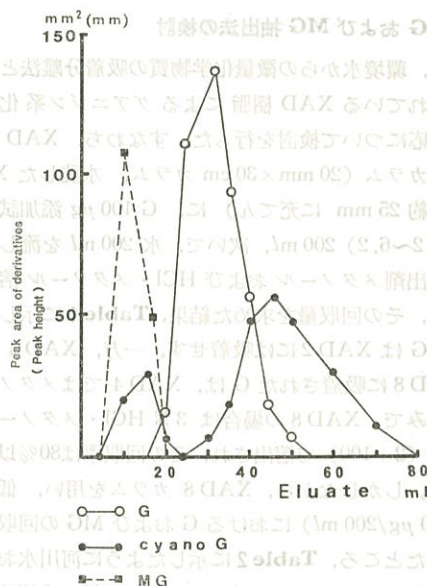


Fig. 2 Elution patterns of the HF AA-derivatives of guanidino compounds

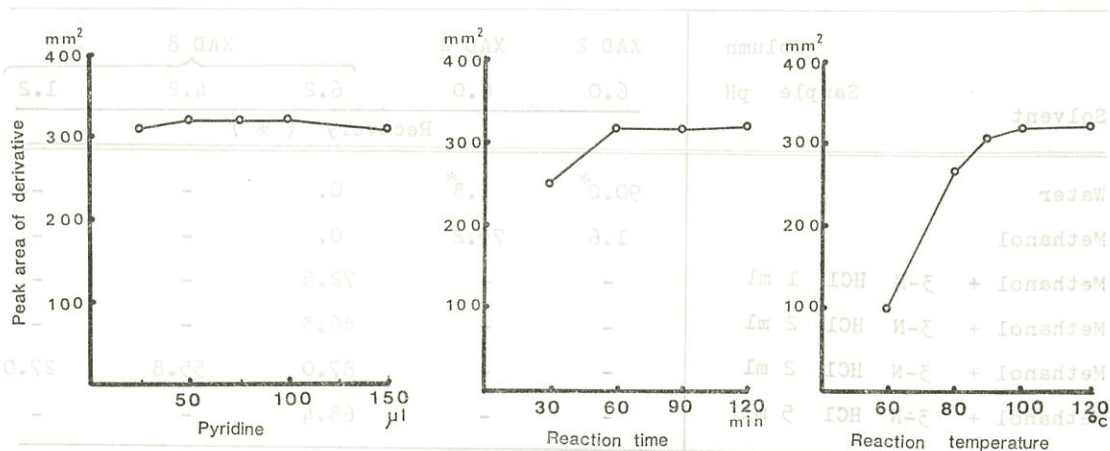


Fig. 1 Effect of reagent amount, reaction time and temperature on the preparation of HF AA-guanidine (HF AA: 50  $\mu$ l)

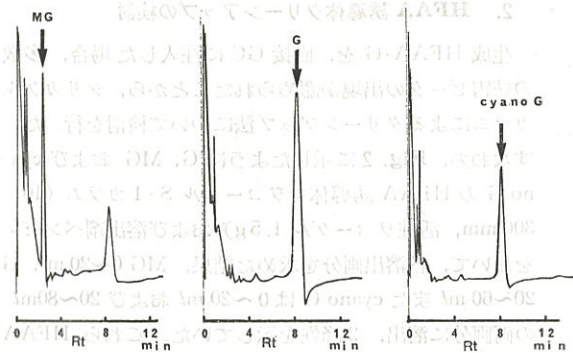


Fig. 3 Gaschromatogram of the HFAA-derivatives of methylguanidine (MG), guanidine (G) and cyanoguanidine (cyano G).

### 3. G および MG 抽出法の検討

従来、環境水からの微量化学物質の吸着分離法として用いられている XAD 樹脂による グアニジン系化合物への適応について検討を行った。すなわち、XAD 2, 4, 8 カラム (20 mm × 30 cm カラム, 水洗した XAD を高さ約 25 mm に充てん) に、G 100 μg 添加試料水 (pH 1.2~6.2) 200 ml, 次いで、水 200 ml を流したのち、溶出剤メタノール および HCl・メタノール 溶媒を用いて、その回収量を求めた結果、Table 1 に示したように、G は XAD 2 には吸着せず、一方、XAD 4 および XAD 8 に吸着された G は、XAD 4 ではメタノール溶媒のみで、XAD 8 の場合は 3 N HCl・メタノール混合溶媒 (2+100) で溶出され、その回収率は 80% 以上であった。しかしながら、XAD 8 カラムを用い、低濃度 (2, 20 μg/200 ml) における G および MG の回収試験を行ったところ、Table 2 に示したように河川水および底質試料では、精製水と異なって極めて低い成績値を示

