図１３．運動神経伝導速度(m/秒)

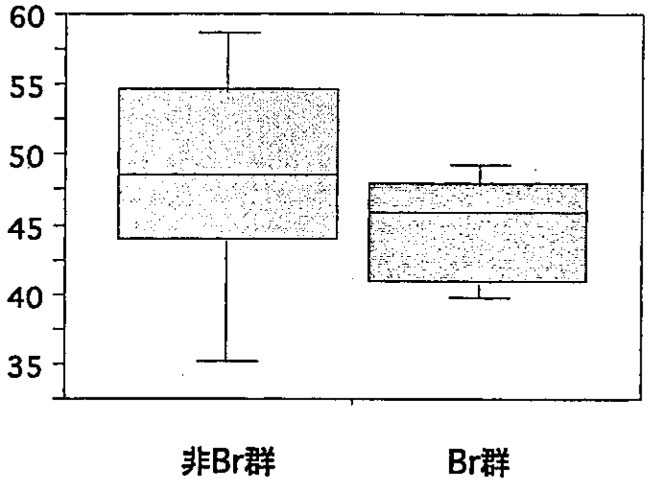


図１４．感覚神経伝導速度(m/秒)

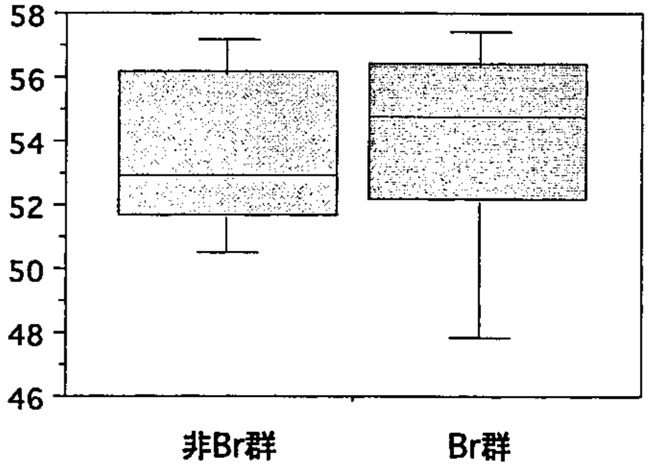
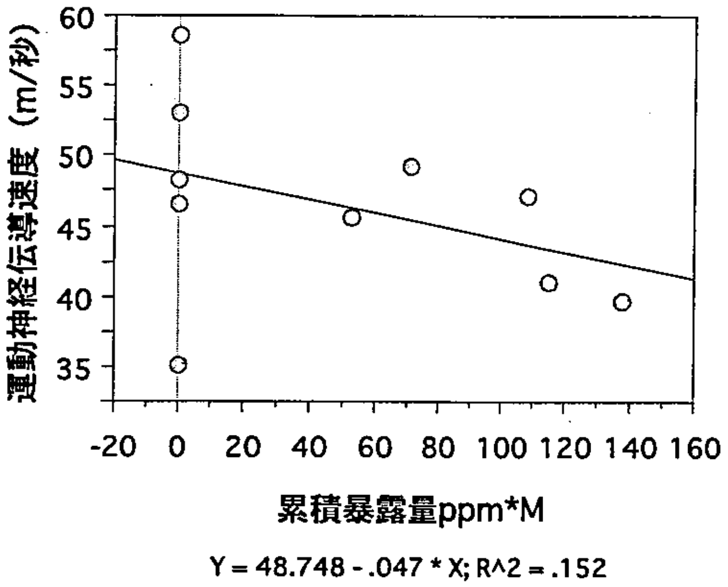


図１５．運動神経伝導速度と累積曝露



II-2. 有機リン系殺虫剤

上島通浩、高木健次、柴田英治、上山 純、鈴木 隆佳、
斎藤 勲、五藤雅博、市原 学、日比初紀、王 海欄、岡村 愛、
内藤久雄、李チュルホ、大谷勝己、滝 賢一、深谷幸生、
大村 実

