

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

4. 高速液体クロマトグラフによる尿中フェニトロチオンの定量分析

<前処理>

- 1) 尿 100 μ l にシアノホス-メタノール溶液 (1 mg/ml) 5 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) 12,000-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、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-6A & SPD-6A
検出器 : 紫外可視検出器 (270 nm)
カラム : Nova-Pak C18 (15 cm x 3.9 mm, 4 μ m, Waters)
移動相 : アセトニトリル : 水 = 5 : 5
流速 : 1 ml/min
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

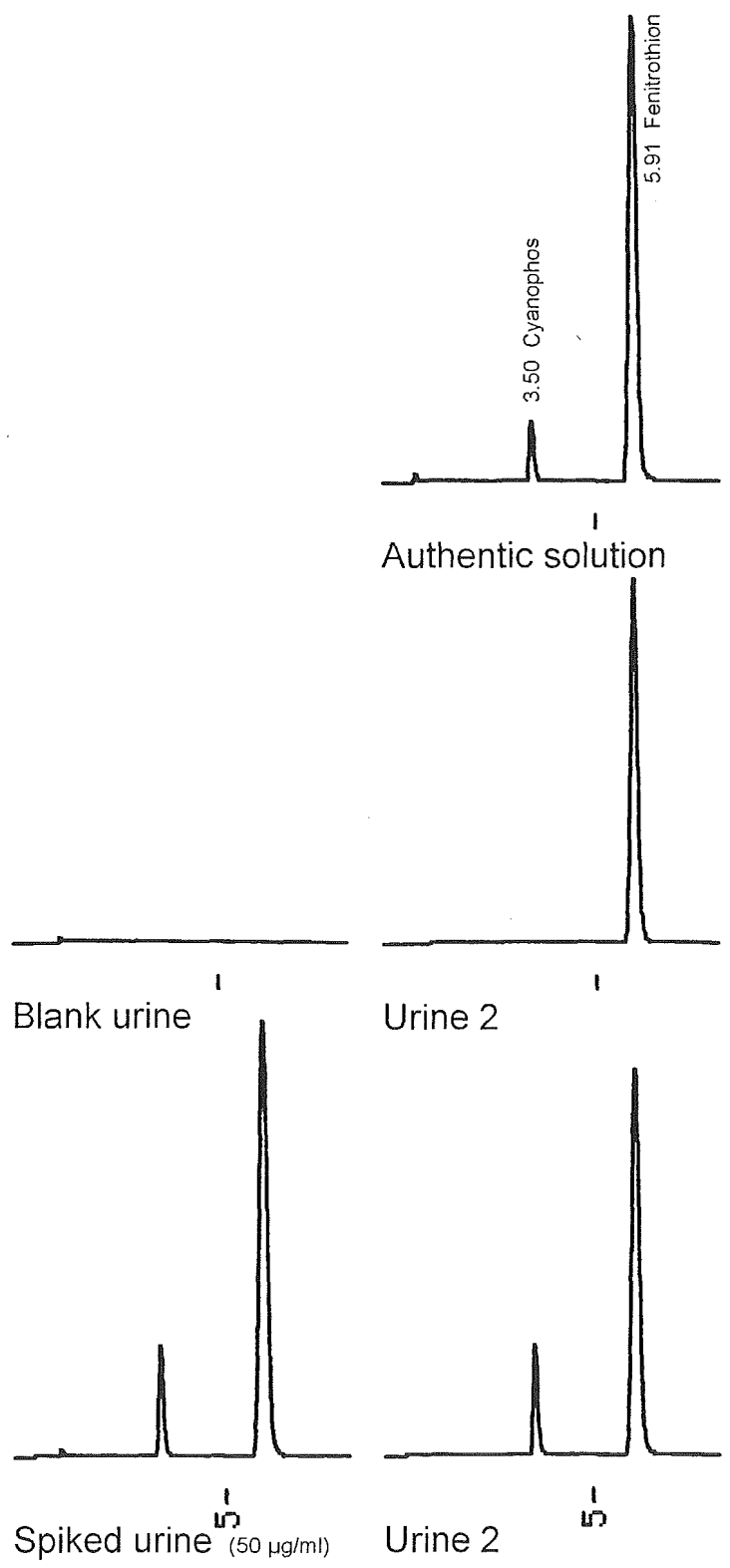


図2 尿と標準溶液、添加尿のクロマトグラム

【注解】

- 1) 有機リン系農薬でリン酸型のジクロルボスやオクソン体は血液中で急激に分解される。また、マラチオンやフェントエートのように構造中にカルボキシエステル結合を有すると分解されやすく、ディプテレックスも分解されやすい。これらの有機リン系農薬を正確に定量するためには、採血後直ちに抽出操作を行う必要がある。その他の有機リン系農薬も血液中で徐々に分解するので早めに分析することを勧める。
- 2) 有機リン系農薬はガスクロマトグラフ、高速液体クロマトグラフのいずれでも分析可能であるが、窒素リン検出器ではテーリングするため定量分析には適さない。
- 3) ジクロルボスは有機溶媒で抽出後、完全に濃縮乾固すると回収されないので、高速液体クロマトグラフで分析する際はアセトニトリル添加による除蛋白後の上清を直接分析する。
- 4) アセフェート、トリクロルホン、ジメトエートはヘキサンで抽出されにくいので、極性の高い溶媒で抽出する。

