

GC-NPD の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 6890 Series Gas Chromatograph-NP Detector
Column: DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Detector Temp.: 250°C
NP Bead: 30 pA
Oven Temp.: 180°C (1 min) – 5°C/min – 300°C (3 min)

定量時 GC-NPD 温度条件

Oven Temp.: 150°C (1 min) – 5°C/min – 280°C (1 min)

↓
結果

GC-MS の SCAN モードで分析を行ったところ2つの化合物のピークが確認された。これらのピークをライブラリー検索したところ、イミプラミン、デシプラミンのマスフラグメントと一致したが、デシプラミンのピーク形状が悪かったため GC-NPD によって再度分析を行ったところ2つのシャープなピークが確認された。これらのピークは更に、イミプラミン、デシプラミンの標準品とも保持時間が一致したため、本中毒症状はイミプラミン、デシプラミンによるものと判断した。(クロマト1-4)

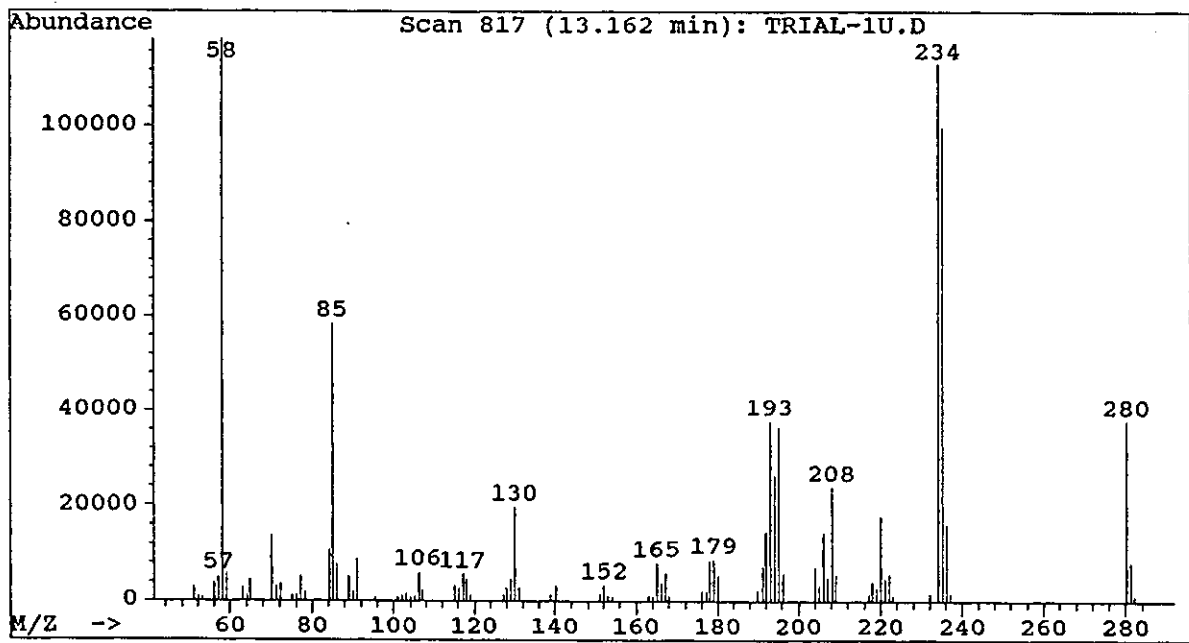
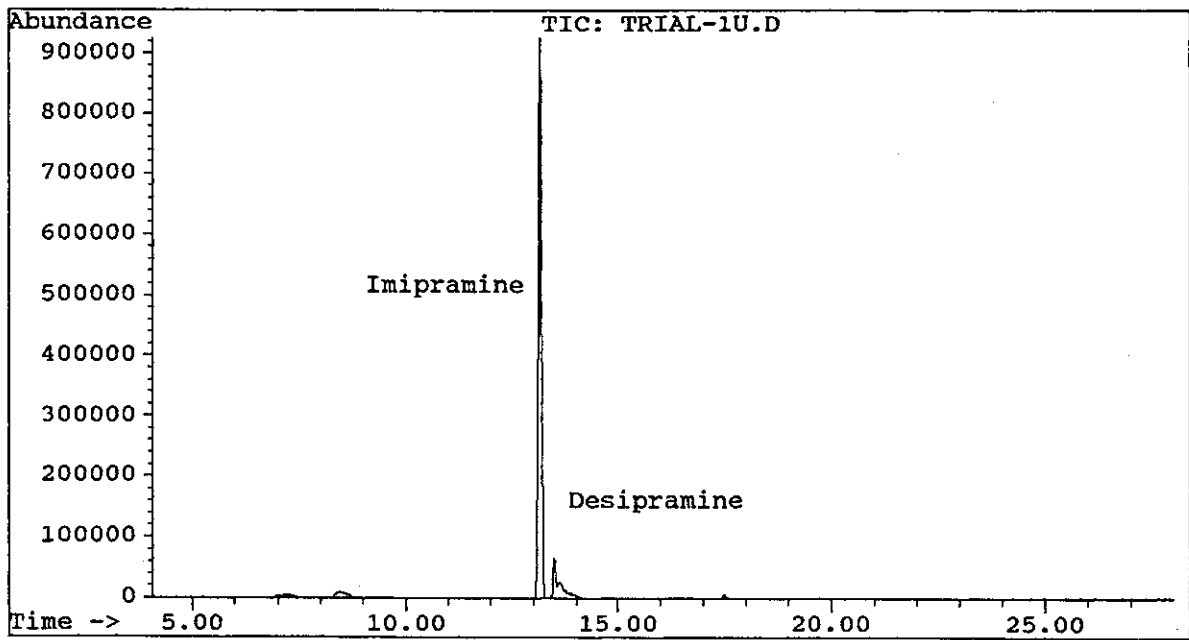
↓
定量方法

