

水産生物の斃死現象に関する研究——V

生物体内PCPの検出定量法

箕 田 冠 一

I 結 言

農業PCPの水産被害問題に当って、被害生物体からPCPの影響の痕跡が確実に検出立証し得るならば、問題に明確な科学的根拠が与えられ、その対策や措置に資する所は大きい。又それを、定量的に検出し得るならば、毒物の一種であるPCPが、いかなる経路で、水産生物に影響を及ぼすかを追究する手段として、従来になかった最も直接的な武器の一つとなり得よう。

筆者は、この社会問題としての重要性と、技術上の必要とから、本県水産業に大きな打撃を与えた昭和37年度のPCPによる被害問題以来、引つゞき、この面の検討を行なつて来たが、昭和37年度においては、酸性水蒸気蒸溜・サフラニン—0法で斃死生物体からのPCPの検出を試み、その結果を報告¹⁾した。その後、昭和38年度から4アミノアンチピリン法²⁾を採用するに及んで生物体からの検出にも全法を採用することとして研究した結果、サフラニン—0法の場合と同様、被害生物体からPCPを検出し得ること、サフラニン—0法よりも優れた点が多いことなどが判り昭和38年度から実際にも応用し好成績を得ている。

この間、この問題については、38年7月、津田・狩谷³⁾が「魚体中のPCP確認法」として筆者と同様、酸性水蒸気蒸溜、4アミノアンチピリン法で、魚体からPCPを検出し得ることを報告している。

こゝには、サフラニン—0法による方法から出発して、種々改良を加えた結果、充分とは云えないが或程度満足し得る結果の得られている、現在筆者のとっている生物体からのPCPの定量的検出法と二・三の考察を述べて、参考の資としたい。

II 分 析 方 法

原 理

本法は、PCPによって、斃死し、若しくは影響をうけた生物体は、その体内に、いくらかのPCPの痕跡を残すのではないかとの考え方のもとに、体内からPCPを分離抽出して、4アミノアンチピリン法により比色定量しようとしたものである。この方法を考案するに当っては、簡便に精度よく正確且つ定量的に検出し得ることを目標とした。方法の概要は以下のとおりである。

- 1) 試料 + 10% NaOH → 加熱溶解 + HCl (酸性化) → 水蒸気蒸溜 40分
- 2) 溜液 + HCl + クロロホルム → しんとう抽出 (2回)
- 3) クロロホルム + 0.1% NaOH → しんとう抽出 (2回)
- 4) 0.1% NaOH 蒸発乾固 乾燥
- 5) 残渣 + 水 → 溶解 + PH 緩衝液 → PHの調整 + 発色試薬 → 発色 → 比色

試 薬

- | | |
|-----------------------------------|--|
| a) 水酸化ナトリウム 10%水溶液 | 特級 NaOH 10g を水にとかして 100cc とする。 |
| b) " 0.1%水溶液 | " 1g を水にとかして 1ℓ とする。 |
| c) 塩酸 1:1 | 水 1容 に対して 塩酸 1容 を加えて 混和する。 |
| d) 硼酸 4%水溶液 | 特級 H ₃ BO ₃ 4g を水にとかして 100cc とする。 |
| e) 第2リン酸ナトリウム 5%水溶液 | 特級 Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 50g を水にとかして 1ℓ とする。 |
| f) 4アミノアンチピリン 0.2%水溶液 | 特級 C ₁₁ H ₁₃ ON ₃ 0.2g を水にとかして 100cc とする。 |
| g) 赤血塩 10%水溶液 | 特級 K ₃ [Fe(CN) ₆] 10g を水にとかして 100cc とする。 |
| h) クロロホルム | 市販 1級品 以上を そのまゝ 用いて よい。 |
| i) 塩化ナトリウム 30%水溶液 | NaCl 30g を水にとかして 100cc とする。 |
| j) PCP 100 ppm 標準原液 ²⁾ | 60℃ で 数時間 乾燥 した PCP-OH 純品 100mg を 0.1% NaOH 20cc で 完全にとかして から 水で 1ℓ とする。
又は PCP-Na 純品 108.2mg を そのまゝ 水にとかして 1ℓ とする。
いづれも、1cc 中 PCP-OH として 100% を 含む。 |