5. 高速液体クロマトグラフによる血清中アセトアミノフェンの定量分析

<前処理>

- 1) 血清 0.1ml に内部標準物質として 20 μ l の *o*-Acetoamidophenol 溶液 (0.1mg/ml) と 0.5ml の純水を添加し、ボルテックスミキサーで十分攪拌する。
- 2) あらかじめメタノールと水各 1ml 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 をアプライする。
- 3) 0.1N の塩酸 1ml でカラムを洗浄する。
- 4) メタノール 1ml で溶出する。
- 5) 窒素気流下でメタノールを蒸発乾固する。
- 6) 70 μ l の BSTFA+1%TMCS を添加する。
- 7) 80 $^{\circ}$ C、20 分間誘導体化する。
- 8) 1 μ l を GC-MS の試料とする。

<分析条件>

Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatograph/5971 Mass Selective Detector

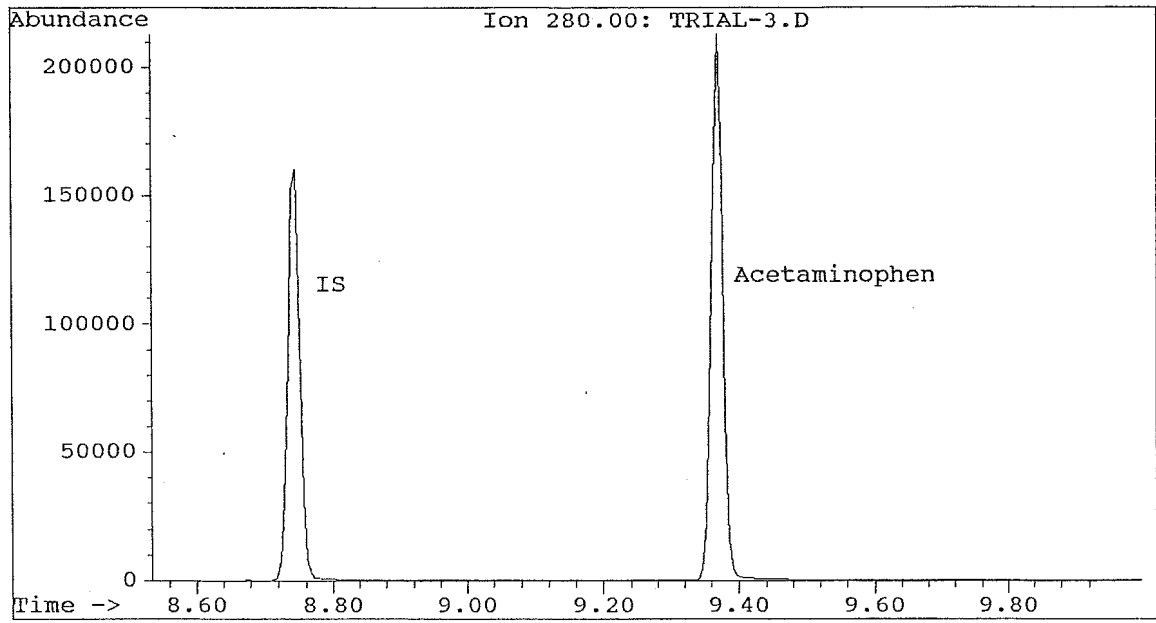
Column : HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness)

Injector Temp. : 250 $^{\circ}$ C

Oven Temp. : 100 $^{\circ}$ C (3 min) – 20 $^{\circ}$ C/min – 300 $^{\circ}$ C (3 min)

Monitor Ions : Acetaminophen; m/z 280, 206, 295

o-Acetoamidophenol; m/z 280, 295, 165



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

6. 高速液体クロマトグラフによる血清中アセトアミノフェンの定量分析

<前処理>

- 1) 血清 100 μ l に飽和塩化ナトリウム溶液 100 μ l と 2-アセトアミドフェノール (1 mg/ml) 10 μ l を加える。
- 2) 酢酸エチル 600 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 & SPD-10A
検出器	: 紫外可視検出器 (250 nm)
カラム	: Nova-Pak C18 (15 cm x 3.9 mm, 4 μ m, Waters)
移動相	: アセトニトリル : 20 mM リン酸 2 水素カリウム (pH 3.0) = 5 : 95
流速	: 1 ml/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C