内部標準物質としてカルバマゼピン 30 µl (100 µg/ml)を添加して上記抽出を行った。GC-NPD で分析を行い、イミプラミンと内部標準物質、デシプラミンと内部標準物質との面積比を各々求め各々検量線からそれらの濃度を求めた。
(クロマト5、6)

注)本抽出方法は 0.5 – 15.0 µg/ml(イミプラミン)、0.5 – 10.0 µg/ml(デシプラミン)の間で良好な直線性が得られた。定量は抽出毎にキャリブレーターを用いて検量線を作成した。検量線の精度は低、高濃度の Quality Control (QC)によって確認した。検量線の十分な精度を QC によって確認した後にイミプラミンとデシプラミンの濃度を求めた。

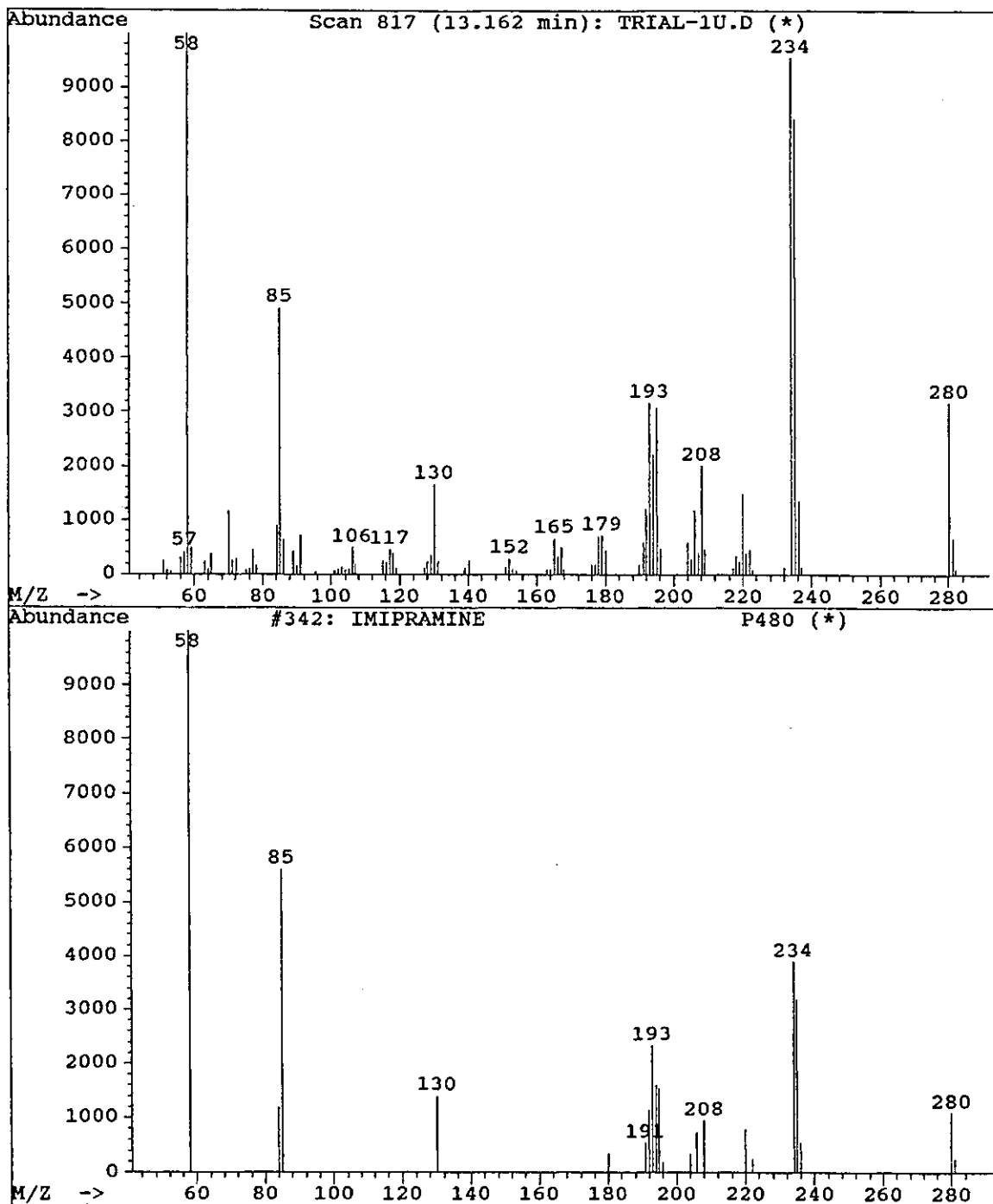
定量結果

	血清 ($\mu\text{g/ml}$)	尿 ($\mu\text{g/ml}$)
イミプラミン	5.16	10.9
デシプラミン	1.89	7.54



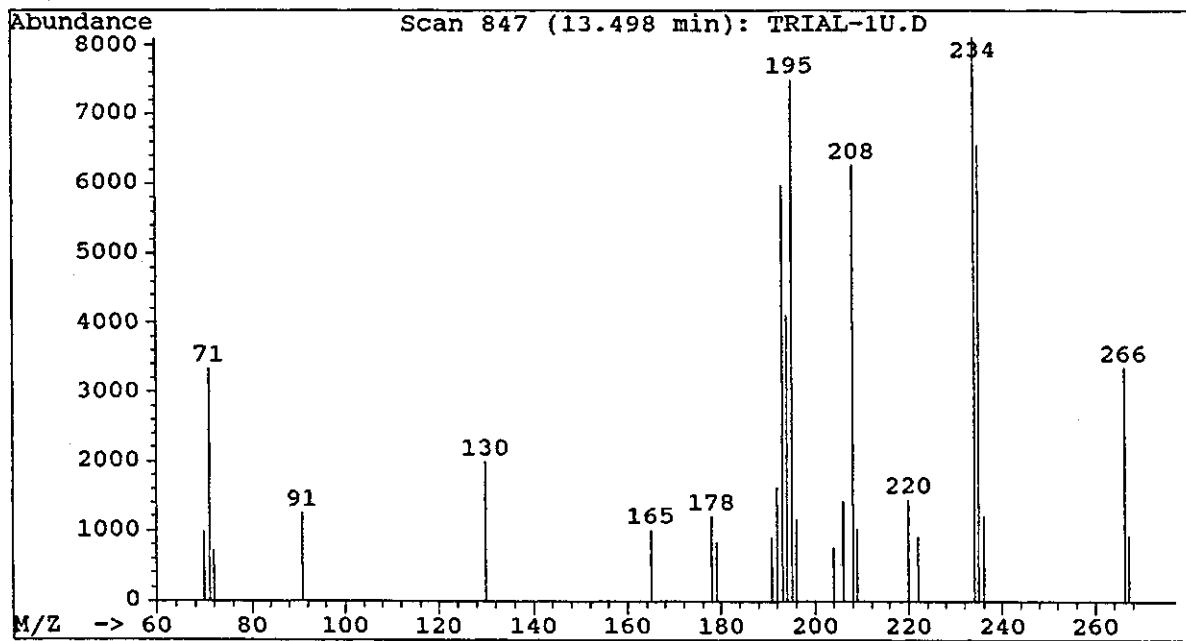
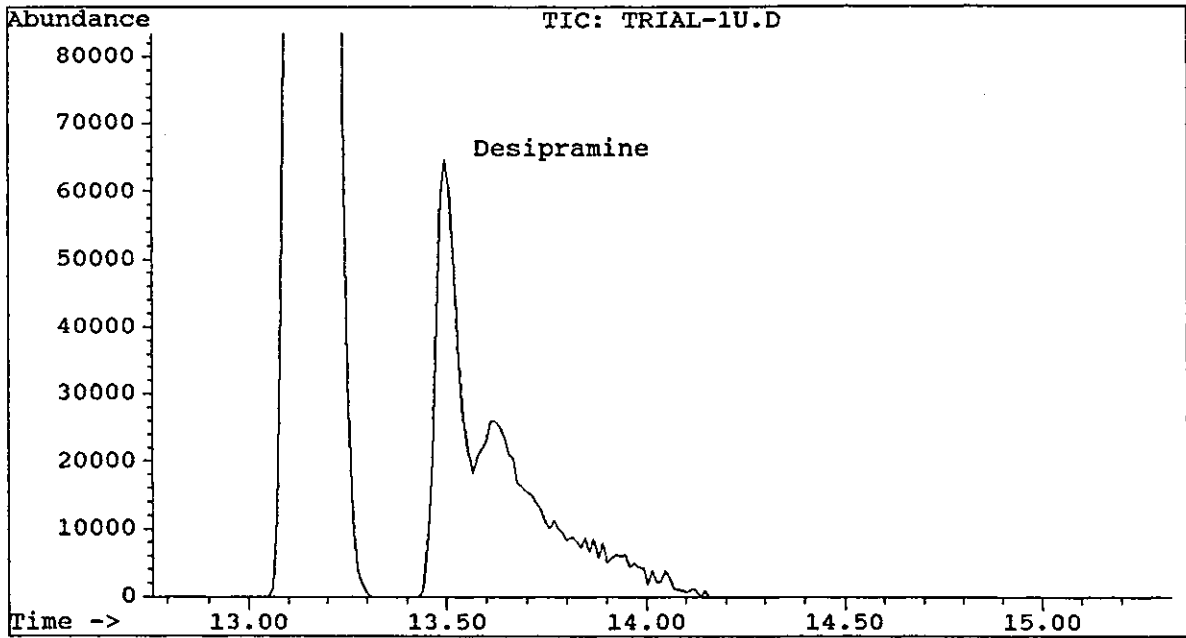
クロマト1 (症例1)

