

2. 空气中臭化メチルのサンプリング方法

2-1. パッシブサンプラー（3M有機ガスモニター）

(1) 構造

パッシブサンプラーは、サンプラーの入口に多孔板や多孔質などのフィルムでふたをした容器で、サンプラー内部での物質の移動が分子拡散のみで制御されるような静止空間を持った構造になっている。捕集材として、3M有機ガスサンプラーでは活性炭ディスクが使用されており、さらに捕集容量を大きくするために活性炭ディスクが2層になっている。

(2) 原理

気体分子レベルでは、常に分子はあらゆる方向にそれぞれ違った速度で運動・衝突して、位置も速度も変化している。このように個々の分子についてみると変化していても、ある孤立した空間（以下、系という）について平均すると変化していない状態が平衡状態であり、見掛け上、温度、圧力、濃度などが一定であり、時間の経過してもその性質が変わらない状態である。2種類またはそれ以上の異なる気体の各濃度が場所によって異なる時、その系内の濃度

が均一になるまで期待分子は交じり合おうとする。このような分子の移動を分子拡散といい、分子の熱運動や衝突の結果である。

平衡状態の系に特定の分子を選択的に吸着する捕集材を投入して、その分子を系から取り除くと、捕集材付近ではその気体の濃度が小さくなり、非平衡状態となる。非平衡状態の系は、分子の拡散によって平衡状態に移行しようとする。このように濃度が均一になるように分子が拡散する現象がパッシブサンプラーの原理である。

(3) 装置等

有機ガスモニター（No. 3500、高容量用、スリーエムヘルスケア）

アルミ缶の中に下記のものが密封されている。

- ① モニター本体1個
- ② 上キャップ2個
- ③ スパウトチューブ（定量分析時に使用）2本
- ④ 下キャップ1個

(4) 測定方法

- ① 測定場所に行ってから、アルミ缶のふたを開ける。
- ② モニターの裏面のラベルに鉛筆で測定開始時刻等を記入する。
- ③ 個人曝露測定の場合は、作業

者の襟元などの顔に近いところにサンプラーを固定する。定点測定の場合は、スタンドなどでモニターを固定させる。

④ アルミ缶の白色のプラスチックのふたなどに、測定記録を記入しておく

a. 測定番号、b. 測定年月日、c. 気温・湿度、d. 測定物質

⑤ 上キャップの2カ所の栓をしておく。

⑥ 測定が終了したら、速やかにプラスチックリングとメンブランシートを取り外す。

⑦ 上キャップを強くはめ込む。

⑧ モニターの1層目と2層目を分離する。

⑨ 1層目のそこに下カップを強く押し込んで取り付ける。

⑩ 2層目に上キャップを強くはめ込む。

⑪ 測定時刻をモニターの裏面などに鉛筆で記入しておく。

⑫ 上キャップの2カ所の栓は外れないようにしっかりとハマっていることを確認する。

⑬ モニターはアルミ缶に入れて冷暗所で保管する。

(5) 使用上の注意事項

モニターは、測定終了後2週間以内に定量分析する。

2-2. 活性炭チューブ

(1) 概要

活性炭を充てんしたガラス管に空気吸引ポンプを接続して、活性炭管を通して一定流量で試料空気を吸引し、活性炭に吸着した測定対象物質を定量して、測定期間中の平均濃度を測定する方法である。活性炭は、その種類と活性化の条件によって吸着特性が異なっており、一般に無極性有機溶剤などに対する吸着力が強い。活性炭の活性化は、乾燥した空気または窒素の気流中で、約200℃での加熱・脱水によることが多い。活性炭にガス状物質を捕集する場合には、空気中の水分の除去や捕集率を高めるための冷却を行う必要はない。この捕集方法は空気の吸引を強制的に行うので、アクティブサンプリングと呼ばれている。

(2) 装置等

① 活性炭チューブ（ジャンボ型、柴田科学）：内径6mmのガラス管に20～40メッシュの活性炭を第1層に400mg、第2層に200mg充てんして、ガラス管の両端を溶封したもの。

② 小型空気吸引ポンプ ミニポンプMP-Σ300（柴田科学）

(3) 測定方法

- ③ 測定場所に行ってから、活性炭チューブのラベルに測定番号等を鉛筆で記入する。
- ④ 活性炭チューブのガラス管の両端を開封する。
- ⑤ 活性炭チューブを小型空気吸引ポンプの空気採取口に取り付ける。
- ⑥ 試料空気を毎分 1 L でサンプリングするとともに、測定開始時刻を記録する。
- ⑦ サンプリング中は時々サンプリング流量の確認を行う。
- ⑧ サンプリング終了時にもサンプリング流量の確認を行い、活性炭チューブの両端にビニルキャップをかぶせて、冷暗所で保管する。合わせて測定終了時刻を記録する。

3. ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS) 用試料の前処理方法

3-1. 3M有機ガスモニター

- (1) モニター 1 層目および 2 層目の上キャップの中央の口から脱着溶媒としての二硫化炭素を 4ml 注入し、注入口は直ちに栓を閉じる。

- (2) 時々混合しながら、室温で 30 分間放置する。
- (3) モニター 1 層目および 2 層目の上キャップの中央の口から脱着液を 1 ml 分取して、GCMS 用サンプルびんに注入する。
- (4) 内部標準液 5 μ l を添加して、密栓する。
- (5) GC-MS 分析を行う。