研究要旨
暴露マーカー測定法に関して、初年度および次年度は、GC/MS 法による有機リン系殺虫剤の尿中代謝物－４種類のジアルキルリン酸－分析測定確立のための基礎検討を行った。３年目は GC/MS による方法の精度を更に高める為の各種検討－誘導体化・液相及び固相抽出法の改良・回収率向上のための pH 調整・前処理における抗酸化剤添加等－を行い、改良・発展させてより精度の高い測定法を開発した。確立された本法を用いて一般健常人の尿を実際に測定し、一般環境中での有機リン系化合物の暴露を評価した。
職域では、2 年目、3 年目に有機リン系、ピレスロイド系殺虫剤を撒布する集団の作業者を対象として生殖次世代影響に関する健康調査と有機リン系殺虫剤の尿中代謝物の測定を行った。また、ヒト集団での調査を補完する予備的検討として、ジクロルボスのラット生殖器系への影響、ライディッヒ細胞のテストステロン合成への影響について検討した。
尿中代謝物測定では分析時間の短縮および検出限界の向上がみられ、検出限界は、5ml の尿を使用した場合、DMP 0.3μg/L、DEP 0.1μg/L、DMTP および DETP 0.1μg/L であり、これまでに報告されている測定法よりも優れた感度を達成することができた。一般健常人の尿(23 検体)を本研究で確立した測定系で測定したところ、その平均値は、DMP 28.8μg/L、DEP 5.0μg/L、DMTP 16.1μg/L、DETP 3.4μg/L であった。今回我々が確立した測定系は、迅速かつ高感度で再現性よく尿中 DAP を測定でき、暴露のない一般集団におけるバックグラウンドレベルの測定が可能となった。生体暴露量調査におけるヒト尿中の４種類のジアルキルリン酸濃度の中央値は暴露群、非暴露対照群ともほぼ等しい値であったが、一部の暴露作業者の中にジメチルリン酸(DMP)濃度の高い者がみられた。非暴露群の DMP 濃度の測定結果は米国での結果報告に比べ高い傾向にあり、今後大規模な生体暴露量評価が必要と思われた。
職域における健康調査では、明らかな生殖機能障害と考えられる所見はみられなかった。精液指標調査では、夏にのみ暴露群の精子運動性指標の一部が有意に低い結果が得られているが、精巣毒性の疑われたジクロルボスについては、ラットでみられる運動精子率の低下は血球 ChE 活性および尿中 DMP 濃度からみて体内負荷量が非常に多い投与量でおき神経毒性の最大無毒性量(NOAEL)の方が低いと考えられること、マウスライディッヒ腫瘍細胞におけるテストステロン合成抑制と細胞死が近い投与濃度で観察されたことより、一般環境レベルでのジクロルボス暴露単独での生殖次世代影響は無視できると考えられる。
この他に、３年目には有機リン系殺虫剤の複合毒性の面から、ラットを用い

て（有機リン系+有機リン系）及び（有機リン系+カーバメート系）による血液コリンエステラーゼ（ChE）活性への影響および ChE と肥満との関連についての基礎検討を行った。

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 による有機リン系農薬およびその尿中代謝物の分析 ―

分担研究者　　　高木 健次　名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
　　　　　　　　柴田 英治　愛知医科大学医学部衛生学講座

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
　　　　　　　斎藤 勲　　東海コープ事業連合商品安全検査センター

GC/MS による有機リン系農薬およびその尿中代謝物の分析（1）

A. 研究目的

ジクロルボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン等有機リン系農薬は、作物を栽培する際の殺虫剤として広く用いられているほかに、ゴキブリ、ダニなどの衛生害虫の駆除を目的とする防疫作業にも広く使用されている[1,3]。これら有機リン系化合物は神経刺激伝達物質アセチルコリンの分解に関与しているコリンエステラーゼ（ChE）活性を阻害して神経中毒を引き起こすことにより殺虫効果を発揮する[2]。人でも大量に暴露すれば急性、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。

有機リン系農薬は種類も多く、これらを日常的に取り扱う作業者の暴露の実態は十分に明らかになっていない[3]。有機リン系農薬の暴露評価としては、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物のうち、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（Fig.1）、尿中アルキルリン酸を用いたモニタリングは作業者への負担が少なく暴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暴露と尿中代謝物の関連が検討されている。したがって、我々は最初に、作業者個人レベルでの暴露評価指標として、有機リン系農薬の生物学的モニタリング方法確立を目指し、衛生害虫防除で使用されているジクロルボスとダイアジノンを対象農薬として、ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）による