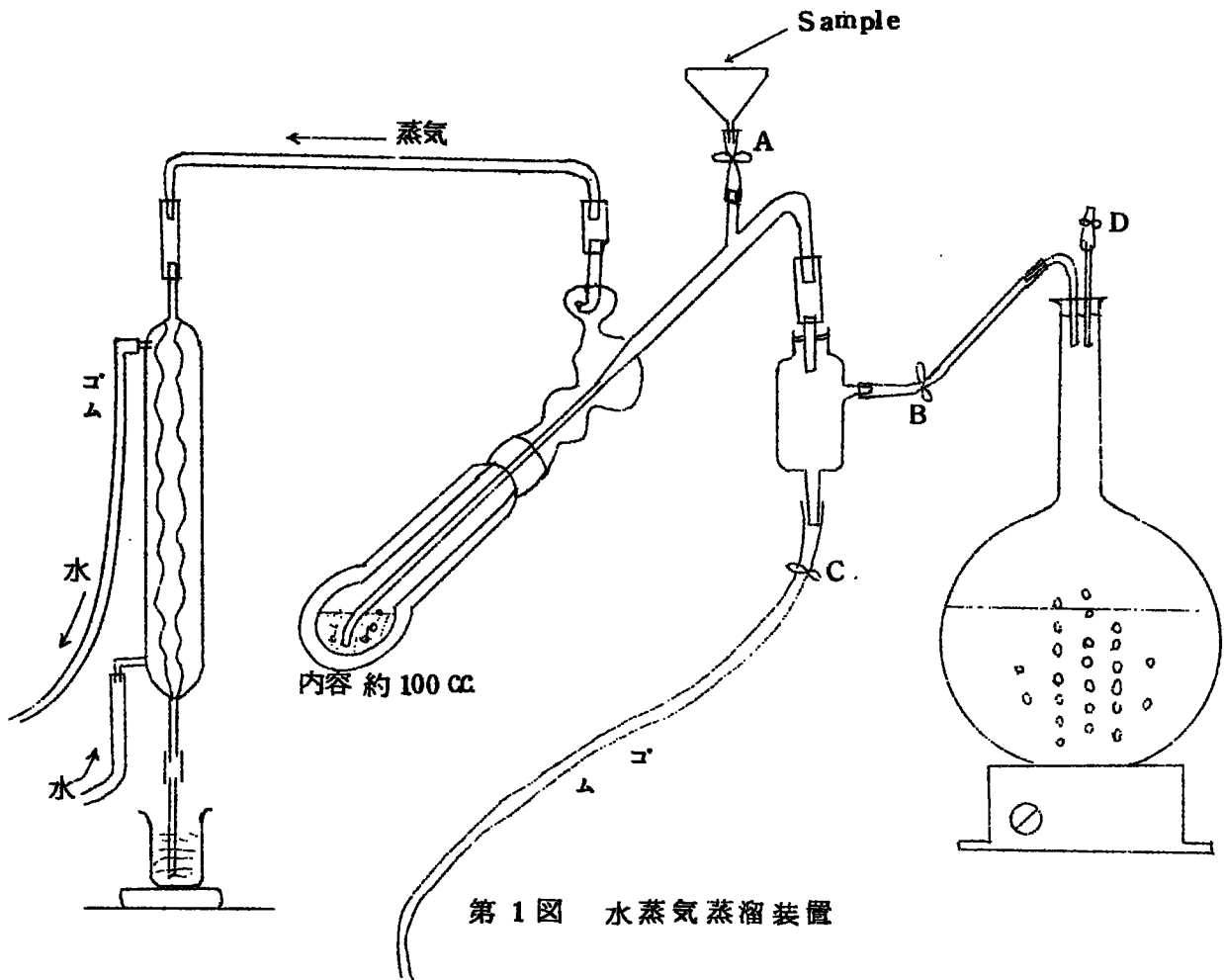
k) メチルオレンジ指示薬

器 具

a) 水蒸気蒸溜装置 第1図参照

操作法 A, B, C のピンチコックを開いて A から Sample を入れる。A, C, D を閉じた状態で蒸溜する。蒸溜後の Sample は、D を開け B を閉じると (A 及び C もとじている) 逆流して C の上にたまるので C から排出する。蒸溜後は水でこの操作を 2~3 回くり返して洗う。この装置のないときは、本研究第Ⅱ報¹⁾ の如き装置でもさしつかえない。

- b) ビーカー 500cc 用 100cc 用
- c) ガラス攪拌棒 長いもの
- d) 分液ロト 500cc 用 100cc 用
- e) ピペット類、便利ピペット 10cc 用、メス、ホールピペット各種、駒込ピペット各種
- f) ロト及びロシ
- g) 分光々電光度計又は比色計
- h) あれば しんとう器 PHメーター 乾燥器等



操 作

- a) 生物体の Sample を 10 g (標準として) 秤取して, 100 cc ビーカーにとり, 10% NaOH を 10 cc 加え, 攪拌棒で攪拌し乍ら加熱する。加熱は弱い直火が良いが, 突沸したり, 泡立って容器からこぼれたりしないように気をつける。10 分位で完全に溶解, 液状となるので加熱をやめ放冷する。
- b) 500 cc ビーカーに 10% NaOH 1 cc と水 10 cc を加え蒸溜装置末端部が NaOH 液中につかるようにする。
- c) 液状になった試料を水蒸気蒸溜装置に流し入れる。(器具 a, 第 1 図参照)。メチルオレンジ指示薬 2~3 滴と 1:1 HCl 10 cc を加える。ビーカーもロトも 2~3 回少量の水で洗いこむ。メチルオレンジは念のため, 1:1 HCl 10 cc 入れれば, NaOH に対し大過剰な量である。