3-2. 活性炭チューブ

- (6) 活性炭チューブの第 1 層および第 2 層から活性炭をそれぞれ取り出して、それぞれ 8 ml ねじ口試験管に入れる。
- (7) 第 1 層 (400mg) を入れたねじ口試験管には脱着溶媒としての二硫化炭素を 4ml、第 2 層 (200mg) を入れたねじ口試験管には 2 ml 注入し、直ちに栓を閉じる。
- (8) 時々混合しながら、室温で 30 分間放置する。
- (9) ねじ口試験管を遠心分離する (3000rpm、10 分間)。
- (10) 第 1 層および第 2 層の脱着液を 1 ml 分取して、GCMS 用サンプルびんに注入する。
- (11) 内部標準液 5 μ l を添加して、密栓する。
- (12) GCMS 分析を行う。

3-3. 濃度の計算方法

1) 3M有機ガスモニター

$$C = \{M_P / (r \times K_P \times t) + \{M_S / (r \times K_S \times t)\} \} \times 10^3$$

C : 空气中濃度 (mg/m³)

M_P : 1層目の捕集量 (μg)

M_S : 2層目の捕集量 (μg)

K_P : 1層目に対するサンプリング速度 (cm³/min) (臭化メチル : 40.9)

K_S : 2層目に対するサンプリング速度 (cm³/min) (臭化メチル : 40.9)

t : サンプリング時間 (min)

r : 脱着率

重量濃度から容量濃度への換算

$$C' = C \times (1 / MW) \times \{ (273 + T) / 273 \} \times 22.4$$

C' : 濃度 (ppm)

MW : 分子量 (臭化メチル : 94.95)

T : 気温 (°C)

2) 活性炭チューブ (ジャンボ型)

$$C = \{ (M_P / r \times S_P) + (M_S / r \times S_S) \} / V$$

C : 空气中濃度 (mg/m³)

M_P : 第1層の捕集量 (μg)

M_S : 第2層目の捕集量 (μg)

S_P : 第1層の脱着溶媒量 (ml) (4ml)

S_S : 第2層の脱着溶媒量 (ml) (2ml)

r : 脱着率

V : サンプリング空気量 (m³)

重量濃度から容量濃度への換算

$$C' = C \times (1 / MW) \times \{ (273 + T) / 273 \} \times 22.4$$

C' : 濃度 (ppm)

MW : 分子量 (臭化メチル : 94.95)

T : 気温 (°C)

4. ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS) 条件

4-1. 装置

ガスクロマトグラフ-質量分析装置 5890SERIES - 5972

4-2. 分析条件

カラム : NB-1, 長さ 60m×内径 0.25mm, 膜厚 1.5 μm

オーブン温度条件 : 初期温度 45°C, 5 分間保持

昇温条件 10°C/分

最終温度 300°C, 12 分間

注入口温度 : 250°C

検出器温度 : 280°C

キャリアーガス : He (注入口圧力 : 14.5psi)

注入量 : 1 μl

溶媒待ち時間 : 5.50 分

MS ランテーブル : Detector Off : 8.20 分

Detector On : 12.00 分

Detector Off : 16.00 分

検出法 : SIM法

モニタリングイオン

臭化メチル 定量用イオン : 94

確認用イオン : 96

トルエン-d8 定量用イオン : 98

5. 臭化メチル検量線の作成

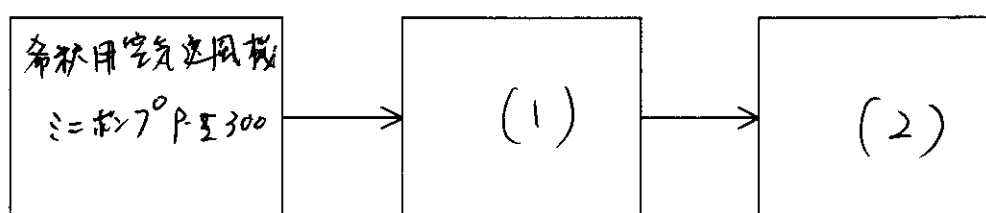
5-1. 概要

パッシブサンプラーである 3M 有機ガスモニターは、一定濃度の臭化メチル標準ガスに曝露させる時間を

増減させることによって、アクティブサンプラーである活性炭チューブは一定濃度の臭化メチル標準ガスの吸引時間を増減させることによって、臭化メチルの検量線を作成した。

5-2. 装置等

- (1) 標準ガス発生機 パーミエーターPD-1B型 (ガステック)
- (2) 曝露チャンバー (8 Lガラス製デシケータ)
- (3) 小型空気吸引ポンプ ミニポンプMP-Σ300 (柴田科学)
- (4) 小型空気吸引ポンプ ミニポンプMP-Σ30 (柴田科学)
- (5) 有機ガスサンプラー No. 3520 (高容量用、スリーエムヘルスケア)



- (6) 活性炭チューブ・ジャンボ型 (柴田科学)

標準ガス発生機以降の配管にはテフロンチューブを使用した。

室内空気中から臭化メチルは検出されなかったため、室内空気を希釈用空気として使用した。

5-3. 標準ガス発生条件

- (1) パーミエーションチューブ (P-136-H、有効長さ：10cm)
- (2) パーミエータ恒温槽温度：35℃
- (3) 希釈用空気量：2.0L/分

上記の条件で発生する臭化メチル標準ガス濃度：2.0ppm ($7.93 \mu\text{g}/\text{m}^3$)