両化合物、および尿中代謝物分析のための基礎的な検討を行った。

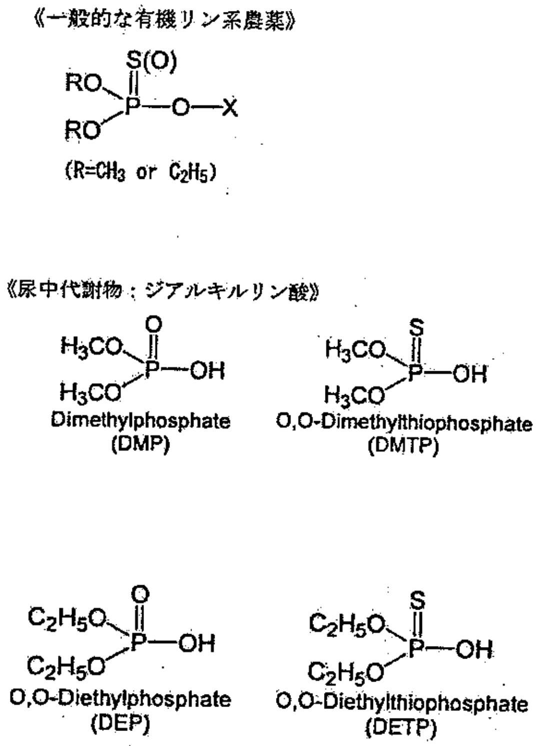


Fig. 1 有機リン系農薬類と尿中代謝物

B. 実験方法

◆検討 1. ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS) [4]の測定条件について

マススペクトルは横軸が質量(m)と電荷数(z)の比 m/z で、縦軸がイオンの相対存在量（%）で表示される。これにより試料の正確な質量を決定でき、元素組成や構造が推定できる。GC/MS で定量する場合は、全イオンを取り込みフルスペクトルで目的物を確認しながら分析するフルスキャン法と２，３の化合物に選択的なイオンのみを取り込み、高感度で分析する選択的イオンモニタリング法（SIM）があり、目的に応じて使用されている.今回の尿中有機リン系農薬代謝物にはフルスキャン法と SIM の両者を併用して用いた。

◆検討 2.GC/MS によるジクロルボス（DDVP）およびダイアジノンの分析

材料

試薬

ジクロルボス（DDVP）標準品
【関東科学】

ダイアジノン（Diazinon）標準品
【和光純薬工業】

アセトン（残留農薬試験用・PCB 試験用）
【関東化学】

GC/MS システム

PerkinElmer 社製 TurboMass システム《GC の条件》

カラムは DB 5MS（30m×0.25mm、0.25μm、J&W Scientific）を使用、温度条件は以下の通りである：70℃1 分保持—10℃/分で 200℃まで上昇—5℃/分で 280℃まで上昇、注入口：240℃、トランスファーライン 300℃. キャリアガスはヘリウム（99.999%）で流量は 1 ml/min、スプリットレスで 1μl 注入した.

《MS の条件》

電子イオン化（EI）法（70 eV），フルスキャン法または SIM 法で測定した.

方法

標準品を各 1 mg はかりとり、アセ

トンで 1 ml に希釈して 1000 ppm 溶液を作製し、用事適当な濃度にアセトンで希釈し用いた。

◆検討 3. 有機リン系農薬尿中代謝物の測定

多くの有機リン系農薬は体内で代謝分解され、尿中にジアルキルリン酸（DAP）として排出される[5-8]。通常、リン酸塩の形では極性が高く気化しないため GC/MS で測定できない。そこで、このような物質は誘導体化して気化しやすい化合物に化学変換してから測定する[10]。今回の DAP に関しては、リン酸部分を誘導体化によりエステル化して、揮発性を高める必要がある。この誘導体化の方法にはベンジル化、エチルエステル化、ペンタフルオロベンジル化などがあるが[10]、今回はReid ら[9]、およびHardt ら[8]の方法を応用したペンタフルオロベンジルブロマイド（PFBBr）によるエステル化の方法について検討した(Fig. 6)。

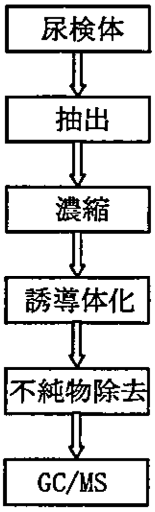
材料

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 (PFBBr)【Acros Organics】
- 水素化ホウ素ナトリウム 【関東化学】
- 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（残留農薬試験用・PCB 試験用） 【関東化学】
- アセトニトリル(残留農薬試験用 PCB 試験用) 【関東化学】
- n－ヘキサン（残留農薬試験用・PCB 試験用） 【関東化学】
- トルエン（残留農薬試験用・PCB 試験用） 【関東化学】
- Florisil PR(130℃一晩活性化した後使用) 【和光純薬工業】
- BONDESIL-PSA 【GL Sciences】

方法

分析の流れを簡単に示す。



《誘導体化の方法》

1) 各 DAP をメタノールに溶解し、

100μmol/ml とした

2) 内部標準の DBP をメタノールに溶解し、10 mg/L に調整した

3) DAP,DBP 溶液を 10ml スクリューキャップ付試験管に取り、窒素気流で蒸発乾固、アセトニトリル 1 ml、K_2CO_3 10 mg、PFBBr 50μl を加え、キャップをし、90℃水浴中で反応させた

C. 結果および考察

ダイアジノンおよび DDVP アセトン溶液 20ppm を GC/MS に注入、全イオン量の測定値によるクロマトグラム（TIC:Total ion chromatogram）を示す（Fig.2)。DDVP は 8 分、ダイアジノンは 15 分のところにピークが出現した。

m/z 220 は DDVP から電子 1 個が失われて生成し、試料分子の分子量を反映する分子イオンピークである。分子イオンよりも低質量側に出現するフラグメントイオンは、分子イオンがイオン化室中で分解反応を起こして生成したものである。最も多く生成する m/z109 のフラグメントイオンがベースピークとして観察された。その他脱塩素した m/z 185,塩素イオンが転移した m/z 145, m/z79 イオン等 DDVP に帰属するフラグメントイオンが認められた。