- d) 水蒸気をとおして蒸溜を行なう。(第 1 図 A, C, D をとじて B のみ開ける)
蒸溜する時間は約 30~40 分。溜液は 400 cc 前後が適当である。40 分で 450~500 cc 位溜

取すれば、完全とは云い難いが、殆んど大部分のPCPは抽出するようで残る部分は極めて僅かとなる。

e) 溜液を500CC分液ロトにとり、これはアルカリ性であるから、1:1HCl 5CCを加えて強い酸性とし、クロロホルム10CCを加えてしんとう抽出を行なう。しんとうは手で強く50回位で良い。(時間にして15~20秒)分液を待って、クロロホルム層のみを100CCの分液ロトに移す。更に新しいクロロホルムを加えて抽出分取の操作を行なう。前後計2回。分取したクロロホルム層は合して、50CC位の水を加えてしんとう(約50回)して洗い、水は捨てる。

f) クロロホルム層に0.1%NaOH液10CCを加え強く100回しんとうし(時間にして約30秒)分液をまっけて、水層を分取する。この抽出操作を前後2回繰返す。この際、エマルジョンを作つて全く分液しないようなときは、30%NaClを2~4CC加えると容易に分液するが、水層にクロロホルムが混じることとは一向さしつかえないので、クロロホルムの除去は厳密でなくてよく、従つて、大方の場合NaClは使わないで良い。

g) e)及びf)の操作は、それぞれクロロホルム20CC、0.1%NaOH10CCで1回づつ行なうだけに簡易化しても良い。回収率にそれ程ひびかない。但し、しんとう、分液をていねいにし、硼酸量を $\frac{1}{2}$ とする。

h) 得られた20CCの水層はビーカーにとり、加熱して或程度蒸発させ、水が少量になったら、弱い加熱で、完全に蒸発乾固させる。水が少量になってからは乾燥器100℃で乾燥してもよい。乾燥の途中では、いやな異臭がするが、これがなくなることで、強い加熱をさけるようにすれば乾燥の方法は水浴でも乾燥器でも、速火でも良い。