5-4. 3M 有機ガスモニター法による検量線

(1) 作成方法

曝露チャンバー内に有機ガスモニターを6個設置して、曝露開始30分後、60分後、120分後に2個ずつ取り出した。ブランク試験として室内で120分間曝露させた。

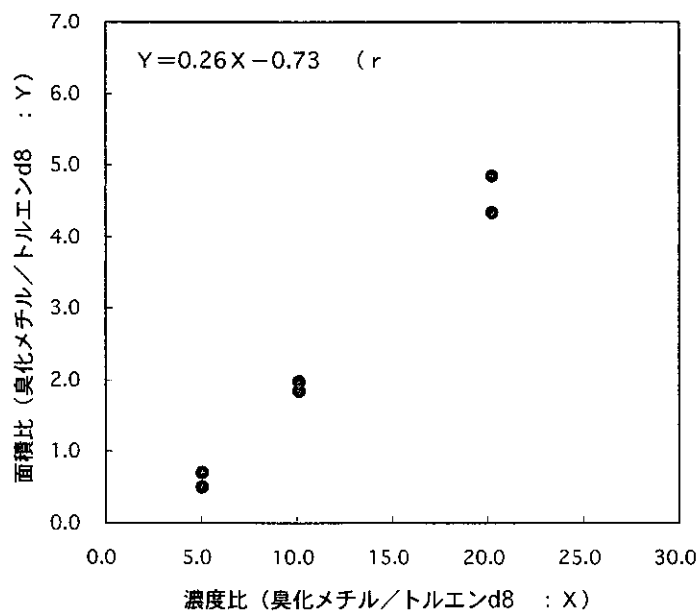
臭化メチルを二硫化炭素で溶出した後、GCMS法で分析した。

(2) 結果

作成した検量線を下に示した。なお、希釈用空気として使用した室内に120分間放置した場合の臭化メチル濃度は定量下限値未満であ

った。

3 M有機ガスモニター法による臭化メチルの検量線



5-5. 活性炭チューブ法による検量線

(1) 作成方法

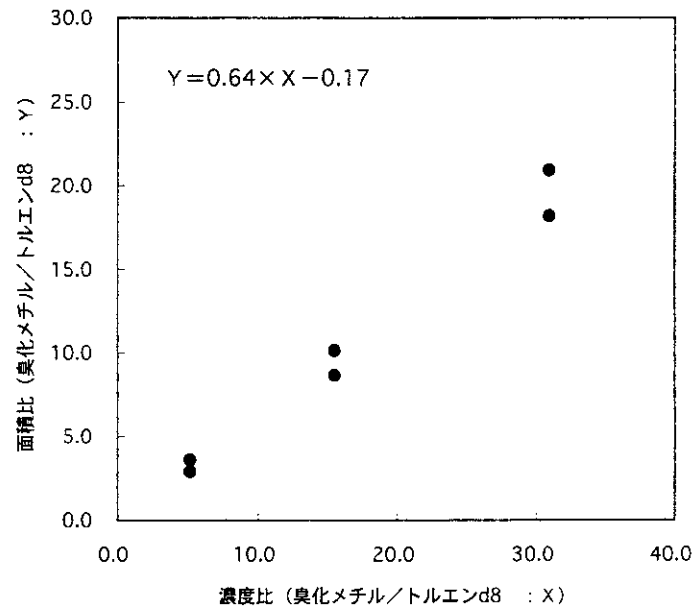
曝露チャンバーから臭化メチル標準ガスを毎分 500mL で活性炭管にサンプリングした。サンプリング時間は、5分、15分、30分であった。

臭化メチルを二硫化炭素で溶出した後、GCMS法で分析した。

(2) 結果

作成した検量線を以下に示した。なお、希釈用空気として使用した室内空気の臭化メチル濃度は定量下限値未満であった。

活性炭チューブ法による臭化メチルの検量線



3. 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と

内分泌かく乱作用検出のための

新たなバイオマーカーの開発

— GC/MS によるヒト尿中ジアルキルリン酸

濃度測定条件の検討 —

研究協力者

上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
高木健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
斎藤 勲 愛知県衛生研究所

分担研究者

柴田英治 愛知医科大学医学部衛生学講座

3. 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用

検出のための新たなバイオマーカーの開発

— GC/MS によるヒト尿中ジアルキルリン酸濃度測定条件の検討 —

研究協力者 上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
高木健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
斎藤 勲 愛知県衛生研究所

分担研究者 柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座

研究要旨

我々は昨年、有機リン殺虫剤の曝露によって生成される尿中ジアルキルリン酸を短時間で誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析計により検出する方法が実用化可能であることを明らかにしたが、液体抽出法は操作が煩雑で GC/MS 分析においても多くの時間が必要となっている。そこで本研究では液体抽出法に固相抽出法を組み合わせ、ヒト尿中ジアルキルリン酸、すなわち DMP、DEP、DMTP および DETP の同時測定系を確立することを目的とし、種々の検討を行った。その結果、エバポレーション時における液性(pH)条件は DMP の回収に影響することが明らかとなり、さらに検討を加えた結果、液性を炭酸カリウムにて中性付近に設定することにより、DMP の回収率を向上させることができた。一方、DEP、DMTP および DETP の回収に液性は影響を与えず、比較検討を行った 4 種の pH のうち、pH 8 が最適な液性であることが示唆された。次に最適抗酸化剤の選択とその添加濃度について検討を行った。抗酸化剤 Sodium disulfite (SoD) 10 mg/ml で、さらにサンプル前処理過程において固相抽出操作を加えることにより分析に費やす時間の飛躍的な短縮に成功した。4 種のジアルキルリン酸を測定した時の検出限界は既報に比べ、同等であるかまたは 1/3 程度と改善した。