していた。このことから、今回は、Fig. 4 のフローシートで示したように、試料水を直接、水溶上で加熱濃縮後の蒸発残留物からエタノールを用いて抽出する方法について検討を行った。この結果、XAD 8 カラムによる吸着分離法と比較して、実試料でも良好な回収成績を示し、河川水では G 82.9 ± 9.42%, MG 69.8 ± 5.93% であった。しかし、底質の場合は G 42.7 ± 7.34%, MG 10.5 ± 1.89% と低い回収結果であった。

### 4. 環境試料中の G, MG 濃度

本法を用い、県内の河川水、底質に対する調査結果は Table 3 に示したように、河川水の場合、最高 G 2.88 μg/l, MG 1.13 μg/l, 底質では、最高 G 0.042 μg/g, MG は検出限界値以下であり、この濃度値は、必ずしも BOD の汚染濃度値とは同一傾向を示さなかった。また、飲料水 2 例の測定値は、いずれも検出限界値以下であった。

なお、G および MG の検量線は Fig. 5 に示したとおりであり、その検出下限値は、水質試料 G 0.05 μg/l, MG 0.20 μg/l, 底質試料 G 0.005 μg/g, MG 0.002 μg/g であった。

## 考 察

従来、グアニジン化合物は、そのニトロソ化合物による変異原性や発癌性以外に、生体に対し、腎不全またこれに伴う尿毒症疾患時における尿毒症発症物質 (Uremic toxins) として、臨床面からも注目されている<sup>8)</sup>。血清また尿中に含まれている G, MG 等に対する測定は、一般的には、弱酸性陽イオン交換樹脂を用いて吸着分離し、アルカリ剤で溶出後、坂口反応あるいは Voges-Proskauer 反応、Staron-Allard 反応等により比色定

Table 1 Recovery Tests of Guanidine added to Water

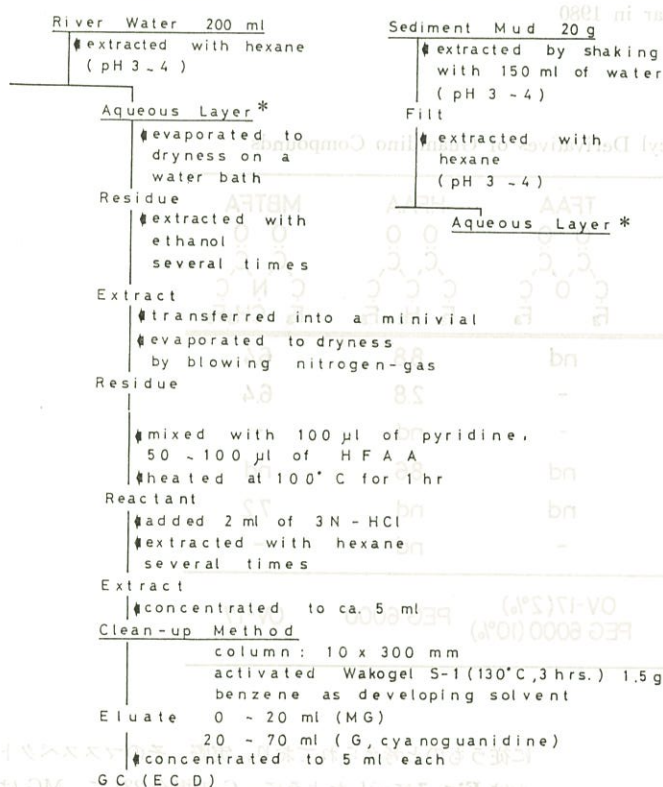
Solvent	Column	Sample	pH	XAD 2	XAD 4	XAD 8		
				6.0	6.0	6.2	4.2	1.2
				Recovery (%)				
Water				90.0*	4.8*	0.	-	-
Methanol				1.6	79.2	0.	-	-
Methanol +	3-N	HCl	1 ml	-	-	72.5	-	-
Methanol +	3-N	HCl	2 ml	-	-	86.3	-	-
Methanol +	3-N	HCl	2 ml	-	-	87.0	55.8	27.0
Methanol +	3-N	HCl	5 ml	-	-	68.4	-	-

Guanidine was added to 200 ml water at a level of 0.5 μg/ml

\* Guanidine passed through the column without binding

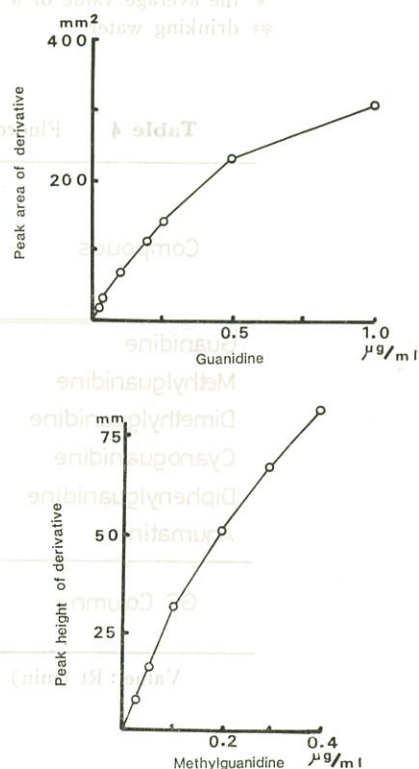
**Table 2** Recovery Tests of Methylguanidine and Guanidine added to Samples