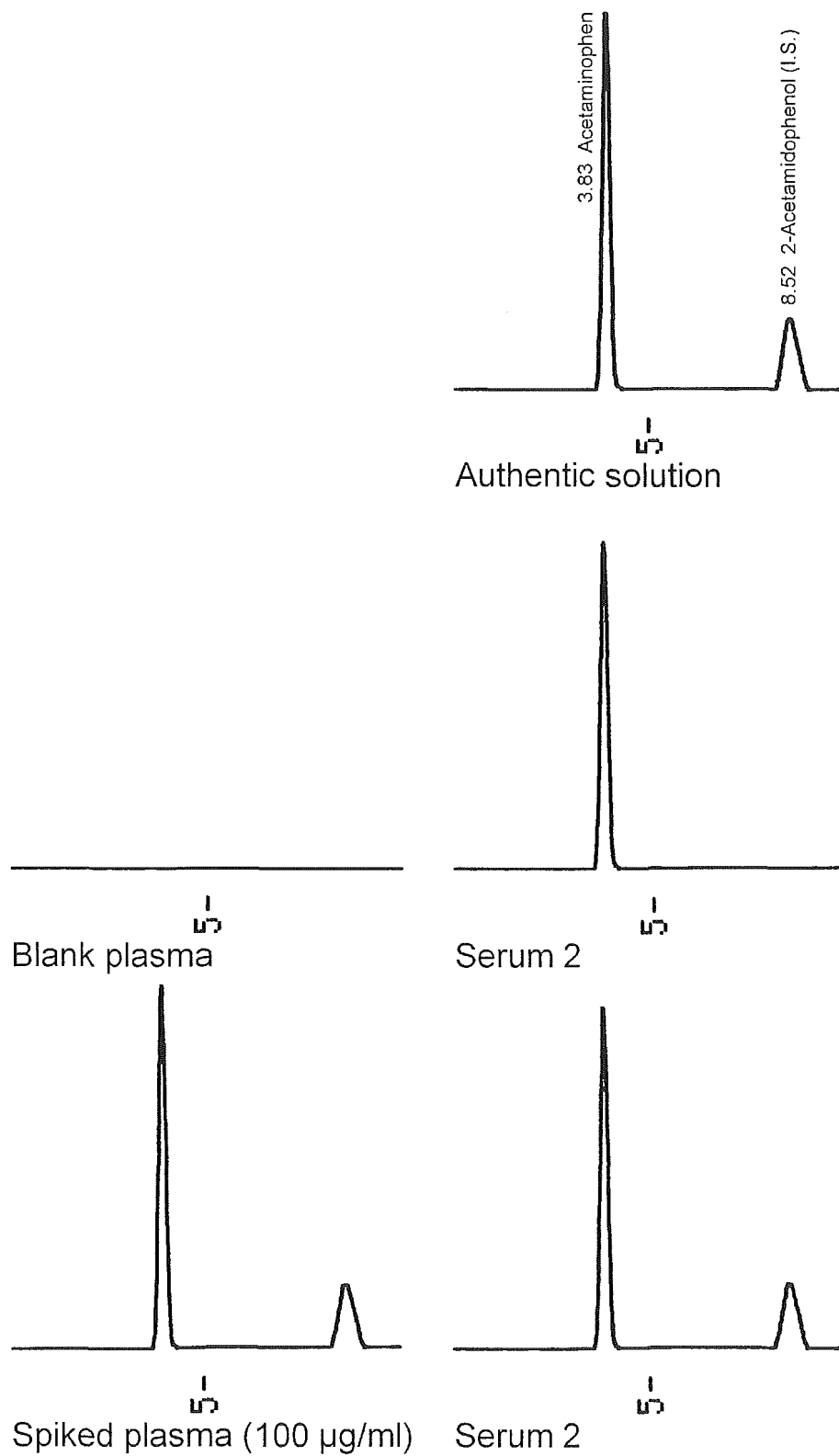


図3 試料と標準溶液、添加血漿のクロマトグラム

【注解】

- 1) アセトアミノフェンをガスクロマトグラフにて定量分析する場合、誘導体化して分析する必要がある。
- 2) アセトアミノフェンは酸性条件下で 245nm 付近に強い UV 吸収を持つので、高速液体クロマトグラフで感度良く分析することができる。
- 3) アセトアミノフェンは水溶性が高いため、飽和塩化ナトリウム溶液を加えることにより効率的に抽出できる。