A. 研究目的

現在、有機リン系化合物は害虫駆除剤、つまり殺虫剤やゴキブリ・ダニ駆除剤、防カビ剤として世界中で用いられている。これらの化合物群は神経伝達物質であるアセチルコリンの分解に関与するコリンエステラーゼの阻害により神経中毒を誘発し、殺虫効果を示すことは既に知られている。この作用により、ヒトにおいても大量に曝露すれば急性、慢性毒性を引き起こし、場合によっては死に至ることもある。

有機リン系農薬はジクロロボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンなどをはじめ種類も多く、これらを日常的に取り扱う作業者の曝露の実態は明らかになっていない。有機リン系農薬の曝露評価としては、作業中の拡散型サンプルバッジ装着を用いて気中有機リン系農薬を捕集し測定する方法が存在する。しかしこの方法は、実際に作業者体内に吸引された有機リン系農薬ではなく、曝露指標として広く用いられているが、優れた評価法とは言われていない。近年、作業中の拡散型サンプルバッジ装着による気中有機リン系農薬の測定による方法の他に、血液、尿などによる個人レベルでの生物学

的モニタリングが試みられている。中でも尿中有機リン系農薬代謝産物の内のアルキルリン酸部分は多くの有機リン系農薬の共通構造であり、尿中アルキルリン酸を指標としたモニタリングは作業員への負荷がなく、曝露評価には優れた方法と考えられており、実際の衛生害虫防除従事者での曝露と有機リン酸系農薬の尿中代謝産物の関連が検討されている。

尿中有機リン酸系代謝産物には Fig. 1 に示すようにdimethylphosphate (DMP)、diethylphosphate (DEP)、O-dimethylthiophosphate (DMTP)、O,O-diethylthiophosphate (DETP)が知られており、各種測定機器を用いた測定法が報告されている。現在、尿中有機リン酸系代謝産物の測定には尿サンプルの前処理としての抽出操作および定性・定量分析という2つのプロセスが存在する。前者には固相抽出法や液体抽出法などがあり、それぞれが長所、短所をもちあわせている。現在、生体サンプル、特に尿サンプル中の尿中有機リン酸系代謝産物はアセトニトリルを用いて抽出・誘導体化後、測定に供されているのが一般的である。この方法は、再現性はあるものの、多くの時間と煩雑な操作を必要とする。また測定には

約5 mlの尿量を必要とすることから、げっ歯類を使用した研究での連続採尿による尿中有機リン酸系代謝産物濃度測定には不適と思われる。また、後者にはガスクロマトグラフィー

(GC)/flame photometric detection、GC/マススペクトロメトリー(GC/MS)法、GC-MS-MS法、高速液体クロマトグラフィー—マススペクトロメトリー(LC/MS)法などがあるが、なかでも尿中有機リン酸系代謝産物濃度測定に

は、簡便性が高くかつ高感度測定が可能であるという点から、GC-MS法が最適かと思われる。

今回、我々はヒト、ハムスター、マウスおよびラット尿を対象に迅速、簡便かつ高感度な尿中有機リン酸系代謝産物濃度測定系の確立を試みた。すなわち、尿中 dialkyl phosphate の最適抽出法、および GC-MS 測定条件について検討し、良好な結果を得たのでここに報告する。

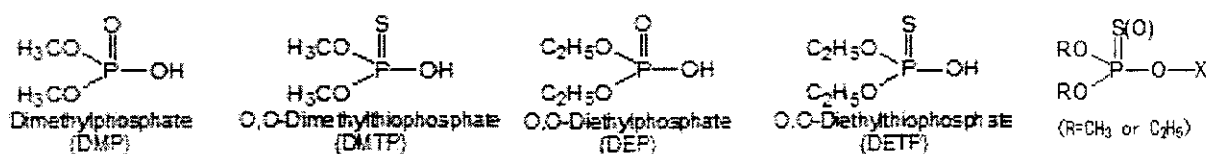


Fig. 1. Structures of dialkylphosphate metabolites of interest and basic structure of organic phosphate pesticide.

