

EPNの分析

<前処理>

1. 試料 100 μ l に 100 μ g/ml スルプロホス-メタノール溶液 10 μ l を加える.
2. ヘキサン 500 μ l を加え, ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌する.
3. 12000-g で 5 分間遠心分離する.
4. 有機層を分取する.
5. 室温水浴中で窒素ガスで乾固する.
6. 移動相 100 μ l に溶解し, その 20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する.

<分析条件>

ポンプ: Shimadzu LC-10A 流 速: 1.0ml/min

検出器: Shimadzu SPD-10A 検出波長: 270nm

カラム: Nova-Pak C18 (3.9 x 150mm, 4 μ m, Waters) 温 度: 40 $^{\circ}$ C

移動相: アセトニトリル: 水=6:4

(10 μ g/ml)	Rt (min)	回収率 (%)
EPN	6.207	86.2
Sulprofos	11.514	83.1

検出下限: 0.05 μ g/ml in plasma

マラチオンの分析

<前処理>

1. 試料 100 μ l に 100 μ g/ml CYAP-メタノール溶液 10 μ l を加える.
2. ヘキサン 100 μ l を加え, ボルテックスミキサーで攪拌する.
3. 12000-g で 5 分間遠心分離する.
4. 有機層を分取する.
5. 1 μ l をガスクロマトグラフ-質量分析計に注入する.

<分析条件>

装 置 : HP6890 + HP5972 GC-MS system (Scan mode)

カラム : HP-5, 30m x 0.25mm i.d., 膜厚 0.25 μ m

温 度 : カラム 50 $^{\circ}$ C (4 min) - (20 $^{\circ}$ C/min) - 320 $^{\circ}$ C (7.5 min)

注入部, 検出器 : 300 $^{\circ}$ C

キャリアガス : ヘリウム 1ml/min

ヒ素の分析

ヒ素中毒と考えられた症例の分析を原子吸光フレイムレス（ファーネス）法にて総ヒ素濃度の測定をおこなった。

<前処理>

サンプルを 0.15N 硝酸で 10 に希釈し測定する。

<分析条件>

島津製作所 AA-6800 ファーネス法（D2 ランプ補正法）、グラファイトチューブ（プラットフォームチューブ）

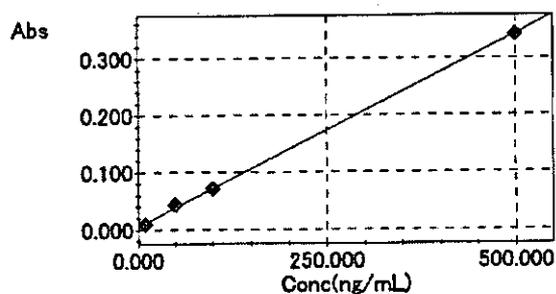
血清では 10 μ L、尿では 20 μ L を原子吸光分析計に打ち込みピークの高さで定量を行った。バックグランド補正は D2 ランプ補正法により行った。

<参考>

・検量線

1000 μ g/mL のヒ素濃度標準液（和光純薬）を 0.15N 硝酸で 10、50、100、500ng/mL に希釈し検体と同じ前処理をおこない測定。血清、尿共に 10~500ng/mL の範囲で $r=0.999$ で直線関係が見られた。

検量線(検量線番号: 01)

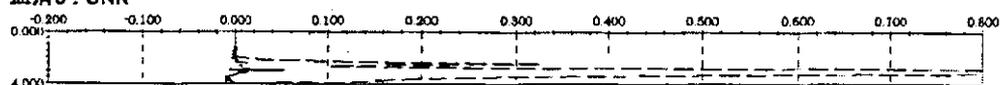


Conc (ng/mL)	Abs
10.0000	0.0088
50.0000	0.0433
100.0000	0.0718
500.0000	0.3423

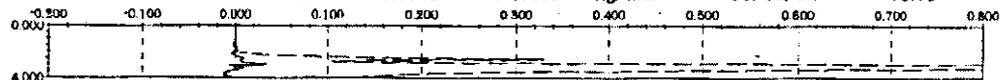
$$\text{Abs} = 0.000674 \text{Conc} + 0.005284$$

