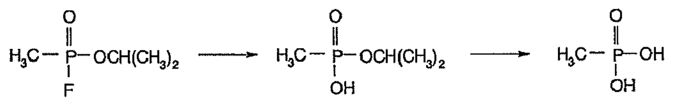
ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)によるサリン代謝物の分析法

東海大学医学部救命救急医学　斉藤　剛

1.　はじめに

サリンは 1994 年に松本サリン事件、1995 年に地下鉄サリン事件の発生で世界的に有名となった猛毒の化学兵器剤であるが、化学兵器剤として保存する場合、比較的安定性が高いとされている。一方、兵器として使用された後のサリンは化学的に不安定で容易に化学分解され、毒性の無いイソプロピルメチルホスホン酸(isopropylmethylphosphonic acid; IMPA)となり、更にメチルホスホン酸(methylphosphonic acid; MPA)へと分解される(下図)。これらは比較的安定であり、長期間検出することが可能である。従って、サリンが使用されたか否かを証明する場合、IMPA を検出すれば確実であろう。なお、MPA はソマン(soman)、VX など他の化学剤の分解によっても生ずる。



sarin　　　IMPA　　　MPA

2.　試薬と調整法

1M フッ化ナトリウム溶液:フッ化ナトリウム 4.1g を 100 mL の水で溶解して、0.45 μm のフィルターでろ過する。

3%アンモニアメタノール溶液:25%アンモニア水 12 mL をメタノール 88 mL で希釈する。

3.　操作手順

抽出方法

1)　Bond Elut SAX (500 mg/3 ml)をメタノール 2 mL、純水 2 mL、1M フッ化ナトリウム溶液 12 mL、純水 5 mL を順次通して活性化する。
2)　試料（尿）0.5 mL をカラムに通す。
3)　純水 3 mL で洗浄する。
4)　ネジ付き試験管中に 3%アンモニア/メタノール 5 mL で溶出する。
5)　溶出液を 60℃の加熱下、窒素気流下で乾固する。
6)　BSTFA+1%TMCS 50 μL、アセトニトリル 50 μL を加え、キャップ後に 80℃で 30 分間加熱して誘導体化する。
7)　冷却後、1 μL を GC-MS 試料とする。

4.　検量線作成方法

今回は絶対検量線法で各化合物を測定する。

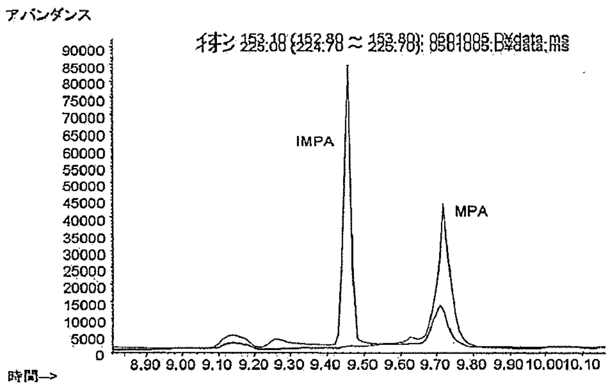
原著論文における検量線の直線範囲は IMPA 140－5600 ng/mL、MPA 700－5500 ng/mL であるので、この範囲内で 3 点以上の異なる濃度で作成する。

薬物陰性尿に IMPA と MPA の標準溶液を添加した試料を作り、上記と同様の抽出操作を行う。

GC-MS で分析後、各化合物のピーク面積と濃度から検量線を作成する。

5.　分析条件

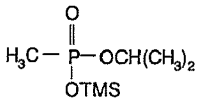
装置：Agilent 6890N ガスクロマトグラフ
　　　Agilent 5975B 質量検出器
カラム：HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness)
注入口温度：250℃
MS イオン源：230℃
MS 四重極温度：150℃
トランスファー温度：280℃
カラム温度：40℃ (3 min)－15℃/min－290℃ (1 min)
モニターイオン
　IMPA：m/z 153.1、195.1（保持時間　9.45 min）
　MPA ：m/z 225.1、240.1（保持時間　9.73 min）



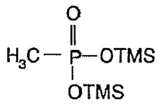
6. 注解

1) 　今回、GC-MS で使用したカラムは微極性カラムを用いたが、HP-1 などの無極性カラムでも可能である。また、カラムの長さを 15 m にしても分析は可能である。その際、保持時間は早まる。

2) 　誘導体化試薬は MTBSTFA を使用しても可能である。シリル化剤（TMS 試薬）は $-Si(CH_3)_3$ の構造を持ち各化合物は誘導体化後は下図のようになる。



IMPA-TMS



MPA-2TMS

3) 　保持時間(retention time)は分析条件が同じであっても、日によって異なることがある。

7. 参考文献

- 片岡美江子、瀬戸康雄．神経ガス分解物の固相抽出前処理法．鑑識科学，6(2)，117-127，2002.
- Mieko Kataoka, Yasuo Seto. Discriminative determination of alkyl methylphosphonates and methylphosphonate in blood plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry after tert.-butyldimethylsilylation. J Chromatogr B, 795, 123-132, 2003.

機器分析法

HPLC 法

高速液体クロマトグラフによるアセトアミノフェンの定性・定量分析

琉球大学医学部法医学分野　福家　千昭
近畿大学医学部救急医学　津田　紀子

1. はじめに

固相抽出カートリッジによる抽出と高速液体クロマトグラフによる生体試料中のアセトアミノフェンの定性・定量分析法について解説する.

2. 試薬と調整法

アセトアミノフェン標準品：アセトアミノフェン（SIGMA カタログ番号：A7085）
m-アセトアミドフェノール：特級（和光カタログ番号：328-45972）
メタノール：HPLC 用
アセトニトリル：HPLC 用
1 mol/L 塩酸：容量分析用
リン酸 2 水素カリウム：特級
リン酸：特級

<調整法>

1 mg/mL アセトアミノフェン標準溶液：アセトアミノフェン 10.0 mg を 10 mL のメスフラスコに計り採る. メタノールで 10 mL にする.

1 mg/mL m-アセトアミドフェノール内部標準溶液： m-アセトアミドフェノール 10.0 mg を 10 mL のメスフラスコに計り採る. メタノールで 10 mL にする.

0.1 mol/L 塩酸：1 mol/L 塩酸 10 mL を 100 mL のメスフラスコに採り, 水で 100 mL にする.

20 mM リン酸 2 水素カリウム緩衝液（pH 3.0）：リン酸 2 水素カリウム 2.72 g を 1 L のビーカーに入れ, 水 950 mL を加えて溶解する. リン酸を滴下し, pH を 3.0 に調整する. 1 L のメスフラスコに全量を移し, 少量に水でビーカーを濯ぎ, メスフラスコに合せる. 水で 1 L にする.

3. 操作手順

1) 試料 100 μL に 1 mg/mL m-アセトアミドフェノール内部標準溶液 10 μL と水 0.4 mL を加える.
2) ボルテックスミキサーで撹拌する.
3) 12000-g で 5 分間遠心分離する.
4) メタノール 1 mL, 水 1 mL でコンディショニングされた Oasis MCX カートリッジ（1 cc, Waters）に上清を注入する.
5) 0.1 mol/L 塩酸 1 mL でカートリッジを洗浄する.
6) カートリッジを空の遠心管に入れ, 2000-g で 10 秒間遠心して脱水する.
7) メタノール 1 mL で溶出する.
8) 溶出液を, 40℃ドライブロックヒーターを用い窒素ガスで乾固する.
9) 残渣を移動相 100 μL に溶解し, その 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入する.

4. 分析条件

装　置：Hitachi L-7100 形高速液体クロマトグラフシステム
検出器：紫外可視検出器（254 nm）
カラム：Hitachi GH-C18（III）（150 mm x 4.6 mm）
移動相：アセトニトリル：20 mM リン酸 2 水素カリウム緩衝液（pH 3.0）=1：9
流　速：1 mL/min
カラム温度：40 ℃

保持時間
アセトアミノフェン　　：4.0　分
m-アセトアミドフェノール：6.1　分

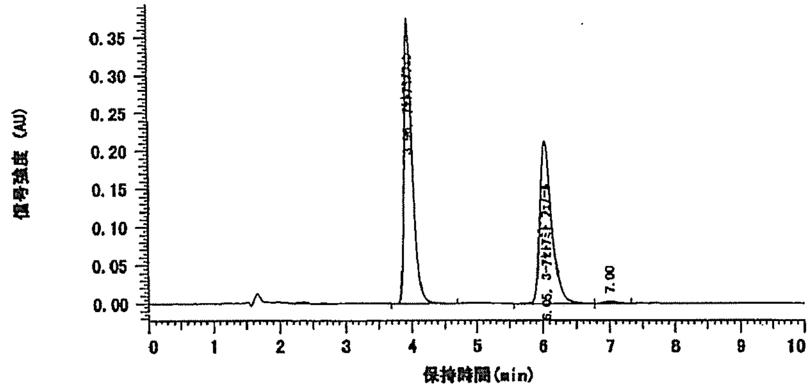


図1　アセトアミノフェン添加血清のクロマトグラム

5. 注解

1) アセトアミノフェンは酸性条件下で 245 nm 付近に強い UV 吸収を持ち, 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.
2) Hitachi GH-C18（III）カラムは逆相系の C18 カラムであるが, 同じカラムサイズの ODS 系も