ダイアジノン（M=304）のマススペクトルからも同様に、分子イオンピーク m/z 304、ベースピーク m/z137、その他のフラグメントイオン m/z 276（$M^+-C_2H_4$），248（$M^+-2C_2H_4$），199…などが読み取れる（Fig.4)。

以上は Full Scan 法によって分析したものであるが、GC/MS のもう一つの機能として、高感度分析が可能な SIM（selected ion monitoring）法がある。これは化合物に特異的なイオンを選び、時間経過でのイオン量の変化を追うものである。通常の分析では、スペクトルを得るために数百の質量範囲を一秒以下の時間でスキャンしなければならないが、SIM では測定質量を固定することによって、特定のイオンのみを連続してスキャンすることになる[4)]。こうすることによって 1～2 桁の高感度分析が可能となる。

これを利用してダイアジノンについて m/z 304,276,248 を、DDVP については m/z 220,185,145 を SIM で検出した（Fig.5)。Full Scan では 1 ppm 程度までしか検出できなかったが、この測定方法により 100 ppb の濃度まで十分検出が可能となった。

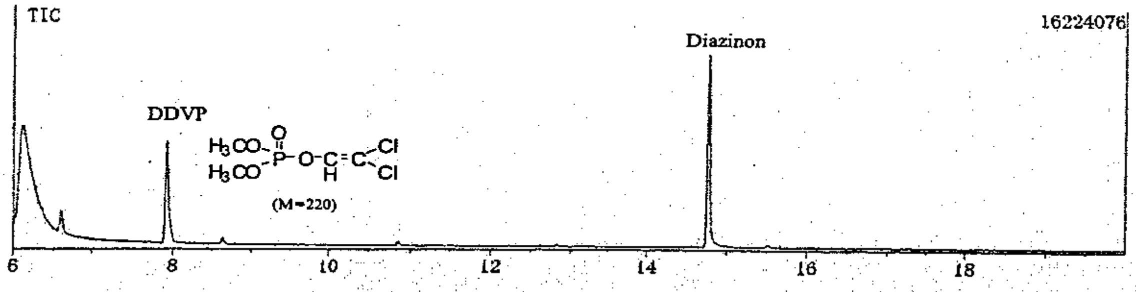


Fig. 2. ジクロロボス (DDVP) およびダイアジノンの TIC

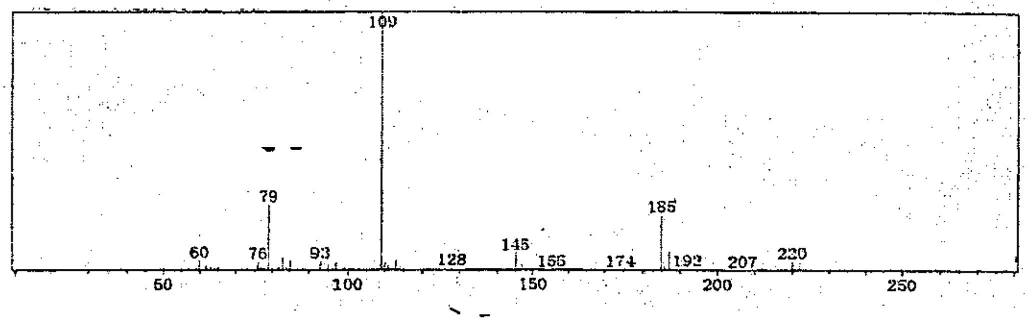


Fig. 3. DDVP のマススペクトル

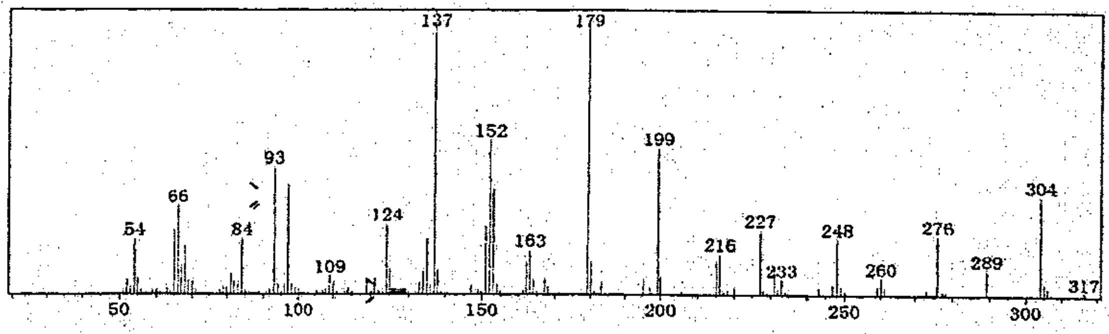


Fig. 4. ダイアジノンのマススペクトル

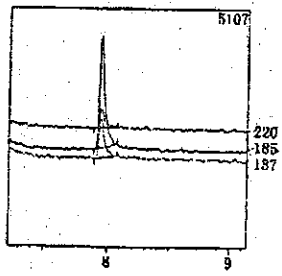


Fig. 5. SIM による DDVP の分析(100ppb)