ここに得られる残渣物は0.1%NaOH20CC中に含まれた約20mgのNaOHと、PCPが存在すれば、PCP-Naの形のもの、外にわずかの有キ物の混合物である。

i) 残渣を20CCの水で数回に分けて加温しながら完全に溶解し、100CC分液ロトに移し入れ、放冷し硼酸4%液3CC、第2リン酸ソーダ5%液10CCを加えてPHを8~8.5位に調整する。

PHメーターがあればたしかめる。

j) クロロホルム10CCと4アミノアンチピリン0.2%液1CCを加えて約30回しんとうする。

次に赤血塩10%液1CCを加えて3分間強くしんとうする。PCPがあるとクロロホルム層に鮮やかな青色が現れる。これをロト及び小ロシ片で濾過して、比色に供する。(この項前報²⁾参照)

最後のしんとうに、水の場合より時間をかけて充分混合攪拌して反応が完全になるようにする。

h) 比色定量

PCPの影響を全然うけていない生物体10gに、標準原液からPCP-OHを100γ以下適宜数ケ量を加えたSampleについて、上の操作を行なつて、検量線を求める。

筆者の経験では、よく平均して80%位の回収が出来る。従つて、水の場合の検量線から定量した値に $\frac{10}{8}$ をかけて求めることも出来る。最終的な表示方法としては $\frac{1}{10}$ g生体として表している。

■ 考 察

1) 回収率について

この点については当初から意をくだいて、回収率の向上を期した。即ち只、PCPの検出及び確認だけなら4アミノアンチピリン法の優れた特異性から考えて比較的簡単であり、且つそれで斃死原因に科学的根拠を与えると云う目的は達せられるが、生物体内でのPCPの動向などの追求と云う目標を持っていたので、それだけで満足しきれず、或程度定量的に検出する方法を求めた。37年度においては裁判化学⁴⁾に倣って細切—水蒸気蒸溜で分離、抽出を試みていたが、この意味で不満を感じ、想像しうる方法を手当り次第に試みて、最終的に最も簡便で、最も回収率が良く、しかも確実な方法として、強アルカリ溶解—強酸性化—水蒸気蒸溜—アルカリで溜液をうけると云う一連の前処理による抽出捕集の方法に落ちつくこととなった。10% NaOH 10 CCで加熱溶解すると、約10分位で処理出来、しかも骨等の一部器官をのぞいて、大部分の生物体組織内にPCPが残る余地は全く考えられず、且つPCPはPCP-Naの形となるので、この程度の処理では安定である。蒸溜時間を40分としても、1時間内に生物体中のPCPはPCP-Naのアルカリ水溶液の形で殆んど100%に近く分離捕集することが出来る。その後PCP尿素研究会から発表された方法⁵⁾(津田等の方法³⁾と同じ)についても追試してみたが、0.5% NaOHで30分間3回しんとう抽出しても、水温、しんとう強度にもよるが、あとの細切魚体から筆者の方法でかなりのPCPが検出される(低水温時、鯉をPCPで致死せしめ、記載の通りの条件でしんとう器を用いて3回抽出した実験で平均 $\frac{1}{3}$ 程度残留を認めた。)ので、確認方法としては問題はないが、操作の不便さ、時間のかゝること、定量性、回収率などから、その方法に従いきれない点があった。

ところで、回収率の検討には生物体+既知量のPCPで操作を行なっているが、これと影響生物体中にとり入れられた状態とで、PCPが操作中異った行動をとる可能性が考え得るだろうがこの点常に留意して来た所であるが、現在までの所では、本法で実験した各種のデータは10% NaOHに溶解した状態で、両者は同じ形になって了うことを示しているようである。

次の過程即ち溜液酸性化—クロロホルム抽出は速かで且つ回収率も良い。本法のようにして、損失する部分は極めて少ないと云える。20CCで一回の抽出でもていねいにやれば、満足な結果が得られる。