しくはC18系カラムであれば，ほぼ同じ分析条件で分析することが可能である．ただし，保持時間は多少異なるので，アセトニトリル-リン酸緩衝液の混合比を調整する必要がある．

3) 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．

高速液体クロマトグラフによるフェニトロチオン定性・の定量分析

琉球大学医学部法医学分野　福家　千昭
近畿大学医学部救急医学　津田　紀子

1. はじめに

液-液抽出と高速液体クロマトグラフによる生体試料中のフェニトロチオンの定性・定量分析法について解説する．

2. 試薬と調整法

フェニトロチオン標準品：残留農薬試験用　MEP標準品（和光カタログ番号：132-05533）
シアノフォス標準品：残留農薬試験用　CYAP標準品（和光カタログ番号：039-08493）
メタノール：HPLC用
アセトニトリル：HPLC用
ヘキサン：特級

<調整法>

1 mg/mL フェニトロチオン標準用液：フェニトロチオン標準品10.0 mgを10 mLのメスフラスコに計り採る．メタノールで10 mLにする．

1 mg/mL シアノフォス内部標準用液：シアノフォス標準品10.0 mgを10 mLのメスフラスコに計り採る．メタノールで10 mLにする．

3. 操作手順

1) 試料100 μLに1 mg/mL シアノホス- メタノール溶液5 μLを加える．
2) ヘキサン500 μLを加え，ボルテックスミキサーで1分間撹拌する．
3) 12000-gで5分間遠心分離する．
4) 有機層を分取する．
5) 室温で窒素ガスで乾固する．
6) 移動相100 μLに溶解し，その20 μLを高速液体クロマトグラフに注入する．

4. 分析条件

装　置：Hitachi L-7100形高速液体クロマトグラフシステム
検出器：フォトダイオードアレイ検出器（200-271 nm，定量：270 nm）
カラム：Hitachi GH-C18（III）（150 mm x 4.6 mm）
移動相：アセトニトリル：水 = 55：45
流　速：1 mL/min
カラム温度：40 ℃

保持時間
シアノフォス　：4.6　分
フェニトロチオン：7.2　分

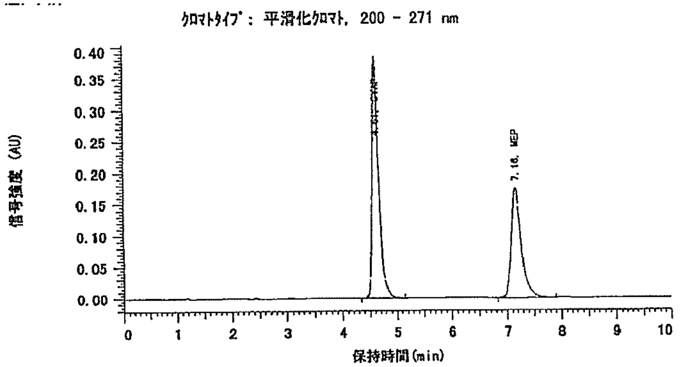


図2　フェニトロチオン添加尿のクロマトグラム（200－271 nm）

5.　注解

1)　Hitachi GH-C18（III）カラムは逆相系のC18カラムであるが，同じカラムサイズのODS系もしくはC18系カラムであれば，ほぼ同じ分析条件で分析することが可能である．ただし，保持時間は多少異なるので，アセトニトリル-水の混合比を調整する必要がある．

2)　通常，有機リン系農薬はヘキサンとの液-液抽出で有機層（ヘキサン層）に抽出される．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（酢酸エチルなど）で抽出する．

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)　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．

5)　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．

平成18年11月11日

毒劇物分析の実態調査について

和歌山での毒入りカレー事件以降、毒劇物の関与する事件・事故が頻発し、救急医療現場における迅速な毒劇物分析が重要視されています。また、化学物質等による災害対策マニュアルも整備され、健康危機に関する管理体制も構築されています。さらに、平成17年3月に制定された「国民の保護に関する基本指針」に基づき、武力攻撃事態等における避難に当たって国民が留意しておくべき事項として「武力攻撃やテロなどから身を守るために」も公開されております。

しかし、健康危機の発生を迅速に探知し対応するためには、これらの情報を迅速に収集できる体制を平常時から構築するとともに、その発生時の対応について予め定め、対応能力を高める必要があります。また、日頃から、原因究明に用いる科学的分析・調査ならびに緊急時における対応等に関する知識と資質の向上に努めるとともに、健康危機管理に関する知見を有し、その在り方について助言を得ることができる専門家との間の意思疎通等を日頃から図ることが望まれます。

その一環として、当研究室では、1999年より厚生労働省の指導のもと、救命救急センター等における毒劇物分析状況についての調査を行い、結果につきましては、すでに厚生労働省へ提出するとともに日本中毒学会などの学術学会にて報告させて頂きました。

さらなる毒劇物分析環境改善の資料とする目的で、本年も厚生労働科学研究費補助金のもとで毒劇物分析の実態調査を行います。本調査は、厚生労働省から機器配備を受けた施設のみを対象としているのではなく、全国の救命救急センターを対象としています。御多忙中、誠に申し訳ありませんが、御協力をお願いいたします。

本調査では、実際に配布する検査試料を使用して各施設で所有している機器およびキットを有効に活用し、検査試料中の化学物質（医薬品を含む）を推定・同定・定量して頂きます。使用する機器などに制限はなく、現状において貴施設で実施可能な範囲で行って下さい。

患 者 情 報

【症例1】

患　　者：23歳、女性

現 病 歴：×月×日夕刻、友人に付き添われて近医を受診したが、意識清明であったため、何の処置もなく帰宅した。帰宅2時間後に嘔吐、全身の倦怠感、発汗が続いたため、救急車にて救命救急センターに収容された。

入院時現症：意識レベルは清明で、血圧は120/59mmHg、脈拍80/min、呼吸19/minであった。

入院時検査所見：入院時の生化学検査では特記すべき異常は認められなかった。友人の話では、カロナールのPTPシートとトラベルミンの空きビンが転がっていたとのことである。

【症例2】

患　　者：60歳、男性（シロアリ駆除業者を経営）

現 病 歴：△月△日、部屋で倒れているところを家人に発見された。意識障害、嘔吐、下痢、頭痛を主訴に、救急車にて近くの救命救急センターへ搬入された。倒れていた患者の周辺には複数の褐色ビンが転がっていたとの情報が救急隊から寄せられた。

入院時現症：意識は清明で、血圧は130/74mmHg、脈拍85/min、両瞳孔径は1mmであった。唾液分泌は亢進し、胃洗浄液には石油臭がした。

入院時検査所見：入院時の生化学検査では血清コリンエステラーゼ活性値が39IU/L（正常値：200-400IU/L）と低値で、軽度の代謝性アシドーシスを認めた。また、第2病日より白血球の減少がみられた。

【症例3】

患　　者：21歳、男性

現 病 歴：8月某日朝、自室のベッドで倒れているところを救急隊に発見され、救急車にて病院へ搬入された。男性宅の窓は開いたままになっていた。

入院時現症：血圧は158/80mmHg、脈拍120/min、呼吸15/min、アセチルコリンエステラーゼ活性値（正常値：1.2～2.0IU/l）は0.1IU/l以下であった。

その他情報：付近の公園でサリンが散布されたとの情報があり、救急隊が調査を行っていた。

検査対象：試料中にはサリンはありません。代謝物を検査してください。

参考資料

生体試料中薬毒物の分析
－前処理－

1. はじめに

何の処理もせずに生体試料から薬毒物が検出できれば問題ないが、生体に取り込まれた微量の薬毒物は、多量に存在する生体成分に隠されて検出することは容易ではない。生体試料中の薬毒物を分析するには、以下のような目的から前処理が必要となる。

＊タンパクや脂質などの多量に存在する生体成分の除去
＊薬毒物の濃縮
＊分析機器や分離に悪影響を及ぼす成分の除去

この前処理には目的とする薬毒物の種類に応じて多くの手法がある。また、薬毒物の性質（熱安定性など）を改善し、各種機器で検出可能な構造に変換（誘導体化）する必要がある。ここでは全てを説明することは困難であるので、詳細については多くの総説や成書[1-4]を参考にして欲しい。

2. 抽出法

生体試料中の微量薬毒物を検出するには、多量に存在する生体成分の中から薬毒物を抽出・精製する必要があることを述べた。分析機器の進歩によって、厳密に生体成分と薬毒物とを分離せずにそのまま（あるいは希釈のみで）分析できる方法も報告されているが、あくまでも機器の性能でカバーされているのであり、機器の安定性や寿命を考慮すれば忠実に精製することが望まれる。しかし、抽出・精製には時間と手間を要することから、分析に十分な時間がかけられない救急医療の現場では、簡便に処理でき、かつ要求に応じた精度が保てる抽出・精製法を選択することになる。