参考資料 3

【同定・定量法】

起因物質の同定を行うには、前処理した後にそれぞれの単一成分に分離する必要がある。複数の成分を含む試料から同定が行えるように各々の成分に分けることを分離といい、この分離の手段としてクロマトグラフが用いられる。特殊な分析装置を使用しないで分析が行える方法として薄層クロマトグラフ(TLC)がある。この TLC は、高濃度の起因物質でないと見落とす可能性が高いため、注意が必要であるが、簡便で短時間で分析することが可能である。多くの研究室や検査室ではガスクロマトグラフ (GC) および高速液体クロマトグラフ (HPLC) が汎用機器の代表的なものであるが、分析する起因物質によって使用する分析機器を選択する必要がある。これらの分析法は、常に標準品と比較して分析する必要があるため、標準品を所持せずに未知物質を同定するには困難を要する。また昨今、汎用性を重視した分析機器も登場し、蛍光 X 線分析装置やプラズマ発光分析計など金属元素の分析を得意とする機器も配備されている。

次に分離された各々の起因物質が、どのような構造をしているのかを解析することになる。この構造解析する方法として、光学的分析法、磁気分析法、質量分析法などが利用される。これらの情報を総括した結果、起因物質の同定が可能となる。質量分析計(MS)を用いることにより、分子量や化合物に特徴的な情報が得られるため、必ずしも同定したい起因物質の標準品を持ち合わせていなくとも推定することが可能である。しかし、後の定量分析には標準品は不可欠であるため、可能な限り標準品を入手するよう努力したいものであるが、法律の問題もあり、入手できないものもある。

起因物質を同定した後に、その薬毒物が検査試料中にどの位の濃度存在しているか検査することが、定量分析である。定量を行うには、使用する機械ごとに起因物質の定量範囲を確認した後に定量する必要がある。つまり、所有する機器の精度を熟知し、常に機器の

維持管理していくことが重要である。また、精度管理上、内部標準法が多く採用されるが、内部標準物質の選択も重要である。基本的には前処理の工程で類似した挙動を示す化合物を選択する。MSを使用して定量する場合には、対象化合物の重水素ラベル体を内部標準物質として用いることが理想である。しかし、これらの化合物が全て入手できるとは限らないので、他の化合物で代用するなどの経験が必要となる。

【前処理方法】

尿や血液などの生体試料から起因物質を分析するときは、タンパク質などの妨害成分の除去、あるいは目的成分の濃縮などを行う必要がある。生体に取り込まれた微量の起因物質は、多量に存在する生体由来の成分に隠されて発見することは容易ではない。このような状況の中で起因物質を発見し正体を明らかにするには、分析の際に妨害を及ぼす生体成分を除外して起因物質を見やすくする必要がある。これを前処理という。

前処理には多くの方法が提唱されているが、揮発性化合物は気化平衡法が、難揮発性化合物には抽出法が用いられる。抽出法の中には、除タンパク法、液-液抽出法、固相抽出法があり、起因物質によっては水蒸気蒸留や灰化などを行い、目的成分の分析に適した方法を吟味して選択する必要がある。

除タンパク法は、試料中に酸や塩、有機溶剤を添加することによってタンパク質などの溶解度を減少させて固化させて除去させる方法である。分析に必要な試料量は少なく、操作も簡便であるが、生体成分との分離や回収率が芳しくないなどの欠点があり、また、未知成分の抽出法としては利用できない。

液-液抽出法は、試料（水）と混和しない溶剤を使用して、分配率（油と水のどちらに移行しやすいか）の違いによって生体由来の妨害成分と起因物質とを分離して抽出する方法である。酸性物質、アルカリ性物質、中性物質のように起因物質の性状別に抽出が行え、漏れのないように起因物質を抽出できることが最大の利点であることから、古くから複数

の起因物質を系統的に抽出する方法（Stas-Otto 法）として利用されている。未知物質の抽出には有効であるが、エマルジョンを形成して有機層と水層とが分離できないという最大の問題点がある。

固相抽出法は、シリカゲルなどの固体（固相）に起因物質を吸着させ、溶媒を流すことによって起因物質を固相から溶出させる方法である。溶出溶媒の極性を変えることによって、生体由来成分と起因物質を分離して溶出することが可能である。

次に生体成分から分離した起因物質を分析機器で測定できるようにする必要がある。起因物質といっても膨大な数があり、色々な性質を有している。これらを数種類の限られた機器で分析するには問題点が出てくる。例えば、GC で分析したいのだが熱に不安定であるとか、HPLC で紫外外部吸収を見たいのだが紫外外部に吸収を持たないなどである。このような場合、耐熱性の化合物へあるいは紫外外部に吸収を持つ化合物へと変換（誘導体化）、つまり分析に使用する機器にあった性質に変える必要がある。

最適な前処理法が不明な場合には、手間がかかるが、予め生体試料などに目的成分を添加し、予備的に生体成分との分離や回収率を検証する必要がある。