又、水洗、クロロホルム—0.1% NaOH抽出の過程でも特に留意する程の損失は認められない。

本法の操作でPCPの損失が考えられるのは

- ① 10% NaOH溶解 — 蒸溜装置移しかえ。
- ② 蒸溜操作 (時間不足等)
- ③ 溜液 — クロロホルム
- ④ クロロホルム — 0.1% NaOH
- ⑤ 蒸発乾固

⑥ 残渣溶解 → 100cc分液ロト移しかえ

等の諸過程であるが、上記の方法で特に大きい損失の出る所は見出されず、これらを通じて79～81%位の回収率を得ているから各過程に平均すると97%づつ位は回収出来ていることになる。

2) 妨害色の除去について

38年度は溜取した溜液を直ちに水の場合の濃縮法²⁾に従って発色させていた。本法に比すと蒸発乾固の操作が抜けていたわけである。それだと、大方の生物体の場合橙～赤色の妨害色を現す物質が共存して比色を困難にする。その量は少なく、又吸光特性もPCPの青色とは大きく異なるから、PCPが多い時は問題ないが、PCPの青色が薄い時はそれらが混じて紫色～薄すみ色となりPCPの存否の判別を困難ならしめる。それでも分光光度計で吸光特性の違いを利用して異ったいくつかの波長で吸光度を測定することにより、かなりの低濃度まで判別出来る方法⁶⁾を採っていたが、充分とは云い得ず、この妨害物の除去方法に苦心した。始め抽出方法の変更(クロロホルム、キシロール、エーテル、ベンゼン等溶媒を変えて幾度か抽出する、或いは弱酸性、弱アルカリ性で抽出する等)を試みたがどれも思わしくなく、次に、生成色素の安定性の差から、発色クロロホルム層を、酸、アルカリで処理して、PCPの青色のみを残す法を考え或程度妨害色を除き得たがPCPの青色まで不安定になる欠点があった。

そこでやゝ時間がかかるきらいはあるがPCPをPCP-Naとした形で蒸発乾固する本法をとることとした。生物体を蒸溜すると、異臭ある油状物がPCPと同じく溜出して来て、これが妨害発色を呈するものゝ本体らしく、加熱乾固の過程でPCP-Naは安定であるが、これは蒸散してしう。この処理で、妨害色の発色は認められなくなり、クロロホルム層の呈色は鮮やかなPCPの青色のみとなる。但し、この処理を行なうと発色操作に時間が長くかかる傾向がある。残渣を水に溶解して、PCP-Naが完全な水溶状となるのに、共存物などの影響で幾分時間がかかるのかも知れない。

3) 検出の限界

最終的に生成色素を10ccクロロホルムに抽出する条件で、本法では10 γ のPCPが、波長600m μ で約0.052、5 γ で0.026位の吸光度を示す。これは水溶状・直接法での約80%前後に当る。

従って生物体Sampleを10 μ 使用すれば検出の限界は5～10 γ /10 μ 生体程度となる。更に低濃度での検出が必要な時は、生物体Sampleを2～3倍量取り(10%NaOH及び1:1HClも増量)、クロロホルム量を5ccとすることで検出限界を数倍長くすることも充分可能である。しかし乍ら、実際に応用する場合、魚類、介類等の体内にはかなり大量にPCPが蓄積、検出されるので、特殊な研究目的以外には、本法に述べる程度の条件或いは精度で十分な結果が得られよう。