Procedure	Sample	n	Recovery (%)			
			MG ( $\bar{x} \pm s$ )		G ( $\bar{x} \pm s$ )	
XAD-8 column absorption						
20 $\mu$ g/200 ml	purified water	2	-		98.8	
2		4	93.8	6.61	94.4	3.25
20	river water	2	23.3		26.3	
2		7	13.0	4.41	28.9	11.00
20 $\mu$ g/20 g	sediment	3	17.0		22.7	
2		3	0		0	
Direct Concentration						
2 $\mu$ g/200 ml	river water	7	69.8	5.93	82.9	9.42
2 $\mu$ g/20 g	sediment	8	10.5	1.89	42.7	7.34



**Fig. 4** Schema of the procedure for the determination of guanidino compounds

量を行っており<sup>9-11)</sup>、また、大倉ら<sup>8)</sup>はベンゾイン蛍光法による高速液体クロマトグラフィーを用いた迅速分離定量法を報告している。しかしながら、今回は、感度また物質同定等の立場から、環境試料についてはアシル誘導体とし GC を用いた微量定量法について検討を行った。



**Fig. 5** Calibration curve for quantitative determination of guanidine and methylguanidine

すなわち、各グアニジン系化合物について HFAA 誘導体と共に、トリフルオロアセチル (TFAA) およびメチルピス (トリフルオロ) アセトアミド (MBTFA) について、検討の結果を **Table. 4** に示した。この成績から G および MG の測定法として、Kawabata らの報告と同様に、HFAA 誘導体とし、この場合、反応は **Fig. 6**

**Table 3** Guanidino Compounds Content in Ambient Samples

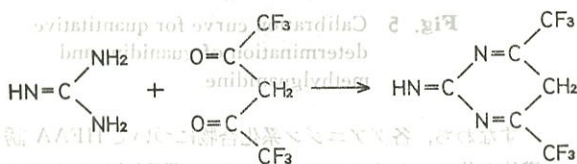
Sampling point No.	River Water			Sampling point No.	Sediment	
	BOD (mg/l)*	M.G. (μg/l)	G.		M.G. (μg/g.dry)	G.
1	0.9	<0.20	0.60	1	<0.002	<0.005
2	1.0	<0.20	<0.50	3	<0.002	0.012
3	2.8	0.33	1.65	5-1	<0.002	0.033
4	3.1	0.25	0.95	5-2	<0.002	0.036
5-1	3.5	0.40	1.30	8-1	<0.002	0.042
2	-	1.13	2.88	8-2	<0.002	0.031
3	-	0.70	1.85			
6	3.9	0.55	0.75			
7	3.9	0.45	2.65			
8	10.8	1.10	1.70			
D-1**	-	<0.20	<0.50			
D 2**	-	<0.20	<0.50			

\* the average value of a year in 1980

\*\* drinking water

**Table 4** Fluoroacyl Derivatives of Guanidino Compounds

Compounds	TFAA	HFAA	MBTFA
Guanidine	nd	8.8	6.4
Methylguanidine	-	2.8	6.4
Dimethylguanidine	-	nd	-
Cyanoguanidine	nd	8.6	nd
Diphenylguanidine	nd	nd	7.2
Agumatine	-	nd	-
GC Column	OV-17(2%) PEG 6000 (10%)	PEG 6000	OV-17
Value : Rt (min)			



**Fig. 6** Probable Structure of HFAA Derivative of Guanidine

に従うものと考えられており、実際、そのマススペクトルは Fig. 7 に示したように、G の場合 231 に、MG は 245 の位置に Molecular ion が確認された。また、この測定に際し、Kawabata らは生成誘導体を直接 GC に導入しているが、多数の妨害ピークが認められたことからクリーンアップ法について検討の結果、シリカゲルカラムの採用により良好な結果が得られた。環境試料水から、微量化学物質の吸着分離法として知られている XAD 樹脂を用いたグアニジン系化合物の分離法について検討の結果は、精製水の場合と異なって、実試料では、極めて低い回収成績を示し、微量の G およ