生体試料から薬毒物を抽出するには、試料を酒石酸で酸性としアセトンやエタノールを用いる方法がある。また、無機成分を抽出するには、試料中の有機物を除去（分解）する必要があり、乾式灰化法や湿式灰化法がある。操作法の詳細は成書[3,6]が参考になる。ここでは主として有機化合物の抽出法について述べる。

1) 除タンパク法

生体試料中薬毒物の分析の妨害となるのはタンパク質や脂質成分である。これらを薬毒物と分離して抽出するには以下の方法がある。

(1) 限外濾過法

分子量の大きさによって分ける方法であり、タンパク質などの高分子化合物と

分離が可能である。分離したい分子量の大きさによって 30,000、10,000、5,000 など数種類が選択でき（Millipore, 東ソーなど）、試料量も少なくてすむ（～0.5ml）。しかし、内因性の中・低分子との分離は困難である。

(2) 沈殿法

検査試料に無機酸や溶剤を加えて生体成分（特にタンパク質）を変性させ、溶解度の差から析出したタンパク成分を遠心分離して除去する。使用される試薬としては、1) メタノールやアセトニトリルなどの有機溶剤、2) トリクロロ酢酸などの有機酸、3) 硫酸アンモニウムやタングステン酸などの無機塩が使用される。

本方法は、簡便かつ短時間で処理できることから、救急医療の現場では利用しやすい方法で定性分析には有用であると思われる。しかし、薬毒物の回収率や再現性に問題があるため、微量成分の分析や定量分析には不向きである。特にタンパクが固化する時点で薬物が沈殿物へ取り込まれて抽出できず、回収率の低下が危惧される。

(3) 透析法

半透膜の性質（低分子のみ通過する）を利用したものである。薬毒物の移動は、半透膜を境にした内液と外液とが平衡になったところで薬毒物の移動は終了するため、1回の操作で薬毒物を全量回収することは困難である。また、薬毒物の種類によっては平衡に達する時間がかかり、多数の試料を処理するには実用的ではない。

2) 気化平衡法

検査試料を密閉した容器（バイアル瓶など）に入れて加温し、試料中から気相部に気化した薬毒物を分析する方法であり、ガスクロマトグラフでの分析に利用される抽出法である。原理的には蒸気圧が高い薬毒物の分析に利用可能であるが、熱に不安定な化合物の分析には不向きである。本方法は、エタノールやトルエンなどのガス体の分析に用いられている [5]が、覚せい剤の分析に利用されている報告 [7]もある。

3) 液－液抽出法

薬毒物の多くは、水に溶けやすい（親水性）か油に溶けやすい（疎水性）という性質を持っている。薬毒物は疎水性で有機溶剤に溶けやすいが、タンパク質や脂質などの生体成分は親水性で水に溶けやすい。この性質の差（分配係数の差）を利用して生体成分から薬毒物を抽出する方法が液－液抽出法である。本方法には種々の変法が報告され、各々一長一短があるために最適な方法を提示することは困難であるが、参考に一例を図に示す [2]。

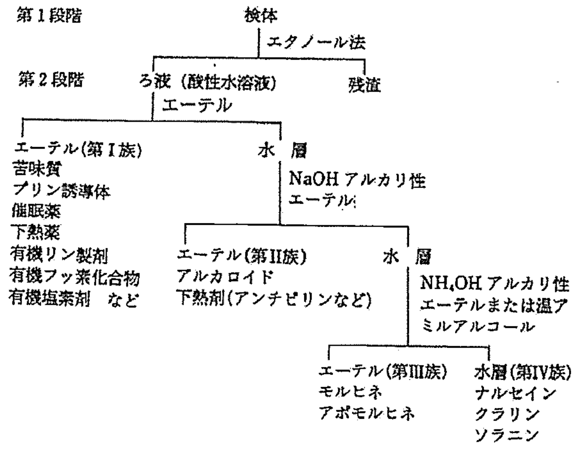


図 Stas-Otto 法による薬毒物分離法

（日本薬学会編：薬毒物化学試験法と注解（南山堂）より引用）

本方法の利点は、薬毒物の性質（酸性、中性、塩基性など）によって選択的に抽出できることである。過去の経験によって、どのような薬物がいずれの分画に移行するかが示されているので、未知の薬毒物の分析には有用である。しかし、全血などのタンパク質や脂質成分の多い試料を本方法によって抽出する場合、生体成分が乳化（エマルジョン形成）して有機層と水層とが分離できない欠点があり、多少のノウハウを必要とすることがある。

エマルジョン形成を危惧せずに操作できる方法として Extrelut があり、固相抽出と同様の操作で薬毒物を抽出できる。Extrelut は巨大細孔を有する珪藻土で、表面に水分を吸着・保持して液－液抽出を行い、水と混和しない有機溶剤を流すことによって薬物を溶出する。珪藻土自体が固体であるので固相抽出と思われがちであるが、抽出の機序は液－液抽出である。

4) 固相抽出法

薬毒物と生体成分のシリカゲルなどの充填剤（固相）に対する相互作用（アフィニティー）の違いを利用して薬毒物と生体成分を分離する方法である [8]。古くはシリカゲルなどの天然素材が利用されていたが、各種官能基を結合させたシリカベースの充填剤やポリマー素材が開発され、その選択範囲は飛躍的に増加した。また、使用前に充填剤を活性化させ、試料注入から洗浄・薬物溶出の一連の操作時に充填

剤を乾燥させない、など操作の煩雑さが指摘されていたが、活性化が不用な充填剤（abselut NEXUS, Varian）や、多少充填剤が乾燥しても精度に問題のない充填剤（OASIS, Waters）が開発され、使い易いものへと改良されている。さらに多数の検査試料の処理に合わせて、一度に96検体が処理できるプレートもある。

固相抽出後の溶出溶剤の濃縮は避けられない操作である。溶剤量が多くなるほど、また高沸点の溶剤を使用するほど濃縮に時間が掛かる。近年、薬毒物を薄膜（Empore Disk, スリーエム）に吸着させ、少量の溶剤で溶出できる製品も開発されている。

5) 固相マイクロ抽出法

固相マイクロ抽出（SPME）法は、マイクロシリンジの先端にコーティングされた薄膜に薬毒物を吸着させて抽出する方法である[9, 10]。吸着された薬毒物は、GCの注入口やHPLCのインターフェース、CEのキャピラリーカラム内で脱離させることによって、全吸着量を機器内に導入できる。薄膜への抽出方法として、ヘッドスペース法、直接浸漬法などがある。撹拌子の表面に薄膜をコーティングさせた製品（Twister, Gerstel）も販売されている。

3. 誘導体化

薬毒物分析を行う場合、化合物の性質（熱安定性など）を改善し、各種機器で検出可能な構造に変換する必要がある。例えば、pentafluorobenzyl基を結合させてECD（フッ素や塩素などが結合した有機ハロゲン化合物の選択的検出器）で検出できるように誘導体化したり、Dansyl基を結合させて蛍光検出器で検出できるようにする。また、質量分析計による検出において、特異的なフラグメントイオンが得られない場合、誘導体化によって高分子量側にフラグメントイオンを出現させることができる。

さらに、極性化合物に疎水性基を結合させて化合物の極性を抑え、有機溶剤で抽出できるように誘導体化することもある。以下に汎用されている誘導体化法をあげる。各誘導体化に用いられる試薬については、成書[11]や試薬メーカーのカタログ類が参考になる。

1) アルキル化（Alkylation）

薬毒物にメチル基などのアルキル基を結合させるもので tetrabutylammonium (TBA) や pentafluorobenzyl bromide (PFB-Br) などが使用される。アルキル化によって薬毒物の揮発性やクロマトグラフィーでの分離が改善できる。有機酸やサリチル酸、バルビツール酸類のGC分析の際に使用されている例がある。

2) アシル化（Acylation）

分子内に存在する極性基（アミノ基、水酸基、チオール基）の非特異的な吸着を抑えて、クロマトグラフィーにおける挙動を改善する。trifluoroacetyl chloride (TFA) や p-nitrobenzyl chloride などが使用される。使用する誘導体化剤によっては、無水条件で反応させるものもある。覚せい剤の分析には、カラムや注入口への吸着防止や高分子量側にフラグメントイオンを出現させる目的で TFA 化が行われる。しかし、誘導体の安定性や濃縮時の損失（気散）の問題点がある。

3) シリル化（Silylation）

水酸基などの水素供与基の双極子作用によって不揮発性となった化合物の揮発性を高める目的で行われる誘導体化である。また、特異的なフラグメントパターンが得られることから、構造解析に有用である。このシリル化は、モルヒネやコデインの分析に使用される。誘導体化せずに分析することも可能であるが、ピーク形状の改善や検出感度の向上などのために誘導体化する方法が一般的である。