SCAN モードによるクロマトグラムとイミプラミンのマススペクトル



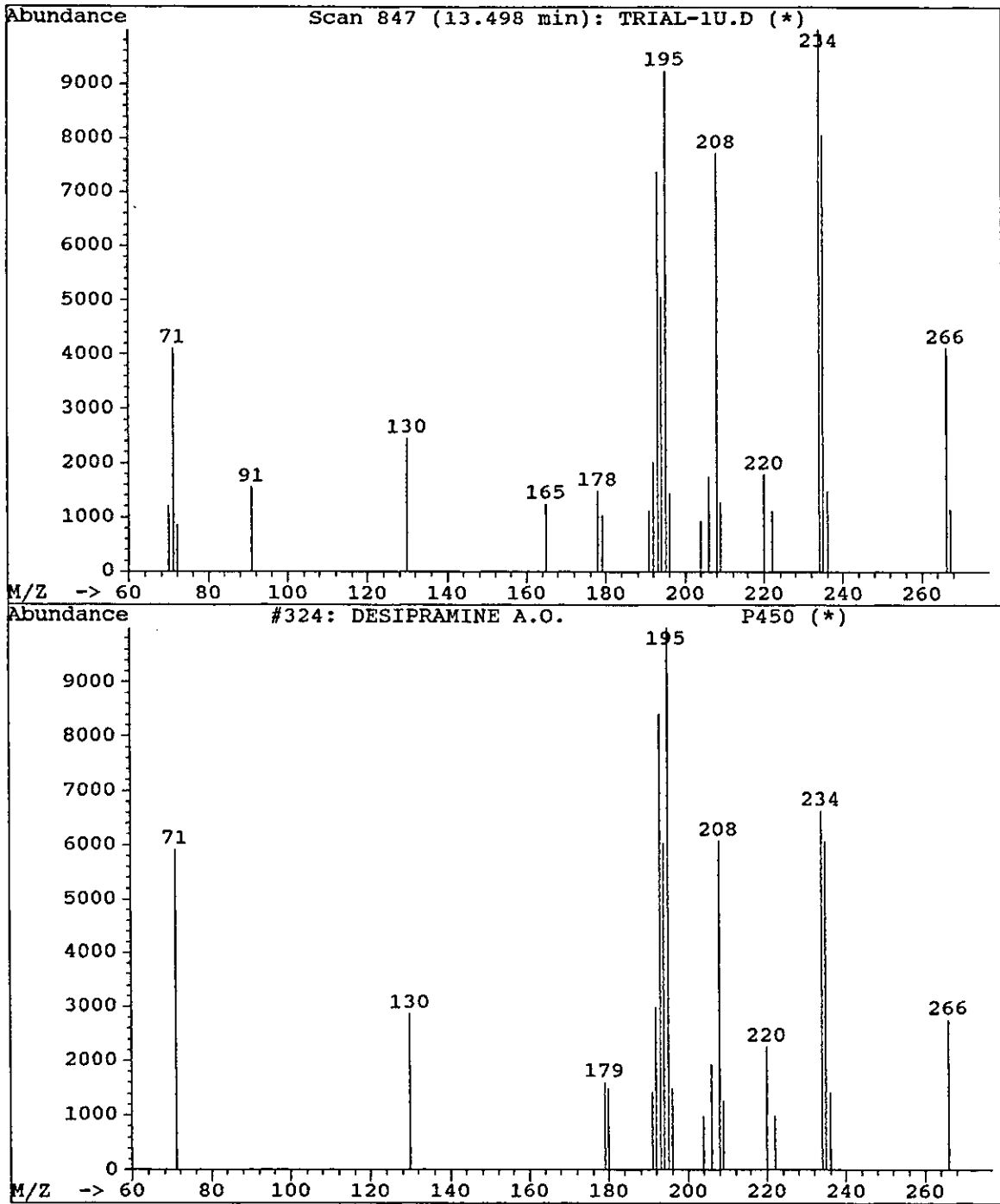
クロマト2 (症例1)

イミプラミンのマススペクトル (上段) とライブラリー (下段) との比較



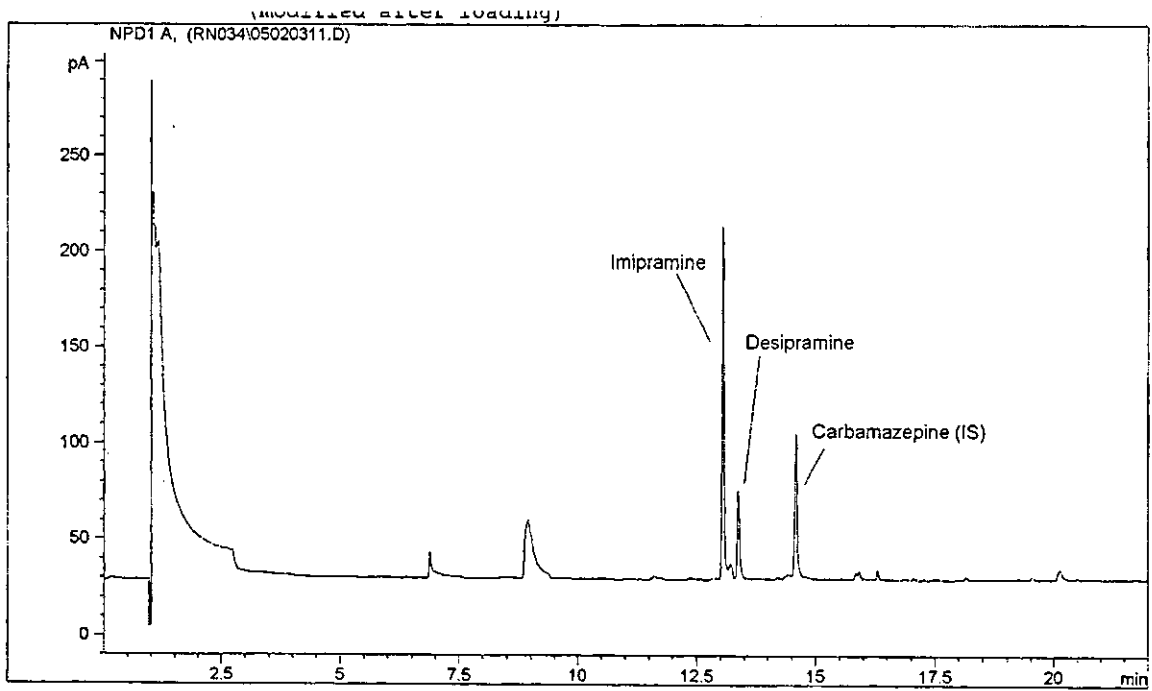
クロマト 3 (症例 1)