B. 研究方法

試薬

Dimethyl phosphate tetramethylammonium salt (DMP)	【林純薬工業】
Diethyl phosphate (DEP)	【林純薬工業】
Dimethylthiophosphate ammonium salt (DMTP)	【林純薬工業】
Diethylthiophosphate ammonium salt (DETP)	【林純薬工業】
Dibutylphosphate (DBP)	【関東化学】
α -Bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluene (PFBBBr)	【林純薬工業】

塩化ナトリウム	【和光純薬工業】
無水硫酸ナトリウム	【和光純薬工業】
炭酸カリウム	【関東化学】
ジエチルエーテル	【関東化学】
acetonitrile	【関東化学】
n- hexane	【関東化学】
toluene	【関東化学】
acetone	【関東化学】
Florisil PR	【和光純薬工業】
BONDESIL-PSA	【GL science】
Ascorbic acid	【関東化学】
Sodium disulfite (SoD)	【関東化学】
Pyrogallol	【米山薬品工業】

GC-MS システム

PerkinElmer 社製

TurboMass システム

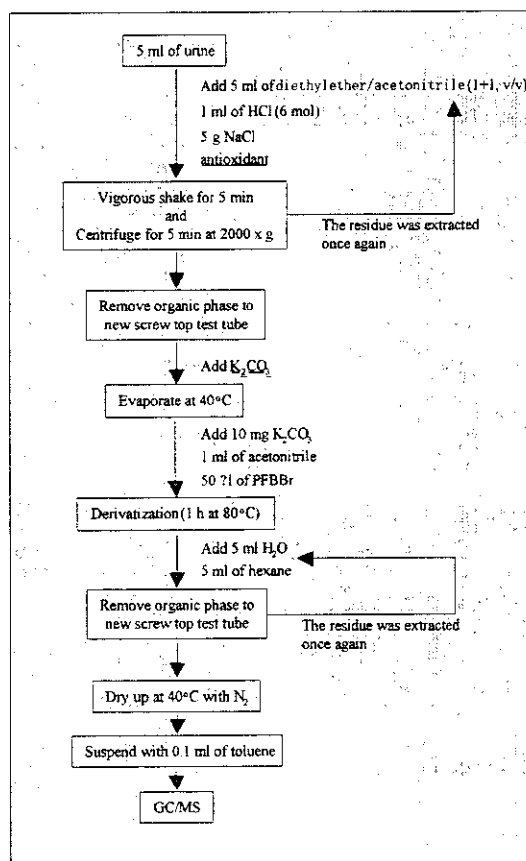
分離用カラム

SPELCO 社製、 Fused Silica Capillary Column SPB™-1

60 m、 0.25 mm ID、 1.0 μm film thickness

多くの有機リン系農薬は体内で代謝分解され、尿中にdialkyl phosphateとして排泄される。通常、リン酸塩の形では極性が高く気化しないためGC-MSでは測定できず、誘導体化法を用いなければ測定できない。我々は昨年、既報のPFBBBrを用いた誘導体化法に検討を加え、それまで15時間かけて行なっていた誘導体化をわずか1時間に短縮することに成功したことを報告した。今回我々は、この誘導体化条件を用い、高回収率で再現性のある抽出条件を実際の尿サンプルへ応用すべく、Fig. 2に示すサンプル調整法を基本方法として用い、各種検討した。

Fig. 2. Analytical method for cleanup and determination of dialkyl phosphate in urine.



2. 1. エバポレーション時pHの検討

有機溶媒相をエバポレートする際の液性(pH)をコントロールすることは極性の高い物質、つまりDMPの回収率に大きく影響することが予想される。既報ではpH 3程度の液性で尿から抽出した有機溶媒相のエバポレートを行っているが、

我々はさらにdialkyl phosphateの回収率を向上させるべく、炭酸カリウムを用いて液性を各種pH (pH 2、4、6、8) に調整し検討した。検体には健常人尿サンプルを用い、ジエチルエーテル/アセトニトリル抽出後の有機溶媒相に標準物質(DMP、DEP、DMTP、DETP、DBP in MeOH)を最終濃度50 ppmとなるように添加しエバポレーションを行った。その後Fig. 1に従い、誘導体化・抽出操作を加えGC/MSにて測定し比較検討を行なった。

2.2. 抗酸化剤の選択

Fig. 1で示すように、DMTP、DETPはDMP、DEPの酸素分子の一部が硫黄分子に置換したものである。尿中からのdialkyl phosphate抽出操作時におけるDMTP、DETPの酸化は必須なものであり、ゆえにDMP、DEPが抽出操作によって産生されることとなる。つまり、dialkyl phosphate抽出操作時におけるDMTP、DETPの酸化を最大限に防止することは、正確なDMP、DEP濃度を測定することにとって非常に重要であることがわかる。尿中dialkyl phosphate測定法で抗酸化剤を添加している報告はこれまでなされていないが、我々の予備検討および既報より、抗酸化剤を

添加していない場合、抽出操作によりDMTP、DETPから少なくともDMP、DEPが10 %程度産生されているという結果を得ている。そこで今回我々は抗酸化剤としてアスコルビン酸、SoD、ピロガロールを用い、各抗酸化剤濃度100、10、1 mg/ml(尿)の抗酸化剤効果について検討した。すなわち、試験管中に5 ml 尿、5 mlジエチルエーテル/アセトニトリル(1/1, v/v)、1 ml HCl (6 mol)、5 g NaClおよび抗酸化剤を添加し、以後Fig. 2に従って抽出操作を行ない、得られた結果より尿中dialkyl phosphate測定に最適な抗酸化剤の種類およびその最適濃度を比較検討した。また健常人の尿5 mlに既知濃度のDMTP、DETP (最終濃度各50 ppm)および内部標準であるDBP (最終濃度50 ppm)を添加したものをサンプルとして使用した。

2. 3. 誘導体化処理後の不純物除去

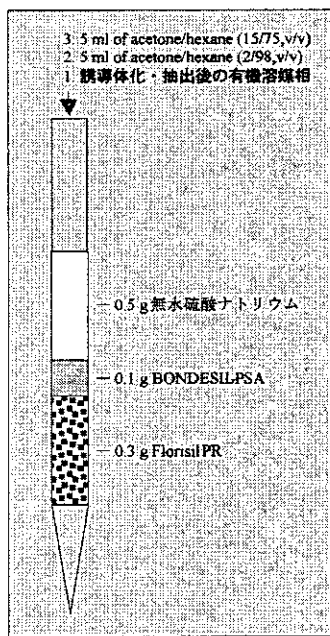


Fig. 3.