4) エステル化（Esterification）

カルボン酸などの酸性薬物は極性が大きく、分析カラムとの非特異的な相互作用によりテーリングを起こしたり、分子間会合を起こして気化しにくい。この問題を解決するためにエステル化が行われる。エステル化試薬としては塩酸を含むアルコールやジアゾメタンが汎用される。ジアゾメタンはエステル化には最も良い試薬であるが、発癌性や爆発の危険性があることから、その使用には細心の注意が必要である。ジアゾメタンの代わりに安全なトリメチルシリルジアゾメタン（ヘキサン溶液、市販）を使用することもできる。

5) その他の誘導体化

その他の誘導体化として、1) 可視、紫外部吸収誘導体化、2) 蛍光誘導体化、3) 光学活性誘導体化などがある。それぞれアミノ基、カルボキシル基、水酸基に使用できる誘導体化試薬があるが、詳細は成書[9]を参考にして欲しい。

4. 文献

1) Muller R.K.(ed): Toxicological Analysis. Verlag Gesundheit GmbH, Germany, 1991, pp.52-90.
2) Brandenberger H.: Clinical Biochemistry Principles and Method. Walter de Gruyter, 1974: pp.1425-1467.
3) 日本薬学会編：薬毒物化学試験法と注解－第４版－、南山堂、1992、pp.27-38.
4) Mcdowall,R.D.: Sample preparation for biological analysis. J Chromatogr 1989: 492; 2-58.
5) Seto Y, Determination of volatile substances in biological samples by headspace gas chromatography. J Chromatogr A 1994: 674; 25-62.
6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解、金原出版、2000、pp.372-382.
7) Tsuchihashi H, Nakajima K, Nishikawa M, et al.: Determination of methamphetamine and amphetamine in urine by headspace gas chromatography/mass spectrometry. Anal Sci 1991: 7; 19-22.
8) Thurman E.M., Mills M.S.: Solid-Phase Extraction -Principles and Practice-. John Wiley & Sons, New York, 1998.
9) Pawliszyn J.: Solid Phase Microextraction -Theory and Practice-. Wiley-VCH, New York, 1997.
10) Pawliszyn J. (ed): Applications of Solid Phase Microextraction. The Royal Society of Chemistry, UK, 1999.
11) 中村洋監訳：分離分析のための誘導体化ハンドブック、2nd ed、丸善、1996.

生体試料中薬毒物の分析
－機器分析－

1. 薬毒物の確認

毒物の確認（同定）を行うには、前処理した後に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確認が行えるよう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ィーが用いられる。クロマトグラフィーには多くの手法がある。特殊な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ィー(Thin layer chromatography：TLC)がある。この TLC は、高濃度（一般的にはμg 以上）の毒物でないと見落とす可能性が高いために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）や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、分析する薬毒物によって使用する分析機器を選択する必要がある。明確な選択基準はないが、気体（ガス状）になる揮発性成分は GC で、気体にならない不揮発性成分は HPLC で分析することが基本である。また、無機成分は、原子吸光や蛍光Ｘ線分析計が利用可能である。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非常に困難である。

次に分離された各々の成分が、どのような顔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、薬毒物の確認が可能となる。確実に確認分析を行い、薬毒物を確定するには、質量分析計（MS）での情報が必要となる。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毒物の標準品を持ち合わせていなくとも薬毒物（有機化合物に限る）を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、入手困難な薬毒物もある。

2. 薬毒物の定量と評価

確認分析において薬毒物を確定した後に、その薬毒物が検査試料中にどの程度の量が存在しているかを検査することが、定量分析である。定量を行うには、使用する機械ごとに薬毒物の定量範囲を確認した後に定量する必要がある。定量するには、薬毒物の濃度とピーク高さや面積値（あるいは比率）の関係をグラフにした検量線を作製する必要がある。通常検量線は、横軸に検査試料中の薬毒物濃度を、縦軸にピーク高さや面積値（あるいは比率）をプロットする。検量線の作成には、絶対検量法、内部標準法、標準添加法が使用される。薬毒物分析においては、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、前処理工程で対象薬毒物と類似した挙動を示すような薬毒物を選択する。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望まれる。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、多少経験が必要となってくる。

生化学検査値を判断する場合は、正常値の範囲が定められているが、多くの薬毒物の正常値はなく、過去の文献値を参考にすることとなる。

Table 1 (*Continued*)

Drug	Therapeutic or normal		Toxic		Lethal	
	(mg%)	(µg/ml)	(mg%)	(µg/ml)	(mg%)	(µg/ml)
Imipramine (tofranil) (+met: desipramine)	0.015–0.025	0.15–0.25	-	-	-	-
Inderal (propranolol)	0.001–0.034	0.01–0.34	0.2	2	0.8–1.2	8–12
Indocin (indomethacin)	0.01–0.40	0.1–4	0.6	6	-	-
Indomethacin (indocin)	0.01–0.40	0.1–4	0.6	6	-	-
INH (isoniazid)	0.06–2.0	0.6–20	2–14.3	20–143	6.5–16.8	65–168
Invirase, fortovase (saquinavir)	0.011–0.11	0.11–1.1	-	-	-	-
Ionamin (phentermine)	0.009–0.051	0.09–0.51	-	-	0.15–0.76	1.5–7.6
Iron	0.027–0.293	0.27–2.93	0.28–2.5	2.8–25	2–5	20–50
Ismelin (guanethidine)	0.001	0.01	-	-	-	-
Isoflurane (forane)	2.0–7.0	20.0–70.0	-	-	-	-
Isoniazid (INH)	0.06–2.0	0.6–20	2–14.3	20–143	6.5–16.8	65–168
Isopropanol	-	-	>40	>400	>150	>1500
Isoptin (calan, verapamil)	0.0055–0.0355	0.055–0.355	0.09	0.9	0.09–8.5	0.9–85
Isordil (isosorbide dinitrate)	0.0008–0.0038	0.008–0.038	-	-	-	-
Isosorbide dinitrate (isordil)	0.0008–0.0038	0.008–0.038	-	-	-	-

（Forensic Science International, 122, 107-123, 2001 より）

化学剤関連化合物の分析

財団法人化学物質評価研究機構　花岡成行

1.　はじめに

近年、化学物質によるテロや災害に対する関心が高まっており、関連する分析機関においても化学剤の分析が要求される事態が発生するかもしれない。化学剤の検知・分析には現場検知とラボ分析があるが、現場検知は迅速な手段として有効であるものの、実際に現場検知が行われるのは事後であることが多く、機器の感度、選択性から誤報を出す可能性もある。また、分解物に対しては検知能力が低く、最終的には試料を採取し、ラボ分析を行う必要がある。国内ではこれらの化学剤分析を行える分析機関が非常に限られているものの、松本サリン事件や旧軍化学剤に係る神栖町井戸水汚染では地方の衛生研究所がそのきっかけとなる重要な役割を果たした。医療現場により近い分析機関において何ができるのかを認識することが各機関に求められる。

代表的な化学兵器剤を表 1 に示す。多種多様な化学兵器、化学剤が存在するが、化学剤の脅威としては、第一にサリンを始めとする神経剤が挙げられる。ここでは、化学剤及びその関連化合物の基本的な分析手法について紹介する。特に、サリンの分解物にターゲットを絞り、実際の分析における手順についても述べる。

2.　分析対象となる化学剤関連化合物

一般に化学剤は比較的短時間に分解するため、使用された痕跡が残りにくい。化学兵器の使用が疑われる場合には、試料形態に応じ、化学剤そのものだけではなく分解物や原料物質、製造時の副生成物を含む関連化合物全般についての分析が要求される。化学剤が検出されなくても検出された関連化合物から化学剤の存在を導き出すことができる。実際、オウム真理教によるサリン製造の検証においては、分解物のメチルホスホン酸(MPA)や中間分解物のイソプロピルメチルホスホナート（IMPA）がサリン製造の証拠となった。環境試料や生体試料からこのような加水分解物を分析する場合、直接ガスクロマトグラフィー（GC）分析できないため、誘導体化を行いその誘導体を GC/MS 分析するか液体クロマトグラフィー（LC）で分析することになる。代表的な神経剤の分解反応を図 1 に示す。

表 1　代表的な化学兵器剤の分類

神経剤	G 剤：サリン(GB)、ソマン(GD)、タブン(GA)、V 剤：VX
糜爛剤	硫黄マスタード(HD)、窒素マスタード(HN)、ルイサイト(L)
無能力化剤	3-キヌクリジニルベンジラート(BZ)
嘔吐剤(くしゃみ剤)	アダムサイト(DM)、ジフェニルクロロアルシン(DA)、ジフェニルシアノアルシン(DC)
催涙剤	2-クロロベンジリデンマロノニトリル(CS)、クロロアセトフェノン(CN)
窒息剤	ホスゲン(CG)、PFIB、クロロピクリン
血液剤	塩化シアン(CK)、シアン化水素(AC)