$$r = 0.9998$$

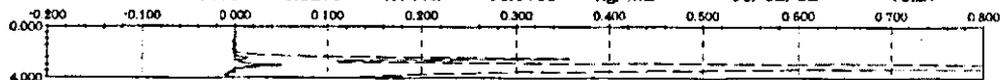
血清3 : UNK



濃度	吸光度	BKG	実濃度	実濃度単位	日付	時刻
111.6558	0.0482	1.8019	111.6558	ng/mL	05/02/02	15:19



濃度	吸光度	BKG	実濃度	実濃度単位	日付	時刻
63.6108	0.0279	1.1412	63.6108	ng/mL	05/02/02	15:21

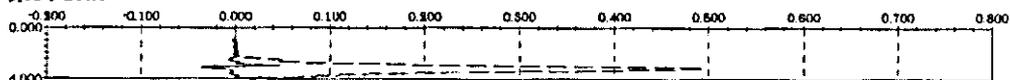


濃度	吸光度	BKG	実濃度	実濃度単位	日付	時刻
107.5615	0.0465	1.8213	107.5615	ng/mL	05/02/02	15:23

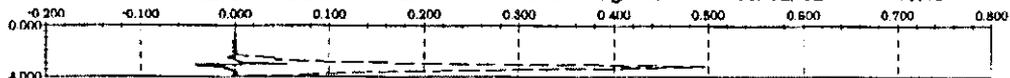
血清3 : UNK Average

濃度	吸光度	BKG	希釈率	実濃度	実濃度単位	%RSD
109.6087	0.0473	1.8116	1.00	109.6087	ng/mL	2.5767

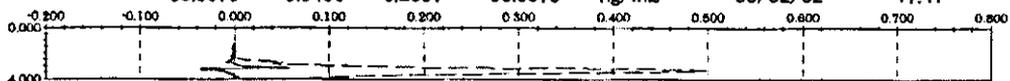
尿2 : UNK



濃度	吸光度	BKG	実濃度	実濃度単位	日付	時刻
54.8292	0.0423	0.2876	54.8292	ng/mL	05/02/02	17:45



濃度	吸光度	BKG	実濃度	実濃度単位	日付	時刻
65.6675	0.0496	0.2697	65.6675	ng/mL	05/02/02	17:47



濃度	吸光度	BKG	実濃度	実濃度単位	日付	時刻
69.8535	0.0524	0.2742	69.8535	ng/mL	05/02/02	17:49

尿2 : UNK Average

濃度	吸光度	BKG	希釈率	実濃度	実濃度単位	%RSD
67.7605	0.0510	0.2719	1.00	67.7605	ng/mL	3.9154

実際の測定 (一部) 上 (血清)、下 (尿)

DL-グルホシネートとグリホサートの分析

<前処理>

1. 尿検体は事前に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で 1/10 に希釈する。
2. 500 μ L の血清あるいは尿に 500 μ L のアセトンを添加し、ボルテックスミキサーで 2 分間混合する。1,200g で 3 分間遠心分離する。
3. 得られた上澄みの 50 μ L に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 200 μ L と、18mM (+)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate (FLEC) アセトン溶液 50 μ L を加えて混合する。
4. 混合溶液は 40 $^{\circ}$ C で 30min 加温して誘導体化を行った。
5. 誘導体化が終了した混合溶液に 500 μ L の酢酸エチルを加えて 3 分間、振りまぜ、過剰 (反応しきれなかった余分な) の FLEC を酢酸エチル層に抽出する。
6. そのあと酢酸エチル層 (上層) を慎重に取り除き、水層 (下層) の 2 μ L を HPLC に注入した。

<分析条件>

LC-10ADVP ポンプ、CTO-10ACVP カラムオープン、RF10AXL 蛍光検出器
SIL-10ADVP オートサンプラー、CLASS-VP 解析ソフト (以上島津製作所)

カラム: Inertsil ODS-2 (内径 4.6mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m、ジーエルサイエンス社製)