SCAN モードによるクロマトグラム (拡大) とデシプラミンのマススペクトル



クロマト4 (症例1)

デシプラミンのマススペクトル (上段) とライブラリー (下段) との比較



=====
 Area Percent Report
 =====

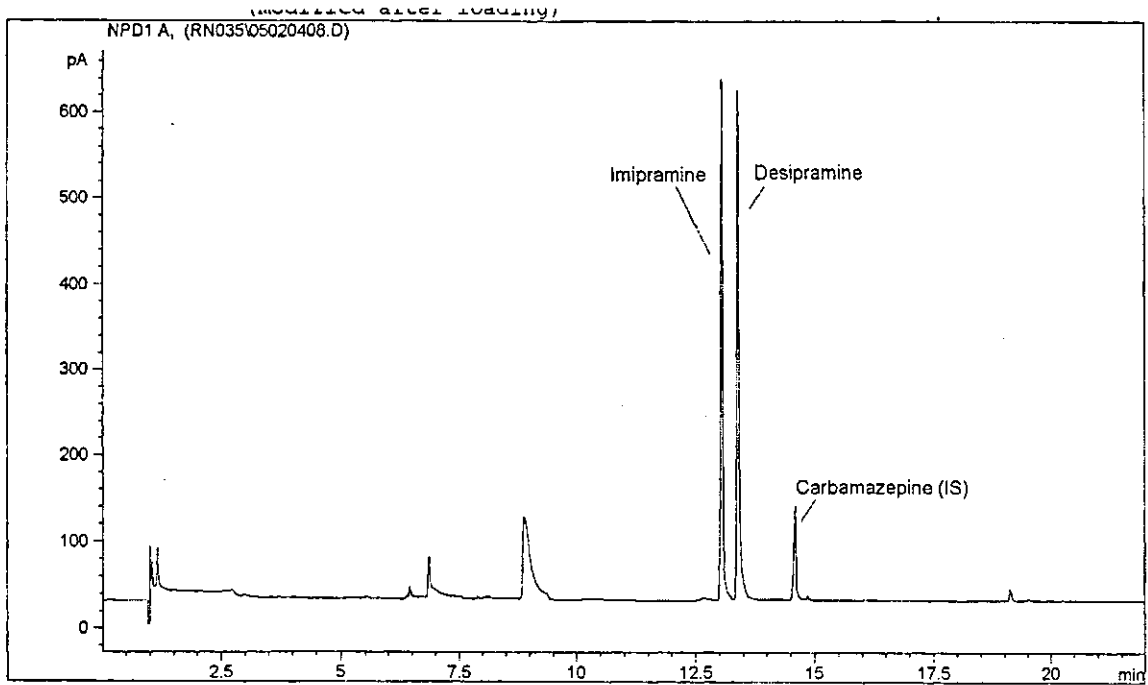
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 4.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

No peaks found

=====
 *** End of Report ***

クロマト5 (症例1)

血清に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-NPD によるクロマトグラム



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 4.00000 [ng/ul] (not used in calc.)

No peaks found

=====
 *** End of Report ***

クロマト6 (症例1)

尿に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-NPD によるクロマトグラム

症例2

本症例はコリンエステラーゼの活性低下が認められるため有機リン系農薬もしくはカーバメイト系農薬による中毒と考えられた。そこで、検体の尿を用いて有機リンに対する予備試験を行った。

予備試験

「有機りん系農薬検出キット」(関東化学)を用いて操作手順に従って検査を行ったところ、エーテル層が紫色に変色したため、少なくとも有機リンが含まれていると判断できたので確認検査を行った。

確認検査

予備試験で行った「有機りん系農薬検出キット」はカーバメイト系農薬に対しては反応しない。また、有機リン系農薬、カーバメイト系農薬は数多くの種類が市販されているため、これらの確認検査は試料の尿から化合物を抽出して GC-NPD と GC-MS のライブラリーを用いて検索を行った。

抽出方法

7. Empore disk C2 をメタノール、純水各 0.5 ml でコンディショニング。
8. 尿 0.5 ml を Empore disk C2 にアプライ。
9. 5%メタノールで洗浄。
10. 吸引乾燥後、遠心(3,000 回転、5 分間)。
11. 0.5 ml の溶媒[クロロホルム:エタノール(9:1)]で溶出。
12. 窒素気流下で溶媒を蒸発乾固。
13. 残渣を 50 μ l のメタノールに溶解し、GC-NPD、GC-MS の試料とした。

GC-NPD の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 6890 Series Gas Chromatograph-NP Detector
Column: DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Detector Temp.: 280°C
NP Bead: 30 pA
Oven Temp.: 100°C (3 min) – 20°C/min – 300°C (3 min)

GC-MS の分析条件(確認検査)

Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph/5971 Mass Selective Detector
Column: HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Oven Temp.: 100°C (3 min) – 20°C/min – 300°C (3 min)

定量時 GC-MS 条件

Oven Temp.: 150°C (3 min) – 10°C/min – 250°C (3 min)
Monitor Ions: Fenitrothion; m/z 277, 260, 125
Fenthion; m/z 278, 169, 125



結果(確認検査)

GC-NPD、GC-MS のスクリーニングによって単一のピークが検出された。このピークはライブラリー検索によってフェニトロチオンのマスフラグメントと一致した。更に、フェニトロチオンの標準品とも保持時間が一致した。この他にピークは検出されなかったためカーバメイト系農薬の存在は否定され、本中毒症状はフェニトロチオンによるものと判断した。(クロマト1、2)