前処理されたサンプルがGC/MSによって定性・定量される際、その分析に影響をあたえるのは夾雑ピークの存在である。1サンプルあたりのGC/MS分析に費やす時間はサンプルの精製度に依存しており、迅速な分析にはサンプルに優れた精製を加える必要がある。そこで我々はサンプルをGC/MSで測定する前段階に固相抽出法を加えることによって、サンプルの精製度を向上させ、迅速で夾雑ピークの少ないGC/MS分析を目指した。す

なわち、Florisil PR 0.3 mg、BONDESIL-PSA 0.1 mg、無水硫酸ナトリウム0.5 gを充填したカラム (Fig. 3) に誘導体化・抽出を行なった有機溶媒相を通し、その後5 ml acetone/hexane (2/98, v/v) で洗浄し5 ml acetone/hexane (15/75, v/v) で誘導体化されたdialkyl phosphateを溶出した。得られた有機溶媒相は N_2 を用いてdry upされ、さらに0.1 ml tolueneで溶解された後、GC/MS分析に供された。

C. 研究結果

3. 1. 抽出後有機溶媒相の至適 pH

既報で用いられている炭酸カリウム5 mgを有機溶媒相に添加する方法において、その液性は約pH 2になることが明らかとなった。また、炭酸カリウム14、18、20 gを抽出後有機溶媒相に添加し、pH 4、6、8にそれぞれ設定した。どの液性においても、DEP、DMTP、DETPおよびDBPの回収量は変化が無かったものの、DMPの回収量は炭酸カリウムの濃度依存的に向上した (Fig. 4)。これらの結果より、以下の実験における炭酸カリウム濃度には20 mgを用いることにした。

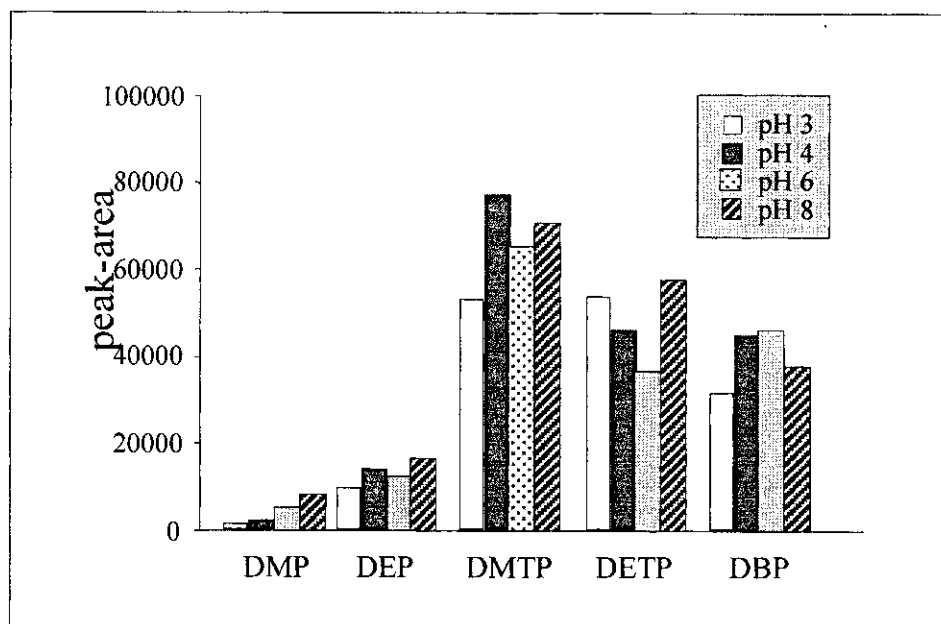


Fig. 4. Effect of the solution pH during the evaporation on recovery of DMP, DEP, DMTP, DETP and DBP in urine

3.2. 抗酸化剤の選択

Fig. 5で示すように、DMTP、DETPのみを健常人尿に添加し、抗酸化剤を添加していない測定系ではDMP、DEPが多く検出されていることからDMTP、DETPからDMP、DEPに変換されていることがわかる。3種類の抗酸化剤(アスコルビン酸、SoD、ピロガロール)をそれぞれ10 mg/mlの割合で尿中に添加し、その後Fig. 2に従って前処理操作を行ないDMP、DEP DMTP、DETPをGC/MSを用いて測定、比較検討した。Table 1に示すように、アスコルビン酸およびSoDを添加した測定系ではDMTPおよびDETPからのDMP、DEPの産生を抑制しているが、ピロガロールにはその効果が見られなかった。また、アスコルビン酸を用いた測定系ではGC/MS分析におけるクロマトグラムに夾雑ピークが多く確認された (data not shown)。ゆえに我々はSoDを尿中dialkyl phosphate測定法における最適抗酸化剤と判断し、さらにその濃度について検討を加えた。その結果、10 mg/ml (尿)のSoD濃度で抗酸化剤効果は十分発揮されることが明らかとなった(Table 2)。これらの結果より、以下の実験における抗酸化剤濃度は10 mg/ml (尿)を用いることにした。

Fig. 5. DMTP and DETP were converted to DMP and DEP at nonexistent of antioxidant experimental condition.