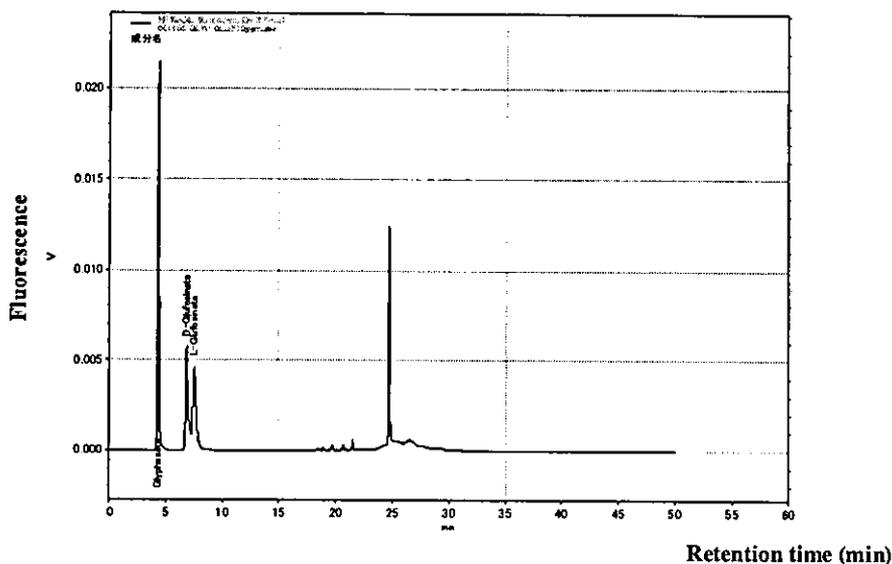
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相: アセトニトリル/10mM 酢酸アンモニウム (pH5.0) (23:77, v/v)

流速: 0.8mL/min

検出: 励起波長 260nm、蛍光波長 305nm

定量処理は、分析ソフト (Class VP; Shimadzu; Kyoto, Japan) を用い絶対検量線法によって行った。



DL-グルホシネートとグリホサート標準溶液のHPLCクロマトグラム

・DL-グルホシネートとグリホサートの濃度がそれぞれ10.0 $\mu\text{g/ml}$ となるよう調製した水溶液10 μl をHPLCに直接導入した。

***分析精度**

D-グルホシネートとL-グルホシネートの定量濃度範囲は0.01~100 $\mu\text{g/mL}$ 、S/N比を5としたときの検出下限は5 ng/mLであった。血清にDL-グルホシネートが0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるよう添加したときの平均回収率はD体が93.8%、RSD=3.7% (n=5)、L体が95.1%、RSD=3.6% (n=5)である。グルホシネート濃度はこのD体とL体の濃度を合計して算出した。

グリホサートの定量濃度範囲は0.01~100 $\mu\text{g/mL}$ 、S/N比を5としたときの検出下限は5 ng/mLであった。血清にグリホサートが0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるよう添加したときの平均回収率は95.1%、RSD=3.6% (n=5)である。

***文献**

J. Chromatogr. B **776**, 191-198, 2002.

4-O-methylpyridoxine の分析

<前処理>

1. 血清、尿の 0.1ml にアセトン 0.1ml を加えて混和し、遠心分離する。
2. 上澄みを 0.45 μm のフィルターに通して、その 10 μl を HPLC に導入する。