定量方法

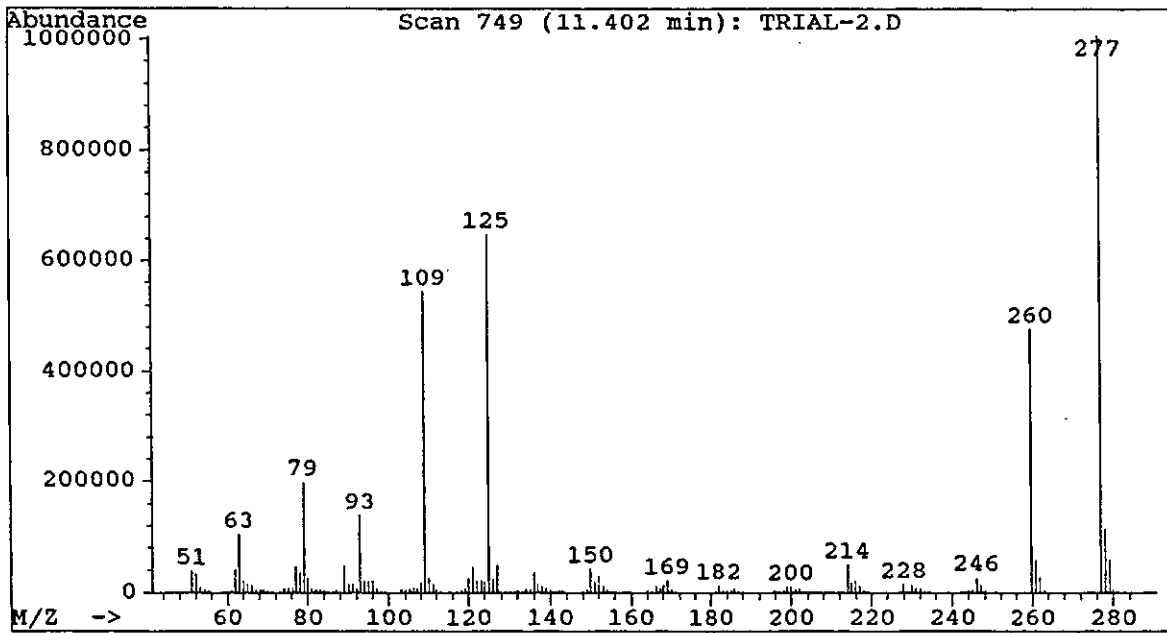
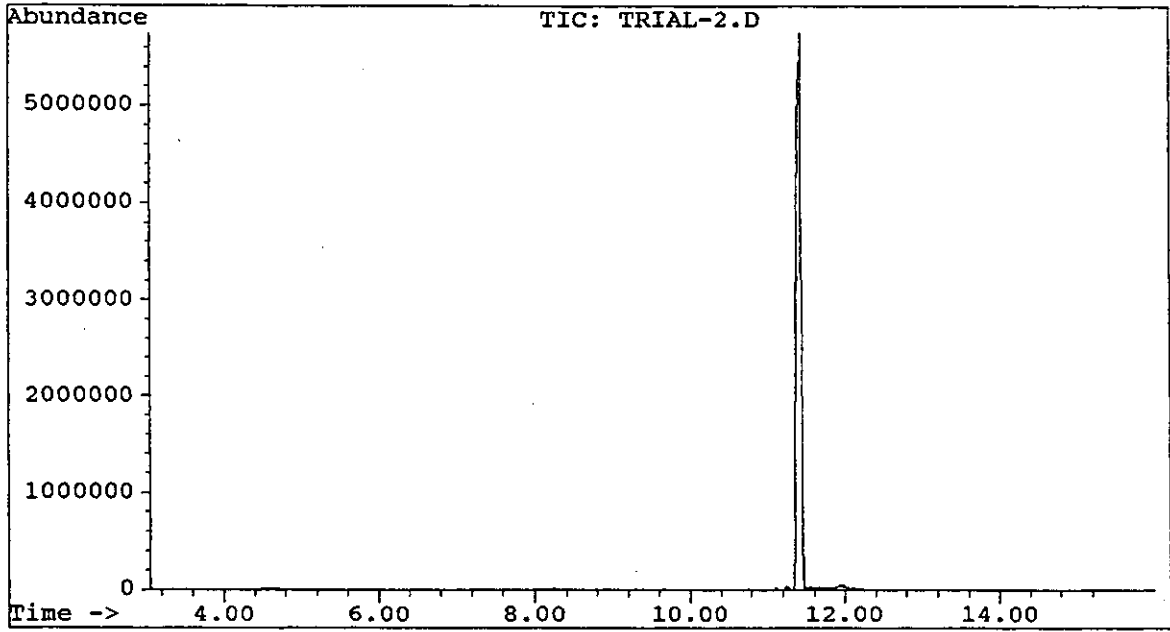
フェンチオン 3 µl (1mg/ml)を内部標準物質として添加して上記抽出を行い、フェニトロチオンと内部標準物質との面積比により検量線から求めた。検量線の精度は低、高濃度のQCを用いて確認した。(クロマト3)

注)本抽出方法は0.5 – 50 $\mu\text{g/ml}$ までの間で良好な直線性が得られたが、定量時はフェニトロチオンが高濃度の場合を想定して、10倍希釈した尿と希釈なしの2組みを抽出して測定を行った。