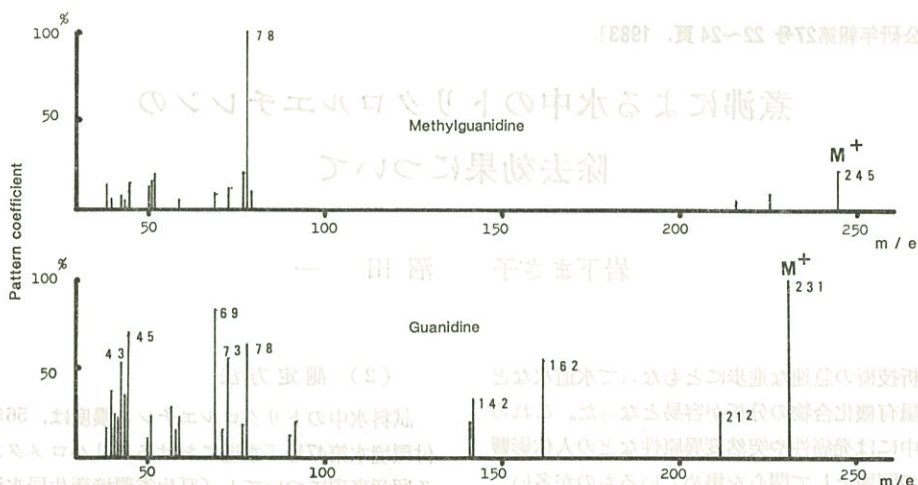


Fig. 7 Mass spectra of the HFAA-derivatives of methylguanidine and guanidine

び MG 分離法として不適當であることを認めた。この要因として G, MG 等は強塩基性物質として知られており、環境水中では、フミン酸等の酸性成分等と結合し、その挙動、形態等は、精製水中と異っているものと予想している。実際、環境試料に対する G および MG の測定結果は、河川水では  $3 \mu\text{g}/\text{l}$  以下、底質試料では G  $0.05 \mu\text{g}/\text{g}$  以下、MG は  $0.002 \mu\text{g}/\text{g}$  以下と、食品中の MG 含量<sup>4)</sup> に較べて遙かに低く、また、水中におけるジフェニルニトロソアミン、ニトログアニジンの最大許容濃度  $0.1 \text{mg}/\text{l}$ <sup>13)</sup> に比較しても、環境中におけるグアニジン系化合物は、遊離型としては極めて低濃度の条件下にあるものと認められた。

## 結 論

グアニジンおよびメチルグアニジンについて、ヘキサフルオロアセチルアセトン誘導体としてガスクロマトグラフィーによる測定法を検討し、本法が、環境試料（水質、底質）に対し、微量定量法として適応し得ることを認めた。検出下限値（水質試料）G  $0.50 \mu\text{g}/\text{l}$ 、MG  $0.20 \mu\text{g}/\text{l}$ ；（底質試料）G  $0.005 \mu\text{g}/\text{g}$ 、MG  $0.002 \mu\text{g}/\text{g}$

本研究の費用の一部は、環境庁環境保健部保健調査室、化学物質環境調査委託費によってまかなわれたものであり、感謝の意を表します。また、GC-MS による測定は、大阪市立環境科学研究所加藤敬香前分析技術課長の御好意により実施したものであり、あらためて感謝いたします。

本論文の要旨は、第 8 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウムにおいて発表を行った。

## 文 献

- 1) 石館守三編：生活環境と発がん—大気・水・食品—61~63, 朝倉書店 (1979)
- 2) 大江武：京都市衛生研究所年報 **46**, 120~121 (1979)
- 3) Kawabata T. & Ohshima H. : Journal of Chromatography **140**, 47~56 (1977)
- 4) Kawabata T., Ohshima H. & Ino M. : Work Conf. Environ. Asp. N-Nitroso Comp. **1977**, 415~423 (1978)
- 5) 環境庁保健調査室：昭和52年版ケミカルアセスメント・アニュアルレポート—化学物質と環境—17 (1979)
- 6) 戎野棟一, 滝本道明：衛生化学 **27**, 156~162 (1981)
- 7) 沼田一, 雨宮英子：第 2 回環境における化学物質分析法研究発表会講演要旨集, 10(1979), 日本環境協会：化学物質分析法開発調査報告書—昭和55年度環境庁公害防止等調査委託費による報告書—(昭和56年 2 月)
- 8) 大倉洋甫, 黄耀麟, 能田均：Hitachi Scientific Instrument News **25**, 2136~2140 (1982)
- 9) Pilsun J. F. : Methods Biochemical Analysis **7**, 210~212 (1959)
- 10) Stein I. M. et al : J. Lab. Clin. Med. **77**, 1020~1024 (1971)
- 11) Micklus M. J. & Stein I. M. : Analytical Biochemistry **54**, 545~553 (1973)
- 12) 環境庁保健調査室：化学物質環境分析手法, 73~74 講談社 (1980)
- 13) Korolev et al : Gig Sanit **1**, 18~20 (1980)