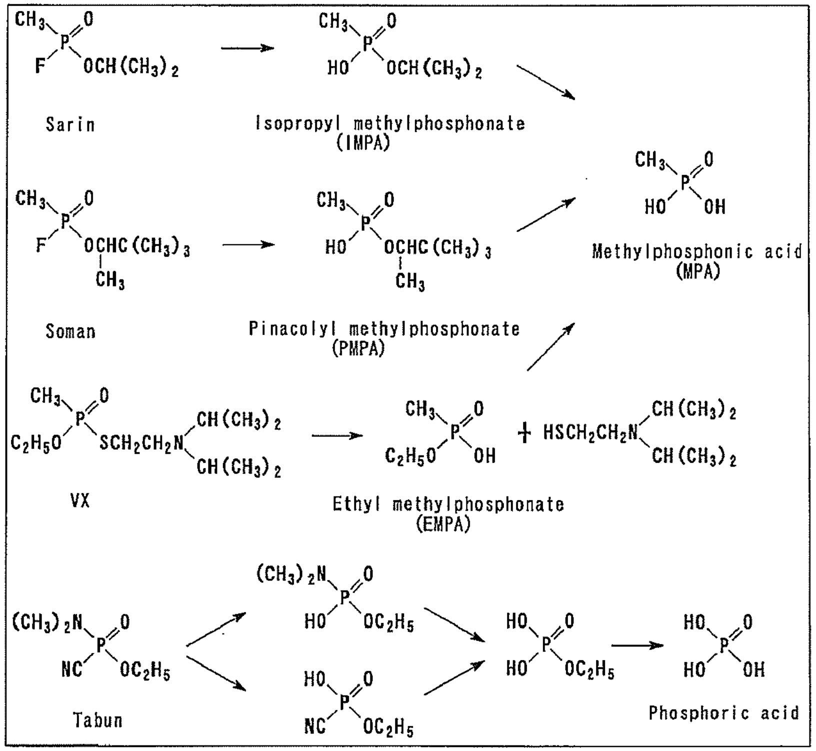


図 1　代表的な神経剤の分解反応

3.　分析方法

暴露、汚染の起因物質を特定するためには広範な化学剤及びその関連化合物を対象としたスクリーニング的な分析を行う。その方法としては表 2 に示すように 2 つの誘導体化法を含む 4 つの方法が挙げられる。図 2 に化学剤を特定するための分析ダイアグラムを示す。事前になんらかの情報があれば、試料形態、化学剤の特性を考慮した上で適切な方法を優先的に選択することができる。以下にその概要を述べる。

表 2　化学剤及びその関連化合物の分析法と対象物質

分析法	機器分析	対象物質	
		分　類	物質例
溶媒抽出法（固相抽出法）	GC/MS，GC/AED GC/FID，NPD，FPD	化学剤（神経剤、びらん剤）、中間前駆物質、副生成物	サリン, ソマン, タブン, VX, クロロサリン, マスタード, セスキマスタード, ジフェニルシアノアルシン, クロロアセトフェノン
抽出-シリル誘導体化法	GC/MS，GC/AED GC/NPD，FPD	神経剤及びマスタード類の分解生成物	MPA,IMPA チオジグリコール, トリエタノールアミン アルキルアミノアルコール
抽出-チオール誘導体化法	GC/MS GC/AED，ECD	有機ヒ素化学剤とその分解・前駆物質	ルイサイト, ジフェニルシアノアルシン, ジフェニルアルシン酸, フェニルアルソン酸
LC 分析法	LC-UV，LC/MS， LC/MS/MS LC-ICP-MS	化学剤分解生成物	チオジグリコー、ルジフェニルアルシン酸、フェニルアルソン酸、MPA

(1)　溶媒抽出

神経剤やびらん剤などの化学剤に加え非極性の関連化合物を有機溶媒により試料から抽出する。有機溶媒としてはジクロロメタンが一般的であるが、対象となる物質によってはヘキサン、トルエンなどが用いられる。また土壌、材料など固形試料からの極性物質の抽出にはこれらの非極性溶媒のほか水溶液やアセトン、アセトニトリルなどの極性溶媒も用いられる。

特定の化学剤やその分解物を微量レベルで分析する場合には、固相抽出法を適用することもできるが、物質によっては固相での分解・吸着等が懸念されるため未知の試料では溶媒抽出法を優先させる。水質試料では化学剤が残存している可能性は低いが土壌や素材試料（髪や被服を含む）では、汚染後時間が経過しても化学剤そのものが残存していることもあるため、化学剤や比較的分解が遅い関連化合物を抽出、GC 分析することができる。

(2) 誘導体化

1) シリル誘導体化法

サリンやマスタードガスは比較的容易に加水分解し、メチルホスホン酸やチオジグリコールが生成する。このような加水分解物は、一般には BSTFA (N,O-bis-(trimethyl- silyl) trifluoroacetamide) や MTBSTFA (methyl-N-tert (butyltrimrthylsilyl) trifluoroacetamide)を用いてシリル化を行い、GC 分析を行う。シリル化は化学剤全般の分解生成物の分析に適用される。また、シリル化の代わりにメチル化を行う場合もある。

2) チオール誘導体化法

ルイサイトやジフェニルシアノアルシンなどの有機ヒ素化学剤は加水分解、酸化分解を受けやすいため、そのものを分析することが難しい。加えて低濃度では GC 分析での感度が極端に悪いことから、高感度で GC 分析するためにはチオール試薬による誘導体化法が用いられる。これは、有機ヒ素化学剤を安定なヒ素と硫黄結合を有する誘導体化物にすることで高感度に GC 分析する方法である。チオール試薬としては、3,4-ジメルカプトトルエン(DMT)、1,2-エタンジチオールやブタンチオールなどのモノアルキルチオールが適用される。

(3) 機器分析（クロマト分析）

1) GC 分析

定性分析において GC/MS は不可欠であるが、高感度な選択的検出器としては化学剤全般のスクリーニング分析に有効でヒ素にも選択性の高い原子発光検出器（AED)、マスタードガスのような硫黄化合物では炎光光度検出器（FPD)、神経剤や窒素マスタードなどに高感度な窒素リン検出器（NPD）がある。これらの GC を用いることで検出されたピークの元素情報や n-アルカンを基準とするリテンションインデックス（保持指標：RI）より検出された化合物の絞り込みができる。

標準的な分析カラムとしては 5%フェニルメチルポリシロキサン系の微極性カラム（DB-5,DB-5MS,HP-5,HP-5MS,Ultra 2, CPSil8)が一般的に用いられる。また、分解物等の極性物質では 7%フェニル 7% シアノプロピルメチルポリシロキサン系の中極性カラム（DB-1701,OV-1701）が用いられることもある。

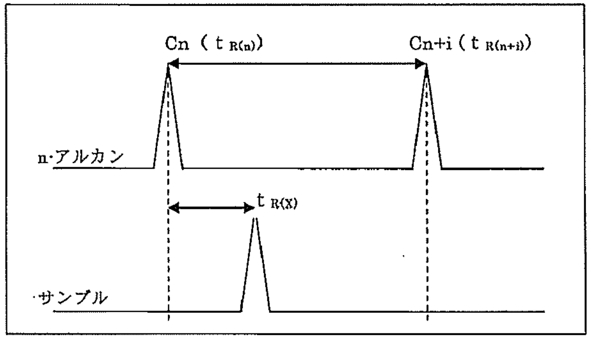
リテンションインデックス（保持指標：RI）の算出

GC における保持時間は分析条件や機器の日間変動により変動するため、これらの影響を受けない指標値としてリテンションインデックスが用いられる。化合物 X の RI は、その化合物および基準物質として用いる *n*-アルカンの保持時間から、次式で求められる。

$$RI=100\times C_n+100\times (C_{n+i}-C_n)\cdot\frac{t_{R(x)}-t_{R(n)}}{t_{R(n+i)}-t_{R(n)}}$$

ここで、

- C_n と C_{n+i} ：該当化合物の前後に溶出する n-アルカンの炭素数
- $t_{R(x)}$ ：該当化合物の保持時間
- $t_{R(n)}$ ：C_n の保持時間
- $t_{R(n+i)}$ ：C_{n+i} の保持時間



保持時間(ｔ)

分析対象化合物の RI 値を、既知の化合物の RI 値と比較することにより、その化合物を簡易的に定性することができる。化学兵器禁止条約における検証分析でも GC-選択的検出器を用いて RI 値から関連化合物を絞り込む方法（RIM ：Retention Index Monitoring）が活用されている[3]。同族体など同じ基本骨格の化学構造を多く有する化学剤関連化合物の分析では特に有効であり、マススペクトルと共に定性分析において化合物同定のための有力な情報となる。RI 値を照合する場合、分析カラムや GC 条件を同じにする必要がある。