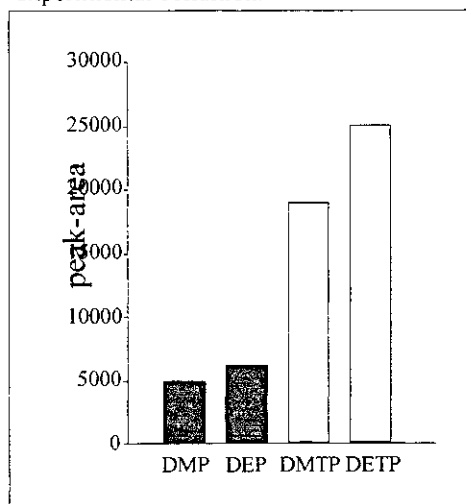


Table 1. Effect of antioxidant, ascorbic acid, SoD and Pyrogallol, on DMTP and DETP conversion to DMP and DEP.

Antioxidant	DMP	DEP	DMTP	DETP
ascorbic acid	167	29	57422	49409
SoD	68	131	44048	42697
Pyrogallol	3071	4725	24744	30165

Table 2. Effect of antioxidant, SoD, on DMTP and DETP conversion to DMP and DEP concentration dependency

SoD (mg/ml urine)	DMP	DEP	DMTP	DETP
1	788	2151	32662	33034
10	68	131	44048	42697
100	34	1	36663	35076

3. 3. 固相抽出法を用いた不純物除去法

尿中dialkyl phosphate測定法はいくつか報告されているが、いずれの測定法においても誘導体化dialkyl phosphateの精製が不十分であり、このことは迅速なGC/MS測定を妨げ、頻繁な測定機器メンテナンスがさらに必要となることが予測される。そこで今回我々は、誘導体化・抽出操作直後の有機溶媒相をFlorisil PR、BONDESIL-PSA、無水硫酸ナトリウムを用いた固相抽出法を使用して、含有不純物お

よび脱水をサンプルに施し、GC/MS分析に供した。その結果、Table 3に示すGC/MS測定条件において、それまで約60分の分析時間を必要としていたが、約30分でDMP、DEP、DMTP、DETPおよびDBPすべての同時測定を可能とした。Fig. 7は健康人尿サンプルを各種検討にて設定した至適条件で処理を行い、その後のGC/MS分析で得られたクロマトグラムである。

Table 3 Analytical condition

GC:		MS:	
Carrier gas	:He (purity99.9999), 55 kPa	Ionization	:IE
Col. Temp	:70 °C (1 min)-10 °C/min-280 °C (5 min)	E Energy	:70
Inj. Temp.	:250 °C	Emission	:200
Inj. Method.	:Splitless (from -0.75 to 1 min)	Ion Energy	:1.0
Inj. Volume.	:1 ?l	Inner Source Temp.	:250 °C
		Inter Face Temp.	:300 °C
		Scan Range	:40-500
		Scan Interval	:0.5 sec
		SIM Interval	:0.2 sec