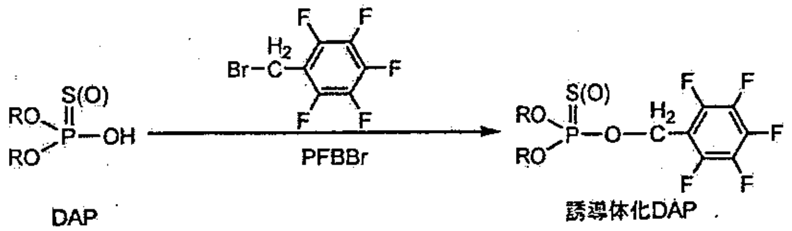


Fig. 6. ペンタフルオロベンジルブロマイド(PFBBr)によるジアルキルリン酸(DAP)の誘導体化

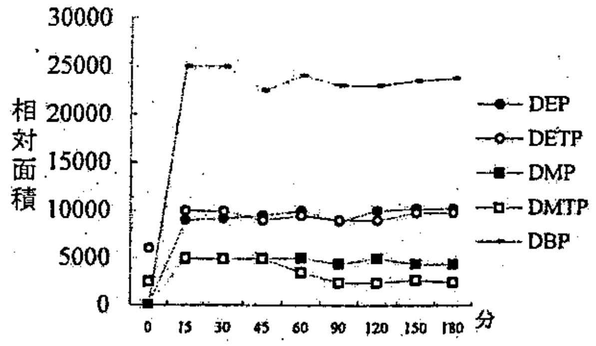


Fig. 7. 反応時間による生成物量の変化

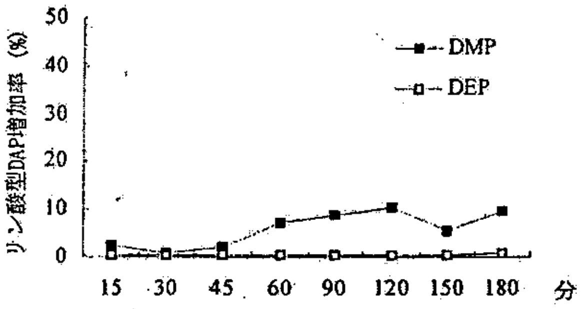


Fig. 8. PFBBr 誘導体化における DMTP, DETP の分解

表 1. 保持時間と選択イオン

表1.Retention Times and Detected of the Analytes.

PFB esters of the substances	Retention time (min)	Detected Masses (m/z)
DMP	11.3	306,194,110
DEP	12.6	334,258,197
DMTP	13.4	322,211,110
DETP	14.5	350,274,213
DBP (IS)	16.4	335,279,258

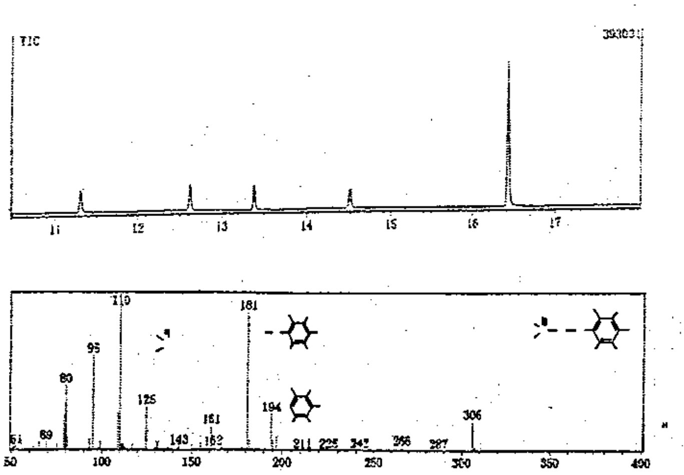


Fig. 9. 上：PFBBr−DMP, DEP, DMTP, DETP の TIC　下：DMP のマスペクトル

PFBBr による誘導体化では、チオリン酸型のジメチルチオホスフェート(DMTP)とジエチルチオホスフェート(DETP)は室温において速やかに反応するが、リン酸型のジメチルホスフェート(DMP)とジエチルホスフェート(DEP)は加熱して反応させる必要があった。しかし反応温度の上昇に伴って、チオ型はリン酸型に分解する[8,9]ことがこれまでの報告からわかっている。このため、Reid らはチオ型と非チオ型とを別々の温度（室温－チオリン酸型、90℃－リン酸）で二度誘導体化しており、この場合操作が煩雑となる。これに対し、Hardt らはチオリン酸型からリン酸型への変化を防ぐために、40℃という低めの温度で 15 時間かけて誘導体化していた。この方法ではすべての DAP を感度よく、同時に誘導体化できるが、迅速性に欠ける。そこで今回は、両者の方法を応用し、すべての DAP を同時に、かつ迅速に反応させる方法を検討した。