2) GC/MS 分析

化学剤を特定するには、EI マススペクトルのデータベースライブラリーによる検索、RI の一致により行うが、さらに CI マススペクトルによる分子量の確認、標準物質がある場合には NMR スペクトル又は赤外スペクトルによる確認分析を行うことができる。このためにも化学剤関連化合物の充実した分析データベースが必要であるが、最新の NIST マススペクトルデータベースには主要な化学剤はもちろんその関連化合物も多数登録されており、スクリーニング的な定性分析が可能になった。しかし、実際にはすべての化学剤関連化合物がデータベース化されているわけではないためスペクトルの解析能力も求められる。一般的な化学兵器剤のスクリーニン

グに用いられる GC/MS 条件の一例を以下に示す。

分析条件	装　　置	：HP5973 MSD　Agilent Technologies 社製
	カ ラ ム	：DB-5(30m×0.32mm，膜厚 0.25μm)J&W 社製
	カラム温度	：40℃(6min)-10℃/min-280℃(5min)（分析時間：35 分）
	注入口温度	：250℃
	注 入 方 法	：スプリットレス(パージオンタイム 1.0min)
	キャリアガス	：ヘリウム　1.5ml/min　定流量モード
	イオン源温度	：250℃
	イオン化方法	：電子衝撃イオン化法(Pos)
	イオン化電圧	：70V
	測 定 方 法	：スキャン(レンジ：25～600m/z、速度：0.5s)

3）LC 分析

LC による質量分析は GC/MS 分析に比べ新しい技術であるが、近年化学剤分析にも積極的に使用されるようになった。例えば、2004 年に茨城県神栖町におけるジフェニルアルシン酸による地下水汚染がクローズアップされて以降、ジフェニルアルシン酸などのくしゃみ剤分解物を対象とした LC/MS/MS、LC-ICP-MS による高感度分析法が開発されている。LC-ICP-MS は有機ヒ素化合物に対して選択性も高く、高感度にこれらの化合物を分析することができる。こうした LC 分析は条件設定に充分な検討を要するが、誘導体化等の煩雑な操作なしに地下水中のジフェニルアルシン酸の高感度分析が行えるため、分解物の分析には非常に有効である。また、神経剤の分解物にも適用可能である。LC/MS/MS のイオン化法としてはエレクトロスプレーイオン化法（ESI）または大気圧イオン化法（APCI）が一般的であるが、ESI の方がより広範な化学剤関連化合物に適している。

（4）化学剤分析の実際

化学剤の分析を行うための設備、機器としては、ドラフト及び四重極型 GC/MS が最低必要になる。多くの分析機関がこうした設備、機器を有しているものの、実際には化学剤分析が行える機関は極めて限られている。化学テロ時の危機管理的な分析では早急な分析結果が求められ、必ずしも上述のようなスクリーニング分析から厳密な定性・定量分析に時間を掛けることができない。そのような場合には、ドラフトと GC/MS を用いて以下のようなことができる。

まず、現場から搬送された試料は化学剤が含有していることを前提に取扱い、ラボ内での二次汚染、暴露がないよう細心の注意を図らなければならない。試料はできるだけ速やかにジクロロメタン等の溶媒で抽出する。この抽出液を四重極型 GC/MS で分析を行い、検出されるピークの質量スペクトルを自動検索することで主要な化学剤を特定することができる。共雑物等の影響によりバックグラウンドが高い試料やクロマトグラム上に多数のピークが検出されるような場合には、疑われる化合物特有のイオンピークの質量数(m/z)でマスクロマトグラムを描かせ、RI 値より予想される保持時間に出現するピークについて質量スペクトルの自動検索を行うことで迅速な定性分析が行える。代表的な化学剤の特徴的イオンピークとしては、神経剤のサリンやソマンでは m/z＝99、VX では m/z=114、マスタードガスでは m/z=109 がベースピークとして挙げられる。

実試料から化学剤が検出される可能性は低く、実際には化学剤の分解物を分析することになる。その場合には試料を純水又はアルコールなどの極性溶媒で抽出し、それを直接 LC 分析又は濃縮乾固し、誘導体化を行い GC 分析する。この場合でも、現場検知や中毒症状から起因物質のおおよその推定ができていれば、分析する分解物を絞り込むことができる。例えば，神経剤の疑いが高い場合には、図 1 に示す分解過程よりメチルホスホン酸等が検出される可能性が高く、メチルホスホン酸のトリメチルシリル体の質量スペクトル（図 7 参照）より m/z=225 によるマスクロマトグラムと RI 値よりピークの絞込みが行える。

分解物や化学剤関連化合物が検出された場合には、そのオリジナルとなる中毒起因の化学剤を導き出すことが必要になる。そのためには、分析技術のみならず化学剤関連化合物のデータベースの整備、関連化合物の相互関係の情報、それらの物理化学特性など化学剤に関する包括的な知識が求められる。

現物又は環境試料から化学災害における物質の特定や被災者の生体試料から化学剤による暴露の痕跡を探す場合など、分析の目的、範囲に応じた分析対象物質、分析法を選択することになる。化学剤分析を行う場合、実剤標準物質を用いた充分な検討が必要であるが、実際には主要な化学剤の標準物質は国内法（化学兵器禁止法）の規制もあり、入手が困難である。しかし、それらの分解物については標準試薬として購入可能のものも多い。加えて、最近のマススペクトルデータベースの充実により適切なサンプリング、前処理、分析を実施していれば化学剤関連の特定にかかわる情報を得ることができる。その場合、試料形態、適用した手法（溶媒や前処理操作等)、化学剤の特性を踏まえて解析する必要がある。間違った物質を報告すること（フォルスポジティブ）や試料中に存在する痕跡を見逃すこと（フォルスネガティブ）を避けることは必要であるが、得られた結果から何がわかって何がわからないのかを理解、判断することが重要になる。最終的な物質の同定や精度の高い定量分析については専門機関に委ねるとして、より現場に近い分析機関では、分析により得られたデータからわかることを情報として最大限活用することが求められる。

4. 化学剤を含む試料の取り扱い

一般の試験、研究機関で化学剤そのものを取り扱うことはないものの、低濃度に化学剤が混入した土壌試料、分解物を含む水質試料や生体試料が突然持ち込まれる場合など化学剤の混入が疑われる試料の取扱い時には以下の点に注意する。

- 試料の開封以降の操作はすべてドラフトなどの中で行い、直接排気は避ける
- グローブ（ブチル、ビトン製又はニトリル製）を着用し、皮膚を露出しない。ラテックス製の薄い手袋を使用する場合は二重にして使用する
- 除染液（さらし粉、5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液、5-10%水酸化ナトリウム水溶液など）及び除染液を入れた汚染物の投入容器を準備する
- 器具装備は可能な限り使い捨てにし、使用後除染液に投入、数日間以上浸漬する
- スモールスケールで分析を行う

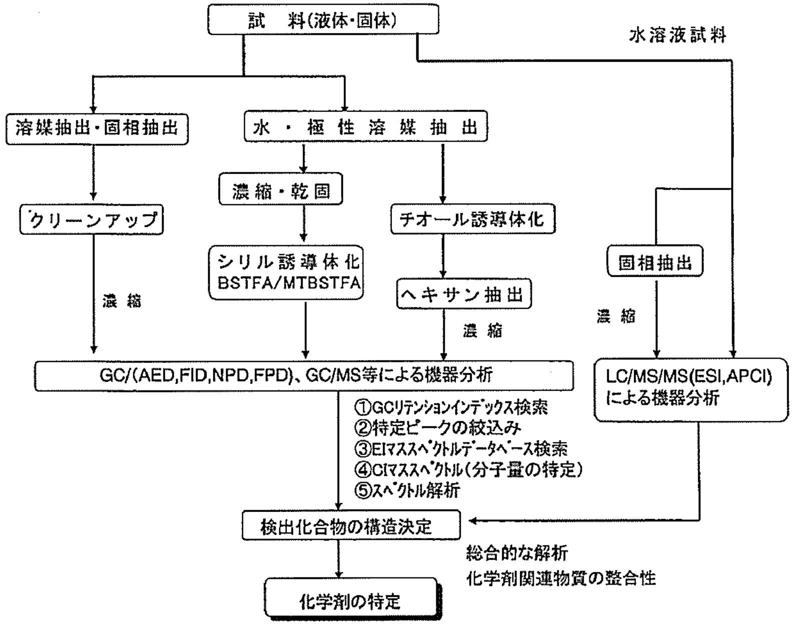


図 2　化学剤関連化合物の分析ダイアグラム

5. 尿中のメチルホスホン酸（MPA）及び O-イソプロピルメチルホスホネート（IMPA）の分析

固相抽出法（SPE）によるクリーンアップを適用した尿試料の MPA 及び IMPA の分析法について以下操作手順の例を示す。

<操作手順例>

1)　陰イオン交換カートリッジ（Bond Elut SAX cartridge, 500 mg/ 3mL, F- form）を 2 mL メタノール、3mL イオン交換水でコンディショニングする。
（これに、1 M フッ化ナトリウム水溶液 12 mL を通水、F-型に平衡化し、5 mL の水で洗浄する）