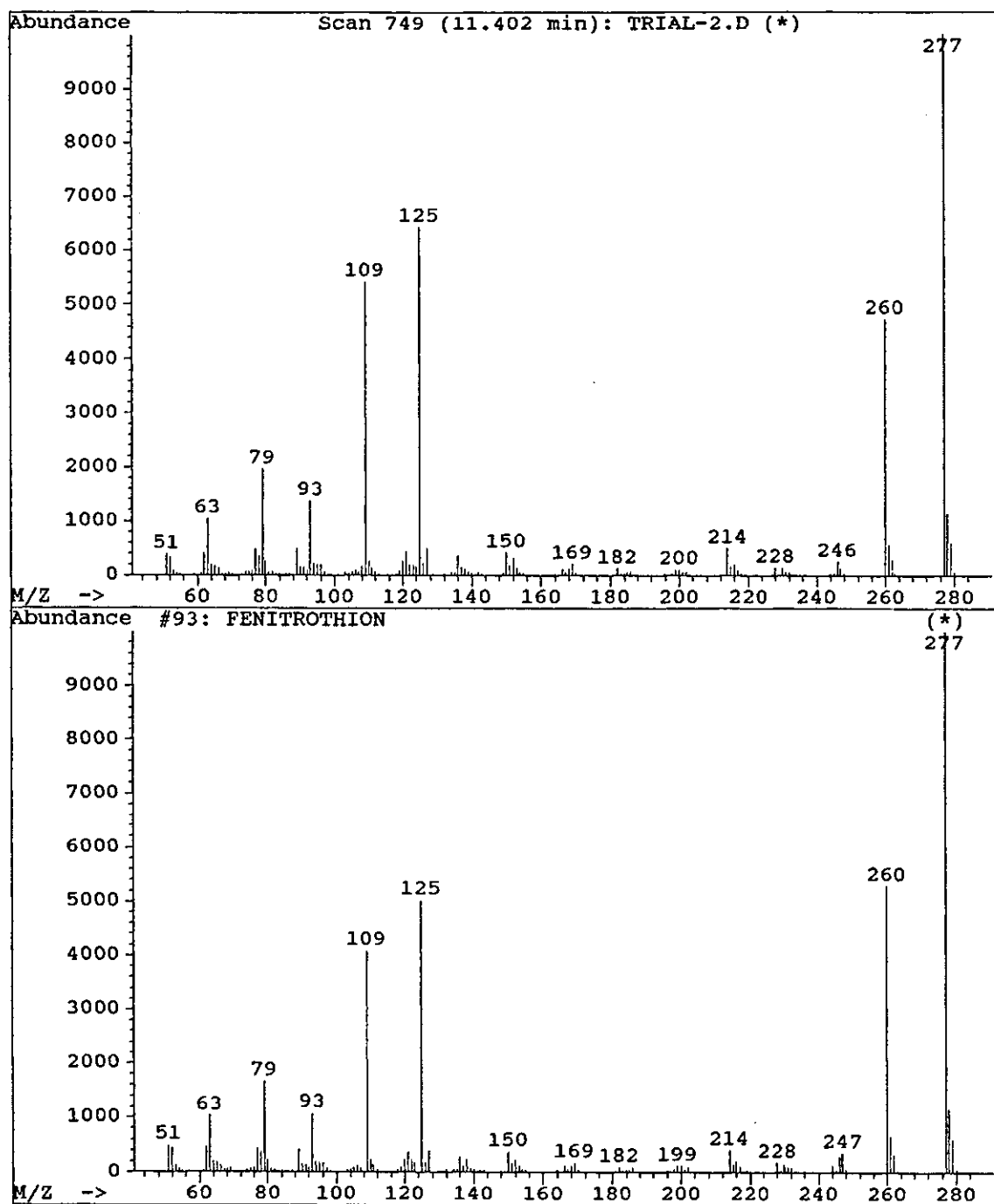
定量結果

フェニトロチオン	38.6 $\mu\text{g/ml}$
----------	-----------------------



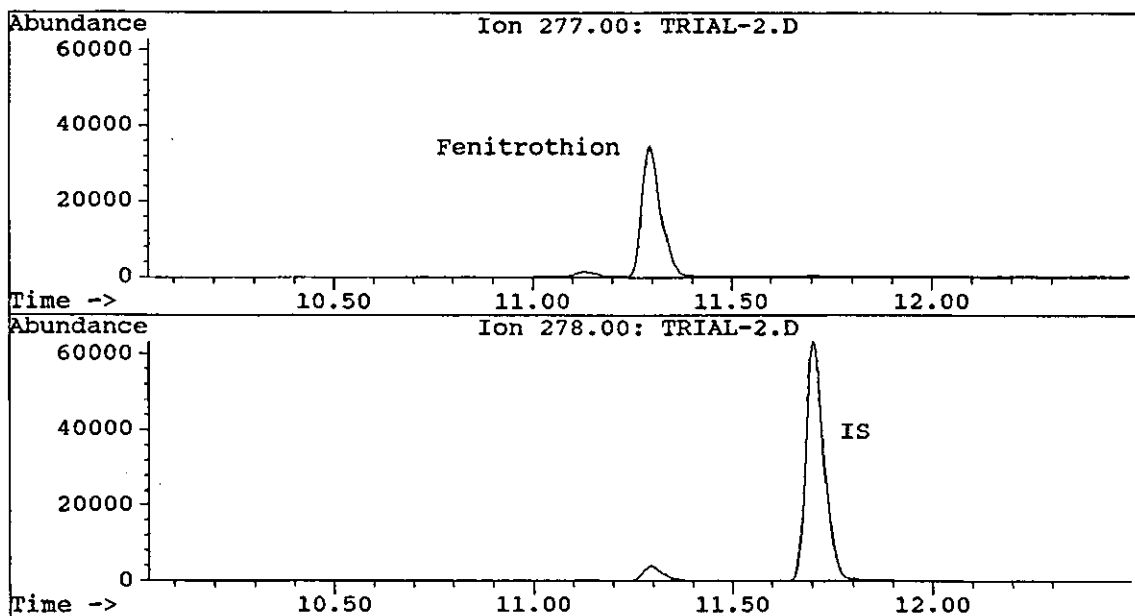
クロマト1 (症例2) (尿抽出後)