そこでまず、溶媒に用いたアセトニトリルの沸点（82℃）に近く、水浴の加熱温度調整が容易な 90℃で、反応時間に伴う誘導体化物の生成量を比較した（Fig. 7）。チオリン酸型に関しては 0 分でも PFBBr を加えた時点で一部反応が起きていることがわかる。その後、90℃水浴中で反応させ、経時的に生成物の量を測定した。チオリン酸型、リン酸型ともに反応 15 分後、すでに十分量が誘導体化されていた。しかし、チオリン酸型の DMTP は 60 分以降生成量が減少している。この原因として DMTP が DMP へと変化したためと考えられたのでチオリン酸型の誘導体化反応時のリン酸型への変化を調べた(Fig. 8)。DEP に関してはほとんど増加は認められなかったが、DMP は 45 分を経過したあたりで数%増加している。この時間は、先に述べた DMTP が減少し始めた時間と一致しており、このことからも DMTP は DMP へと変化したと考えられる。以上のことから、反応温度が 90℃という高温状態でも、反応時間が 15 分～45 分までであれば、す

べての DAP が十分誘導体化されることがわかった。そこで誘導体化については、90℃、30 分という条件で反応させることにした。DMP, DEP, DMTP, DETP のペンタフロロベンジル誘導体化のクロマトグラムと、DMP のマススペクトルを示す (Fig. 9)。

表 1 にそれぞれの代謝物誘導体の保持時間と分子イオンおよびその構造に由来するフラグメントイオンをまとめた。GC/MS による高感度分析の検討として、表 1 に示したイオンを用いて、DMP について SIM による分析を行った結果、0.1 μM/ml の濃度まで検出することができた。

今回、GC／MS を用いた有機リン系農薬ジクロルボス、ダイアジノンの分析、有機リン系農薬尿中代謝物 DMP, DEP, DMTP, DETP のペンタフロロベンジル誘導体化による高感度分析の基礎的な検討を行った。従来の分析法の誘導体化条件を再検討し、迅速簡便に分析する条件を設定することが可能となった。

今後これらの分析条件を用いて、衛生害虫防除作業者の有機リン系農薬の尿中代謝物測定による健康管理への応用、一般健常人での尿中代謝物量測定による日常的な有機リン系農薬の暴露状況の把握とその原因の究明などが可能になると思われる.

参考文献

1) 小林裕子, 日本農薬学会誌 17: 125-136, 1992
2) 奥野俊博 他, 兵庫県衛生研究所年報第 31 号: 73-81, 1996
3) 須永匡彦 他, 産業医学 31: 142-149, 1989
4) 斎藤勲 他 産業医学, 26;15-21, 1984
5) S. J. Garfitt. et. al, Biomarker, 7: 113-122, 2002
6) WHO, International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 198: Diazinon, 1998
7) Alex N. Oglobline. et. al, The Analyst. 126: 1037-1041, 2001
8) Hardt J. & Angere J., J. Anal. Toxicol. 24: 678-684, 2000
9) Stuart J. Reid & Randall R. Watts, J. Anal. Toxicol. 5: 126-132, 1981
10) 中村洋 監訳, 分離分析のための誘導体化ハンドブック (丸善株式会社), 1996

GC/MSによる有機リン系農薬およびその尿中代謝物の分析（２）

A. 研究目的

先に、作業者個人レベルでの暴露評価指標として、有機リン系農薬の生物学的モニタリング方法確立を目指し、衛生害虫防除で使用されているジクロルボスとダイアジノンを対象農薬として、ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）による両化合物、および尿中代謝物分析のための基礎的な検討、特にGC/MSの測定条件等についての検討を行った。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。抽出操作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。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。また測定試料として、尿量約5 mlを必要とし、動物実験を用いた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。一方、定性・定量分析にはGC/flame photometric detection、GC/MS法、GC-MS-MS法、高速液体クロマトグラフィー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、ヒト、ハムスター、マウスおよびラット尿を対象とし、更に精度の向上を目指し、尿中dialkyl phosphateの抽出に関わる種々なる検討を行い、最適抽出法および良好なGC-MS測定条件の結果を得たのでここに報告する。

B. 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-pentafluoro-toluene (PFBBr)【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】