2)　これに、尿試料 0.5 mL を負荷、3%(v/v)水酸化アンモニウム（NH_4OH）／メタノール溶液 5ml で溶出する

3)　溶出液は遠心エバポレーター（60℃）等で濃縮し、最後は穏やかな窒素パージにより乾固させ、これにアセトニトリル 50 μL を加え充分に溶解、MTBSTFA または BSTFA 50 μL を加え、超音波照射により撹拌、60℃で 30 分[2)]（1 時間[1)]）反応させる。
誘導体化の反応式を図 3 に示す。シリル化を行う際には充分な乾固が必要であるが、乾固し過ぎた場合、目的物質を一部揮散消失してしまう可能性もある。

4)　反応後の試料溶液を GC/MS 又は GC/NPD、GC/FPD で分析する。

5)　対象物質の定性は GC/MS スキャン測定により得られたマススペクトルにより行う。また、可能であればクロマトグラムより RI 値を算出し、標準溶液の分析より得られた値または既知の値と照合する。

また、予め尿試料にアセトニトリルを加え、除タンパクしておき、SAX カートリッジに負荷後、3 mL 水、2 mL メタノールで SAX カートリッジを洗浄し、3%(v/v)水酸化アンモニウム（NH_4OH）／メタノール溶液 5mL で溶出するなどの操作が既報[1),2)]されている。

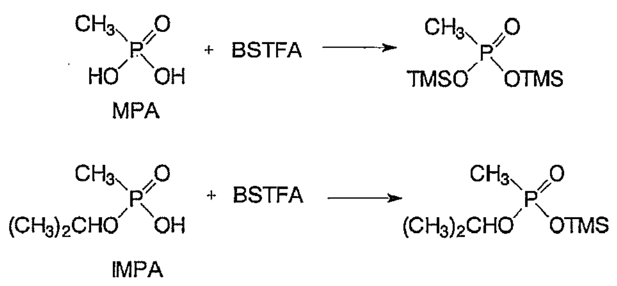


図 3　メチルホスホン酸（MPA）及び O-イソプロピルメチルホスホネート（IMPA）の BSTFA によるトリメチルシリル（TMS）誘導体化反応

シリル誘導体化後、試料を GC または GC/MS 分析することになる。その際に上述の RI 値を算出するために n-アルカン混合標準溶液を分析する。

MPA、IMPA の各誘導体の RI 値を表 3 に示す。

表 3　対象物質のリテンションインデックス（RI）値

対象物質	DB-5[1]	実側試料[2]（標準）	DB-1701[1]
MPA-(TMS)2	1148（1145）	1136（1134）	1270
IMPA-TMS	1108	1099	–
MPA-(TBDMS)2	1569	–	–
IMPA- TBDMS	1327	–	–

1）既知値[5]

2）実測値

神経剤の分析にはリンに高感度な選択的検出器である窒素リン検出器（NPD）、炎光光度検出器（FPD）または原子発光検出器（AED）を用い、RI 値から対象化合物を絞込みができるが、物質の定性には GC/MS 分析によるマススペクトルの照合を行う。

MPA 及び IMPA のいずれの誘導体も NIST ライブラリー（2002 version）に登録されているため GC/MS 分析で得られたマススペクトルをライブラリーサーチで検索を行えば定性が可能である。化学剤関連物質の RI 値はマススペクトルに比べ充実していないものの代表的な物質の RI 値が知られている[4),5)]。

尿試料を上記分析手順により GC/MS 分析した結果を図 4～6 に示す。ここでは、アセトニトリルによる除タンパク、フッ化ナトリウムによる固相の均衡化等の操作は行っていない。また、市販 NIST データベースに登録されている MPA 及び IMPA の TMS 誘導体及び MTDMS 誘導体の EI マススペクトルを図 7 に示す。

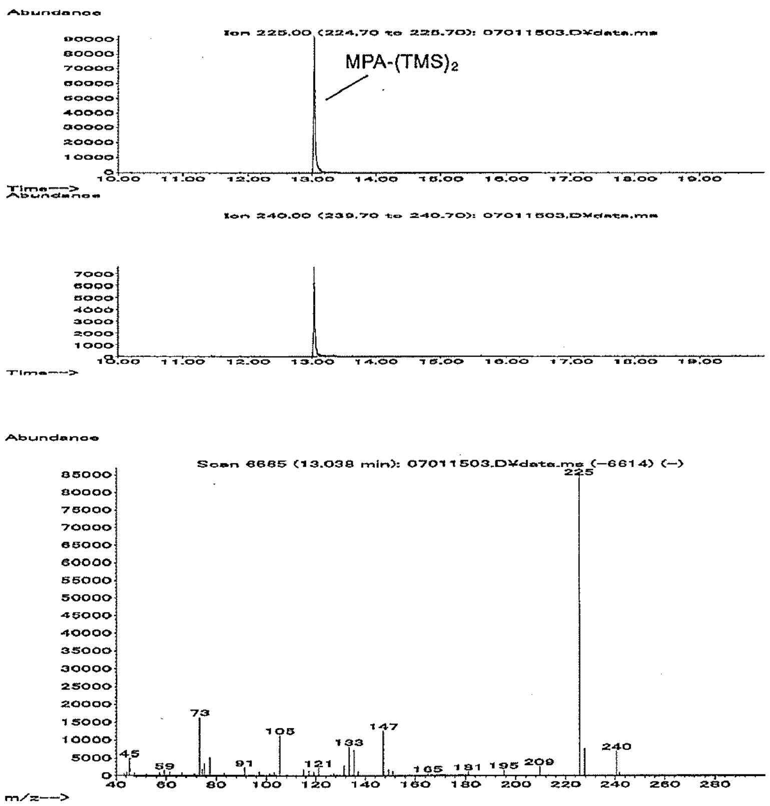


図 4　MPA-(TMS)$_2$ のマスクロマトグラム(m/z=225,240：上段)及び EI マススペクトル(下段)

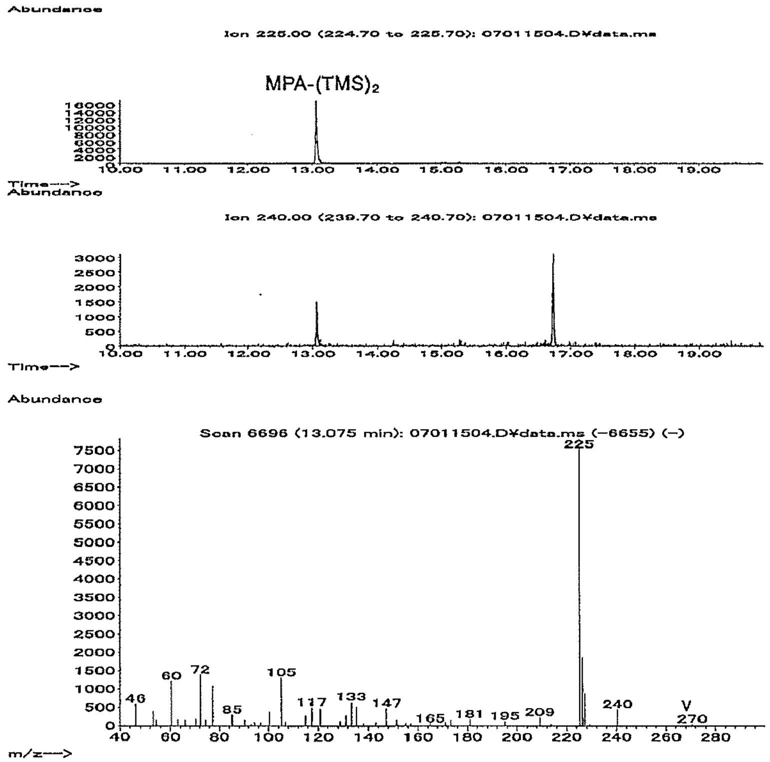


図 5　尿試料から検出された MPA-(TMS)$_2$ のマスクロマトグラム（m/z=225,240：上段）
及びマススペクトル（下段）
（m/z=270 などのバックグラウンドピークが検出されている）