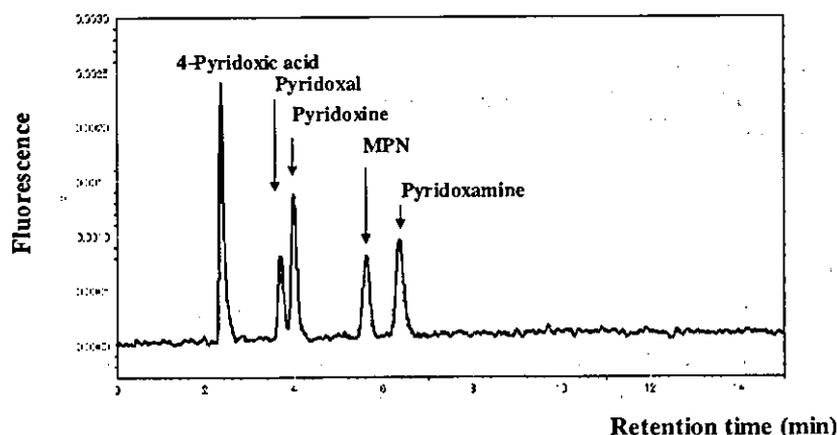
<分析条件>

機器：SCL-10AVP 高速液体クロマトグラフシステム+RF-10AXL 蛍光検出器（島津製作所）

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6mm \times 150mm, 5 μm particle size; GLサイエンス製)

移動相：0.1v/v% IPCC-MS3 水溶液/アセトニトリル 90/10

オープン：40 $^{\circ}\text{C}$ 検出：励起波長 290nm、蛍光波長 400nm



MPNおよびビタミンB6群標準溶液のHPLCクロマトグラム

- ・MPN、ビタミンB6群の濃度がそれぞれ0.01 $\mu\text{g/ml}$ となるよう調製した水溶液10 μl をHPLCに直接導入した。
- ・生体内に存在するビタミンB6群とMPNを良好に分離できる。

* 分析精度

定量分析は絶対検量線法で行った。検量線は 4-O-methylpyridoxine 濃度として 1~0.001 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内で良好な直線性を示し、検出下限は 0.0005 $\mu\text{g/ml}$ である。

血清に 4-O-methylpyridoxine 濃度が 1.0 $\mu\text{g/ml}$ となるよう添加したときの平均回収率は 99.1%、RSD=1.28% (n=5)、0.002 $\mu\text{g/ml}$ となるよう添加したときの平均回収率は 92.5%、RSD=7.09% (n=5) である。

* 文献

Biol. Pharm. Bull. 27, 486-491, 2004.

テトロドトキシンの分析

<前処理>

1. 血清、胃内容物は各 0.5ml、尿は 1 ml をそれぞれ、パスツールピペットにつめた 0.3ml の活性炭に供する（胃内容物は 1M NaOH で pH7 に合わせてから供し、他はそのまま供する）。
2. 活性炭を 0.7ml の水で洗い、1ml の AcOH-EtOH-H₂O (1:49:50) で溶出する。
3. 溶出液を約 40℃ で減圧濃縮する。
4. 乾燥後、50 μ l の 0.05 M AcOH に溶かし、Millipore Ultra free (30,000MW) を用いて限外濾過する。
5. 濾過物の 20 μ l を蛍光-HPLC に供する。

<分析条件>

蛍光 HPLC

カラム：4.6 i.d. x 250 mm Develosil C30 UG-5

移動相：aqueous acetonitrile 1 vol %, 30 mM ammonium heptafluorobutyrate and 10 mM ammonium formate (pH 5.0),

流速：0.4 ml/min

カラム温度：4℃

検出下限：18ng/ml

*文献

- Yasumoto, T., and Michishita, T. (1985) Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3077-3080.
- Yuki Shoji, Mari Yotsu-Yamashita, Teruo Miyazawa and Takeshi Yasumoto, Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetrodotoxin and its Analogs: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Tandem Mass Spectrometry, and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, 290 (1) 2001, 10-17.

研究成果の刊行に関する一覧表

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1)	波多野弥生、黒木由美子、吉岡敏治、他	化学物質リスク評価を目的としたヒト急性中毒症例データベースの構築－ヒト急性中毒症例収集統一フォーマットの作成－	中毒研究	18(1)	93-100	2005

平成16年度 厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業
『化学物質リスク評価における
ヒトデータの利用に関する研究』

研究報告書

発行 平成17年4月
発行者 主任研究者 杉本 侃
〔(財)日本中毒情報センター研究顧問、
大阪大学医学部名誉教授、(医)緑風会病院理事長〕
発行所 〒305-0005 茨城県つくば市天久保1-2
つくば総合健診センター内
財団法人 日本中毒情報センター
〔理事長 中田 義隆〕
TEL 029-856-3566
FAX 029-856-3533