<u>GC-MS システム</u>
PerkinElmer 社製
TurboMass システム

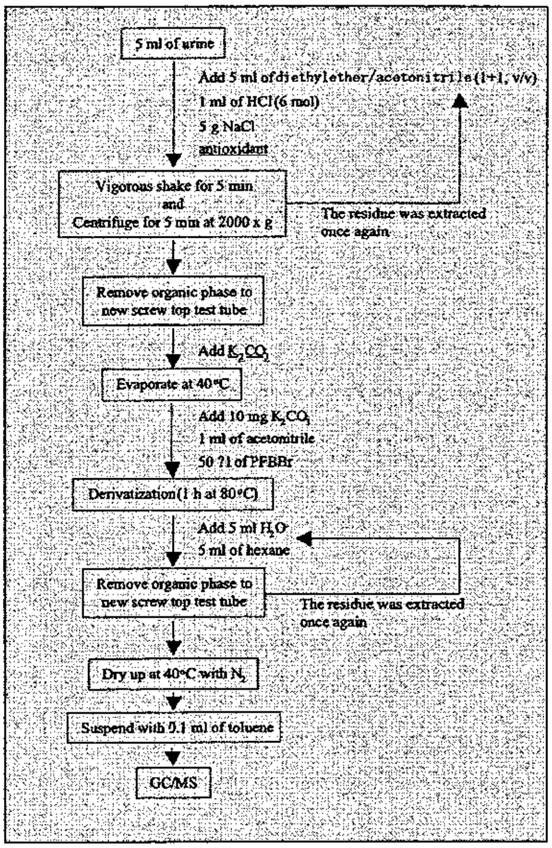
<u>分離用カラム</u>
SPELCO 社製
Fused Silica Capillary Column
SPB™-1
60 m
0.25 mm ID
1.0 μm film thickness

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 法では測定できず、誘導体化法が利用されている。先に PFBBr を用いた誘導体化法で、15 時間かけた従来法から、1 時間法に短縮改良したことを報告した。今回、この誘導体化条件を用い、さらに高回収率で再現性のある測定法確立のために、抽出条件設定の検討を実際の尿サンプルを用いて行った。分析フローチャートを図-1 に示す。

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なっているが、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

図-1



行った。その後図-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。

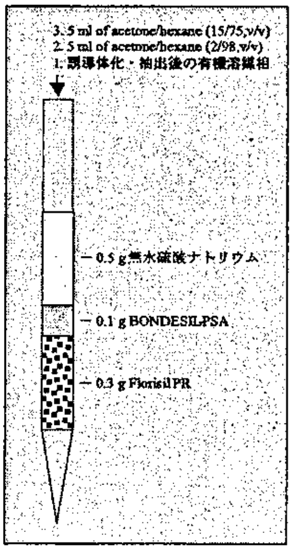
2. 抗酸化剤の選択

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、以後図-1 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。

3. 誘導体化処理後の不純物除去法

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方法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

図-2



PR 0.3 mg、BONDESIL-PSA 0.1 mg、

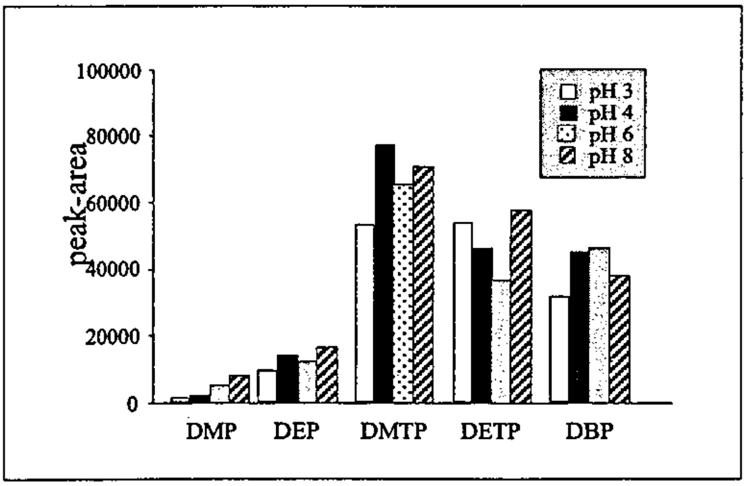
無水硫酸ナトリウム 0.5 g を充填したカラム（図-2）に誘導体化・抽出を行なった有機溶媒相を通し、その後 5 ml acetone/hexane (2/98, v/v) で洗浄し 5 ml acetone/hexane (15/75, v/v) で誘導体化された dialkyl phosphate を溶出した。得られた有機溶媒相は N_2 を用いて dry up され、さらに 0.1 ml toluene で溶解された後、GC/MS 分析に供された。

C. 研究結果

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 mg 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（図-3）。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。

図-3　抽出後の有機溶媒相の pH と各種ジアルキルリン酸の回収量



2. 抗酸化剤の選択

図-4 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 of urine の割合で添加し、その後図-1 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。

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。図-5 は健常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。

図-4 抗酸化剤未添加時の偽 DMP,DEP

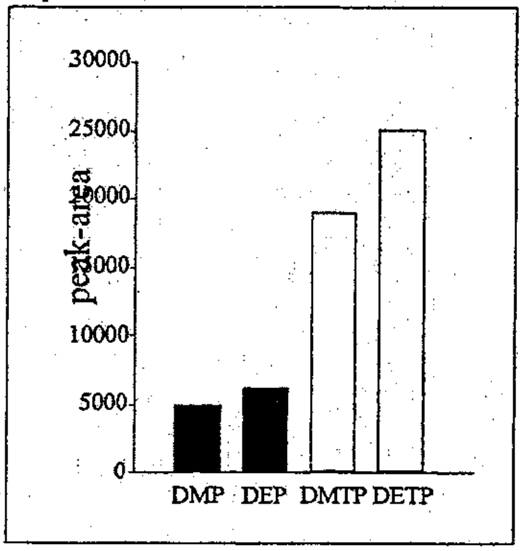


Table 1. Effect of antioxidant, ascorbic acid, SoD and Pyrogallol, on DMTP and DETP conversion to DMP and DEP.