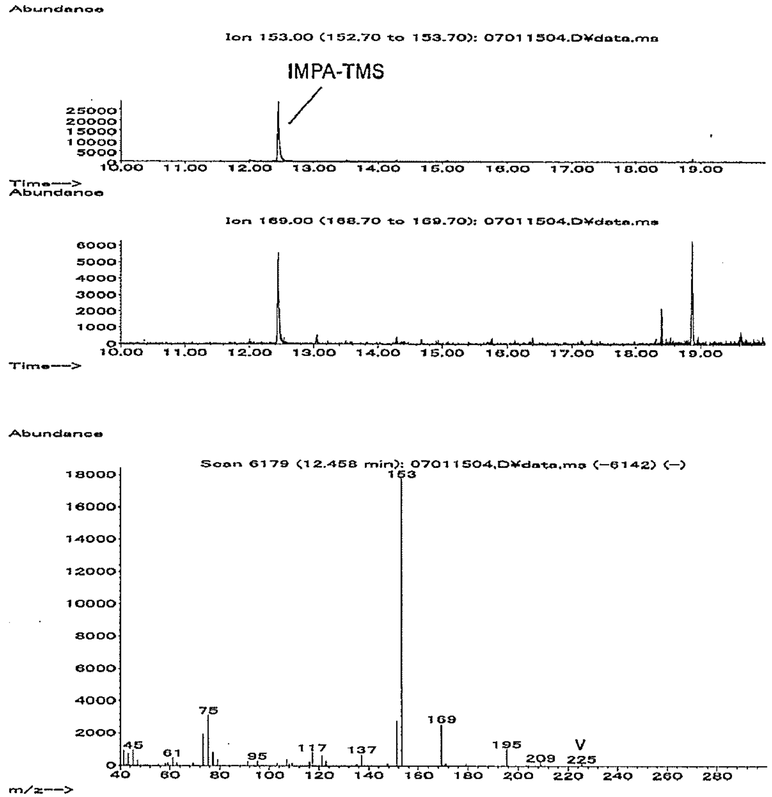


図 6　尿試料から検出された IMPA-TMS のマスクロマトグラム（m/z=153,169：上段）
及びマススペクトル（下段）
（m/z=225 などのバックグラウンドピークが検出されている）

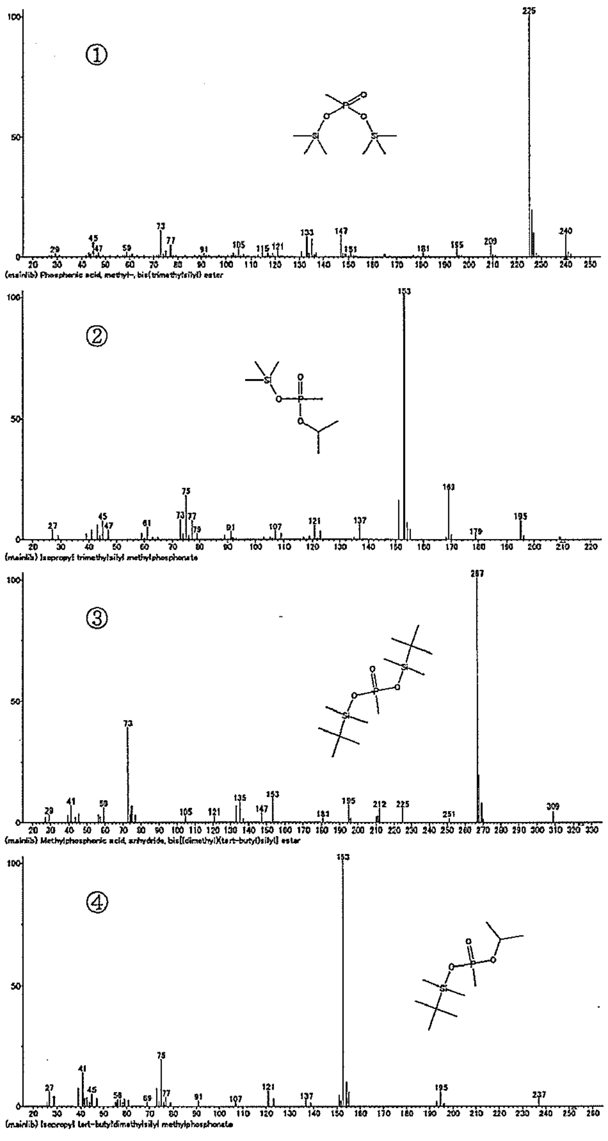


図 7　標準マススペクトル　①MPA-(TMS)₂，②IMPA-TMS，③MPA-(TBDMS)₂，④IMPA-TBDMS（Mass Spectral Libraries NIST (2002) Rev. D.04.00 より）

これらの誘導体の特徴的フラグメントイオンとしては以下のイオンが挙げられる。

誘導体	特徴的フラグメントイオン
MPA-$(TMS)_2$	① m/z=225 [M-CH_3]$^+$ ② m/z=240 [M]$^+$
IMPA-TMS	① m/z=153 [M- (isopropyl)-(metyl)+H]$^+$ ② m/z=195 [M-CH_3]$^+$ ③ m/z=169 [M-C_3H_5]$^+$
MPA-$(TBDMS)_2$	① m/z=267 [M- (tert.-butyl)+H]$^+$ ② m/z=309 [M-CH_3]$^+$
IMPA- TBDMS	① m/z=153 [M- (tert.-butyl)-(metyl)+H]$^+$ ② m/z=195 [M-C_4H_9]$^+$ ③ m/z=237 [M-CH_3]$^+$

下線はベースピーク

本試験では、対象物質の濃度設定が 5 μg/mL と高めであるが、マトリックス、誘導体化効率への影響により、充分な回収率で GC/MS によるスキャン測定ができない。このため、得られたマススペクトルに微小であるがバックグラウンドピークが出現されており、その結果ライブラリー検索によるマッチファクターが低くなる。上記の特徴的なイオンによるマスクロマトグラムによりバックグラウンドピークを識別、RI 値との照合により MPA 及び IMPA の定性を行うことができる。

より低濃度の試料を分析するためには、固相抽出を含むクリーンナップ条件の充分な事前検討が必要である。

6.　補足文献情報

神経剤の暴露に伴う生体試料の分析例として、血液サンプル中の変化していない神経剤の分析や血液及び尿中の低分子量加水分解物の分析例が報告されている。

暴露後数時間以内ならサリンなどの G 剤そのもの（VX では推定血漿中に暴露後 12 時間）が有機組織又は血液中から検出される可能性がある。

G 剤や V 剤は、通常大部分が、対応するアルキルメチルホスホン酸やわずかな量の MPA といった加水分解物に分解される。これらの化合物の分析法は GC/MS[9)-10)]や LC/MS[11)-13)]による。例えば、VX の加水分解物であるエチルメチルホスホン酸が VX による中毒患者から採取した漿液において誘導体化-GC/MS 分析により検出されている [14)]。また、血液や尿中のイソプロピルメチルホスホン酸の定量分析のための LC/MS/MS 法が開発されている [15)]。これらの加水分解物の分析は神経剤による暴露を決定するために有効であるが、数日間内で生物から加水分解物がかなり早く排出されることから暴露後時間がたった場合の検出には限界がある。

7. 出典、参照文献・資料

1) Kataoka M. and Seto Y.; Discriminative determination of alkyl methylphosphonates and methylphosphonate in blood plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry after tert.-butyldimethylsilylation, J. Chromatography B, 795, (2003) 123-132
2) 片岡美江子，瀬戸康雄、神経ガス分解物の固相抽出前処理法　鑑識科学，6(2)，117（2002）
3) OPCW, Preparation of samples on-site for GC/MS analysis Revision No.2 (2006)（非公開資料）
4) 必携－生物化学テロ対処ハンドブック，生物化学テロ災害対処研究会編　診断と治療社　pp12-24　pp 65-74（平成 15 年 11 月発刊）
5) 薬毒物分析実践ハンドブック，鈴木　修、屋敷幹雄編　じほう社　（平成 14 年発刊）pp60-77
6) 化学災害研修（薬毒物テロ対策セミナー）テキスト「化学剤の分析」（2005 年 12 月 8 日　杏林大学）
7) 花岡成行、THE CHEMICAL TIMES 関東化学工業㈱機関紙（2004）No.4（通巻 194 号）pp11-16
8) 瀬戸康雄、井浦一光、金森美江子、化学兵器用剤のガスクロマトグラフィー質量分析、法科学技術，10（1），49-61(2005)
9) Black,R.M.,Clarke,R.J.,Read,R.W.,and Reid,M.T.J. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples,found to contain residues of the nerve agent sarin,sulfur mustard and their degradation products.J.Chromatogr. A622, (1994) 301-321.
10) Fredriksson,s.-Å.,Hammarström,L.-G.,Henriksson,L.,and Lakso,H.-Å. Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biolobical samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry.J.Mass Spectrom.30,(1995) 1133-1143.
11) Tørnes,J.A. Identification of some alkyl methylphosphonic acids by thermospray tandem mass spectrometry.Rapid.Commun.Mass Spectrom.10, (1996) 878-882.
12) Black,R.M.,and Read,R.W Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry,and tandem mass spectrometry,to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents. J.Chromatogr.A, 759, (1997) 79-92.
13) Black,R.M.,and Read,R.W. Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation. J.Chromatogr.A, 794, (1998) 233-244.
14) Tsuchihashi,H.,Katagi,M.,Nishikawa,M.,and Tatsuno,M. Identification of metabolites of nerve agent VX in serum collected form a victim.J.Anal.Toxicol.22, (1998) 383-388
15) Noort,D.,Hulst,A.G.,Platenburg,D.H.J.M.,Polhuijs,M.,and Benschop,H.P. Quantitative analysis of o-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin:estimation of internal dosage. Arch.Toxicol.72, (1998) 671-675.

Ⅲ　研究成果の刊行に関する一覧表