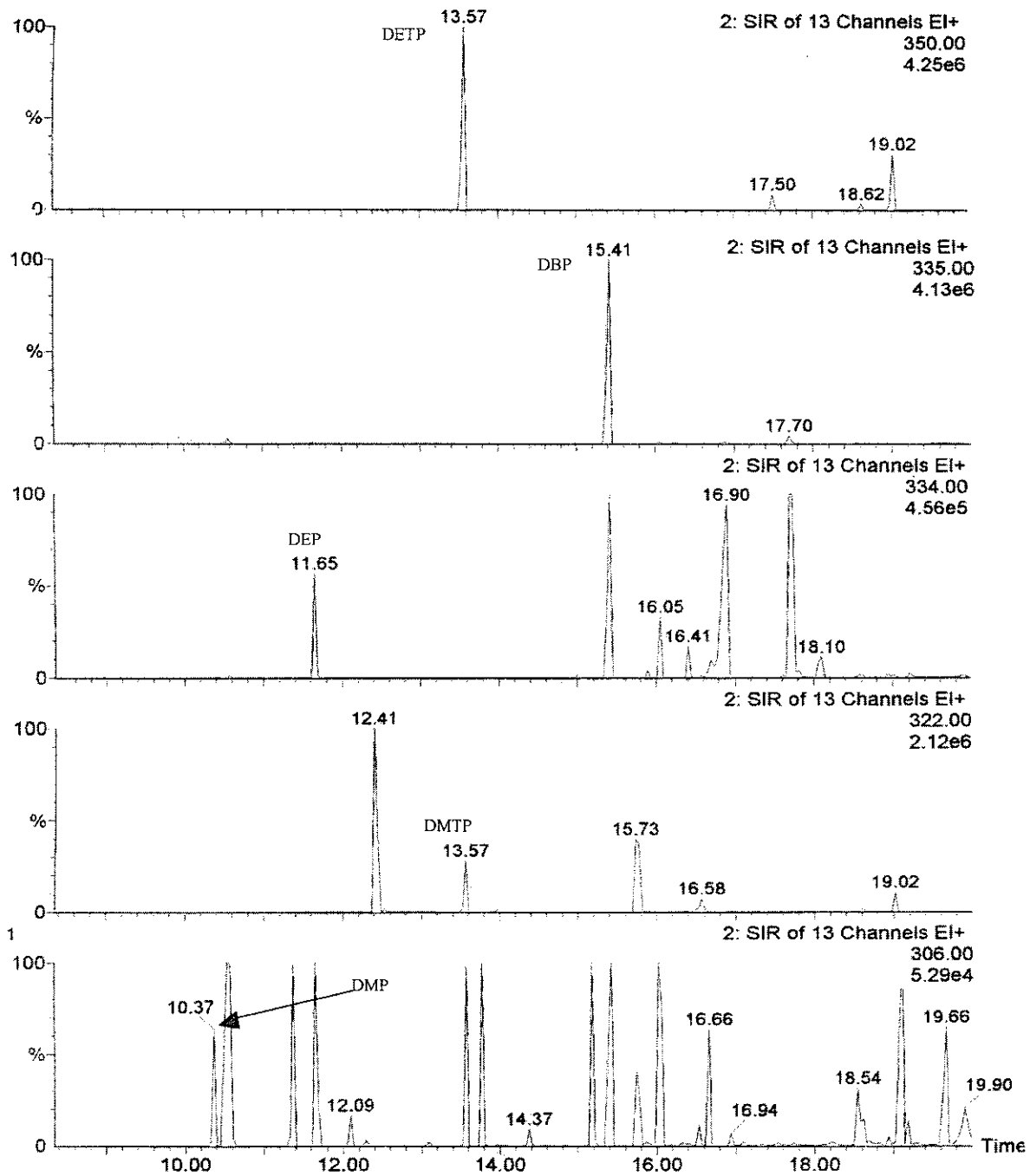


Fig. 7. Typical GC/MS chromatograms of 1 ppm DMP, DEP, DMTTP, DETP and DBP in urine. The detected masses were those of the five molecular ions of the metabolites, m/z 306, 334, 322 and 350, and m/z 335 for IS (DBP).

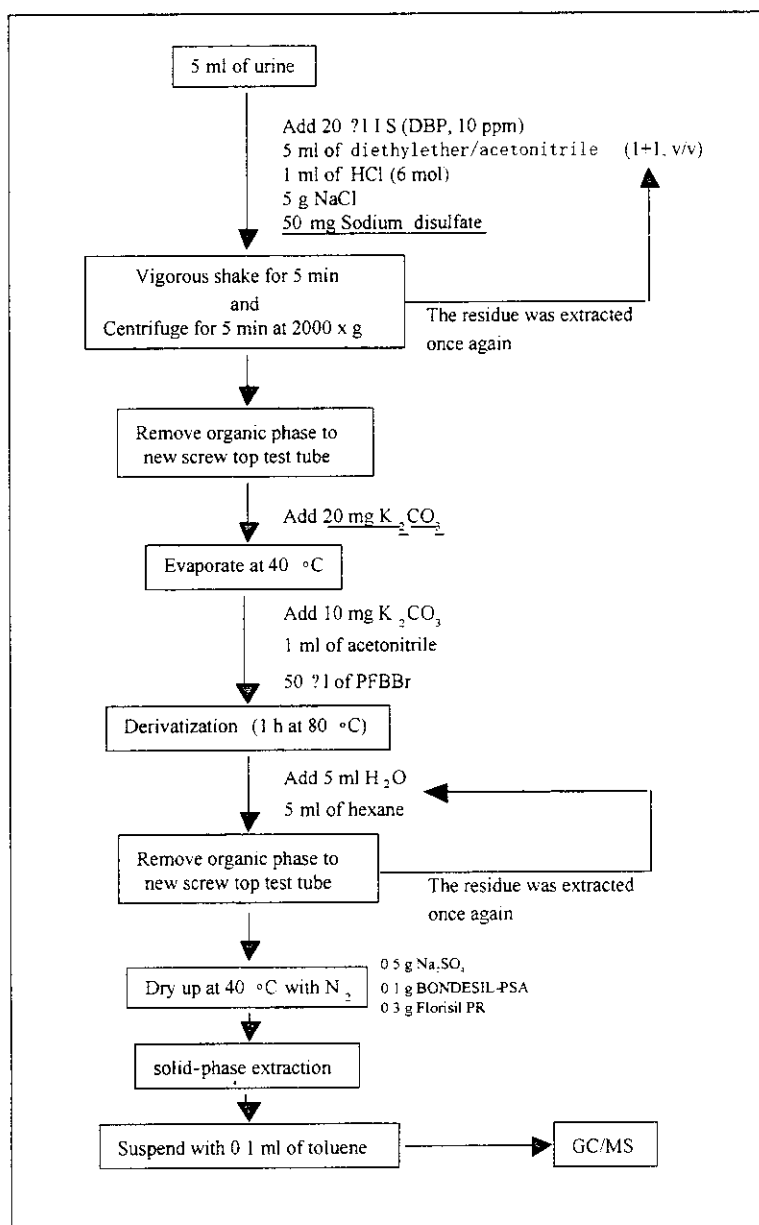


Fig. 5. Method for the determination of dialkyl phosphate in urine.