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

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 ?1	Inner Source Temp.	:250 °C
		Inter Face Temp.	:300 °C
		Scan Range	:40-500
		Scan Interval	:0.5 sec
		SIM Interval	:0.2 sec

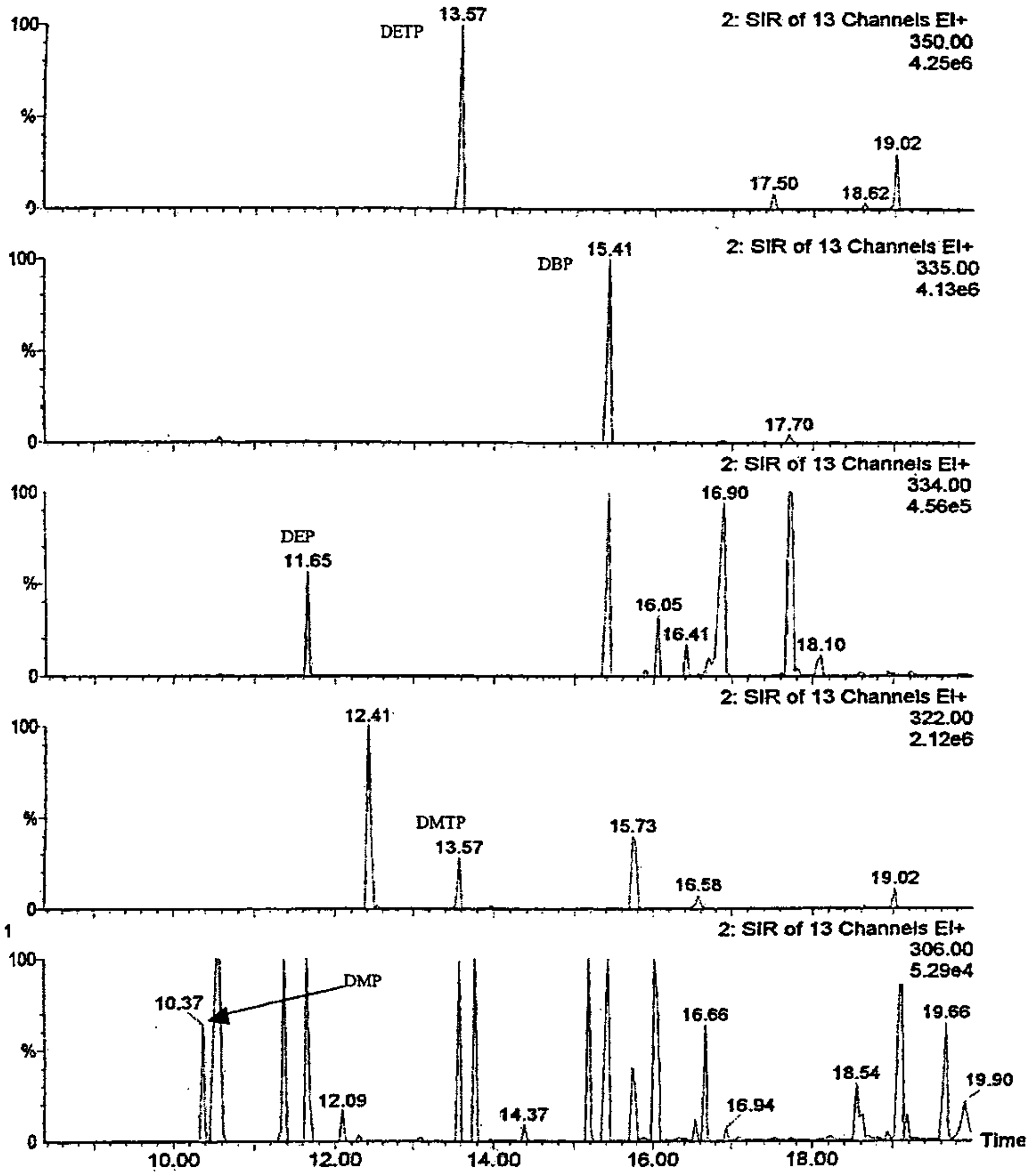


図-5　GC/MS 分析によるクロマトグラム

D. 考　察

従来、尿中 dialkyl phosphate の測定には一般に液体抽出法がよく用いられるが、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た、同時ヒト尿中 dialkyl phosphate、DMP、DEP、DMTP および DETP の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、