4) 備 考

a) Sampleは10 μ 1塊でも良いが、細くした方が早くNaOHにとけて手間が省ける。

- b) 大きな魚体の場合 P C P の多く見出されるのは、鰓、内臓、血液などである。
 貝体の場合は各器官に分けるのが困難であるので任意に切りとって供試している。
- c) 死後長時間経過した Sample でも検出し得ている。
 (3~5日後位腐らん悪臭を放つ Sample で)
- d) 死後長時間経過した Sample では P C P の体内分布が均一化して来るようである。
- e) 実際に漁場で起った斃死事故の調査で得られた Sample を分析した所では、水温、生物種、影響をうけた濃度などで非常に複雑な体内濃度を示す。特に魚種による差は大きい。
- f) コイ、フナ、ワタカ、ナマス、ギギ、ウナギ、タナコ類等俗に温水性と呼ばれている魚類は致死時体内濃度が高く数 100 γ / 10 μ 生体に達する。一方アユ、ハス、オイカワなどは少ない量で致死するらしく、検出される量も少ない。
- g) 本法は精度が良いので、斃死に到らない弱い影響をうけた生きた生物体中からも充分定量的に P C P を検出出来、体内の濃度から影響の強弱を知ることが出来る。

IV 摘 要

筆者は、農業 P C P の水産被害問題における斃死原因の確認と、毒性作用機構の追求の手段として生物体内に侵入した P C P の定量的検出方法を研究して来たが、現段階で到達している分析方法を紹介して参考に供することとした。主な点を要約すると以下のとおりである。

- 1) 本法は、定量性、確実性、精度、簡便性(実用性)を旨として工夫されている。
- 2) 本法の概略は生物体試料の強アルカリ溶融 — 酸性水蒸気蒸溜アルカリ捕集 — 酸性化してクロロホルム抽出 — アルカリ抽出 — 乾固 — 水溶 — クロロホルムによる4アミノアンチピリン比色定量である。
- 3) この方法で全体を通じて回収率は約79~81%位である。
- 4) 検出の限界は水の場合と同様5 γ ~10 γ /10 μ 生体位である。(本報記載の条件で)必要なら更に数倍引上げることも充分可能である。
- 5) 本法で10 γ のP C P-OHは600m μ の波長で0.052~0.054位の吸光度を示す。(ボンロム分光光度計、キューベット $\frac{1}{2}$ 吋、600m μ)
- 6) この値は水中P C Pをキシロール使用による4アミノアンチピリン法(P C P微量分析技術会議公定法⁷⁾)で、分析するよりもかなり精度が良い。これはクロロホルム使用による4アミノアンチピリン比色法²⁾を採用しているからである。
- 7) 津田らの方法^{3) 5)}でも生物体中のP C Pを検出、確認することは出来るが、定量性、全操作に長時間かかること、などで用途が限られて来るように思われる。
- 8) 本法で、比色を妨害する物質は出てこない。(但しP C P以外の汚濁源の少ない水産生物)
- 9) 本法は、斃死魚の死因がP C Pであるかどうかの判定、或いは生物体内での濃度に関する研究などの目的に実用して充分良好な成績を得て来ている(昭和38年度、39年度)から、実用性の点では良いと云える。

- 10) 本法に残る問題点は、回収率の向上、PH調整の簡便化等であろう。
- 11) なお、本法は昭和38年のPCP被害発生時期の前後に行なった試験について全国湖沼河川養殖研究会で発表⁶⁾(全年9月於三重県)した資料中に記載した方法をその後の実用の中で改良したもので、基本的な点はほぼ同様である。

V 文 献

- 1) 箕田冠一：水産生物の斃死現象に関する研究—II。滋賀県水産試験場研究報告第17号。
147—152 1964
- 2) 箕田冠一：水産生物の斃死現象に関する研究—IV 滋賀県水産試験場研究報告第19号(本号)
- 3) 津田勉・狩谷貞二：魚体中のPCP確認法。日本水産学会誌 vol 29 . 828 . 1963 .
- 4) 塚本久雄・奥井誠一：裁判化学。第3判・南山堂・東京・1—247 . 1959
- 5) PCP微量分析技術会議：魚体中のPCP検出法。プリント。1963
- 6) 滋賀県水産試験場：生物体中のPCPの定量的分析と致死体内濃度について：第36回 全国湖沼河川養殖研究会発表資料。1963 .
- 7) PCP微量分析技術会議：水中PCPの微量定量法。プリント 1963 .
- 8) 沼田 一：ペンタクロロフェノールの比色定量について。衛生化学4 . 94 . 1956 .