SCAN モードによるクロマトグラムとフェニトロチオンのマススペクトル



クロマト2 (症例2)

フェニトロチオンのマススペクトル (上段) とライブラリー (下段) との比較



クロマト 3 (症例 2)

尿に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-MS (SIM)によるクロマトグラム

症例3

症例はルルに含有するアセトアミノフェン中毒と考えられるため、アセトアミノフェンの予備試験を行った。



予備試験

14. 血清 1 ml に 2.5 ml の 5%トリクロロ酢酸を添加。
15. ボルテックスミキサーで攪拌後、遠心(3,000 rpm, 10 分)
16. 上澄 200 μ l に 200 μ l の濃塩酸を添加。
17. 100°Cで 10 分間加熱。
18. 冷却後、0.5 ml の 1%o-クレゾールと 0.5 ml のアンモニアを添加。
10 分以内に判定(青変した場合はアセトアミノフェン陽性)。

予備試験結果

陽性と判定されたためアセトアミノフェンによる中毒と考えられたため、確認及び定量検査を行った。



確認と定量検査方法

確認と定量は GC-MS を用いれば同時に行えるため以下のような抽出操作を行った。



抽出方法

1. 血清 0.1 ml に内部標準物質として 20 μ l の *o*-Acetoamidophenol 溶液 (0.1 mg/ml) と 0.5 ml の純水を添加し、ボルテックスミキサーで十分攪拌。
2. あらかじめメタノールと水各 1 ml でコンディショニングした抽出用カラム Oasis MCX (30 mg/1 cc)に 1 をアプライ。
3. 0.1 N の塩酸 1 ml でカラムを洗浄。

4. メタノール 1 ml で溶出。
5. 窒素気流下でメタノールを蒸発乾固。
6. 70 μ l の BSTFA+1%TMCS を添加。
7. 80°C、20 分間誘導体化。
8. 1 μ l を GC-MS 試料。



GC-MS の分析条件

Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph/5971 Mass Selective Detector
Column: HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)
Injector Temp.: 250°C
Oven Temp.: 100°C (3 min) – 20°C/min – 300°C (3 min)
Monitor Ions: Acetaminophen; m/z 280, 206, 295
o-Acetoamidophenol; m/z 280, 295, 165



定量方法

アセトアミノフェンと内部標準物質との面積比により検量線から求めた。

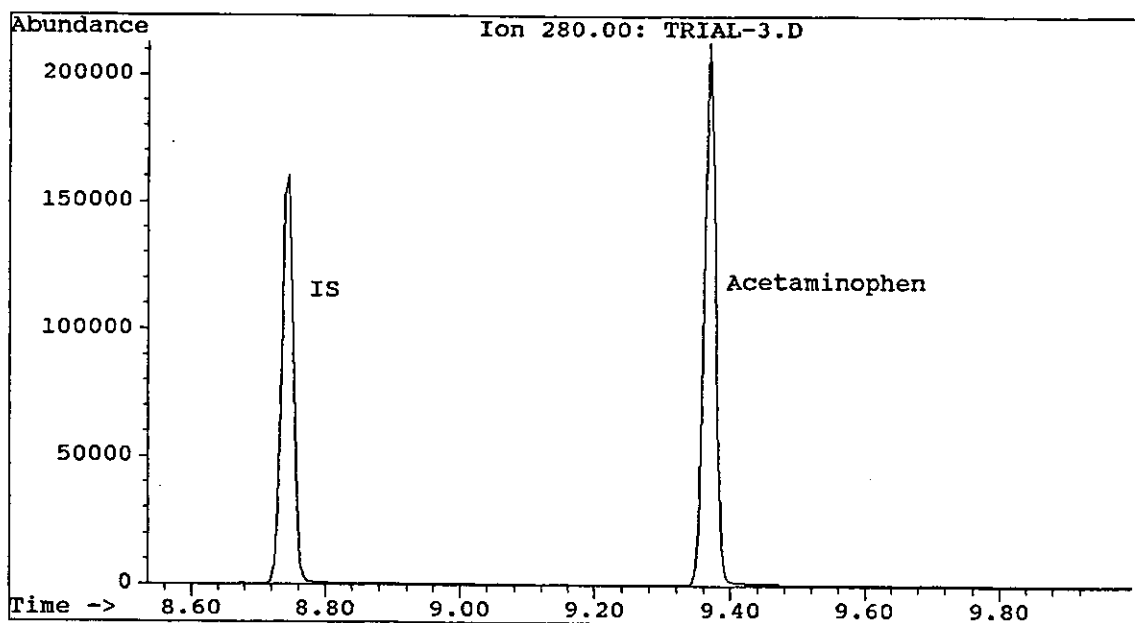
注)本抽出方法は 0.5 – 75 μ g/ml までの間で直線性が得られるが、初回の測定では 75 μ g/ml 以上であったため試料量を 10 分の 1 (10 μ l)にして再度測定を行った。
定量はキャリブレーターを用いて検量線を作成したが、検量線の精度は低、中、高濃度の QC によって確認した。十分な精度を確認した後に、検量線からアセトアミノフェン濃度を求めた。



定量結果

アセトアミノフェン

97.4 μ g/ml



クロマト 1 (症例 3) 10 倍希釈

血清に内部標準物質を添加し抽出した後の GC-MS (SIM) によるクロマトグラム