

症例 2

救命救急センターへ搬送前の主訴と、第 2 病日に白血球減少が認められたことから、ヒ素中毒が考えられる。そこで、ヒ素のスクリーニングを行った。

【検査方法】

錆のない 1 辺約 1 cm の銅板をネジ付試験管に入れた後、銅板が試料に完全に浸るまで試料を加えた。次いで、塩酸を数滴加えキャップで密栓した。この試験管をヒートブロックで加熱した後、銅板を確認したところ、辺縁が黒く変色（ヒ化銅）していたことから、ヒ素が含まれている可能性を確認した。

注意

上記の反応はラインシュ反応であるが、ヒ素以外にもアンチモン、水銀に対しても陽性反応を示すため、あくまでも予備試験である。検出感度は 1 μ g である。

蛍光 X 線による分析

蛍光 X 線用のサークルろ紙に試料を十分量浸み込ませた後、試料を乾燥させた。その後、蛍光 X 線分析装置（EDX-700、島津製作所）でろ紙の分析を行ったがヒ素は検出されなかった。

参考

ここで用いた装置は試料（ろ紙）中にヒ素が絶対量として 5 mg 以上存在しないと検出されない。従って、本試料中のヒ素は 5 mg 以下と考えられる。

症例 3

症例はコリンエステラーゼの活性低下が認められたことから有機リン中毒と考えられた。そこで、有機リンの定性試験（有機リン定性キット）を行ったが陰性であった。

症例の情報に、試料中には親化合物は含まれていないということから、GC-MS を用いて有機リンの代謝物のスクリーニングを行ったが特別な化合物は検出されなかった。次に、症例の情報に有毒物質が散布された後に発症していることからサリン代謝物の分析を行った。

サリン代謝物の分析。

【抽出方法】

1. ネジ付試験管に試料 0.5 mL、0.05 N 塩酸 1 mL、MPA-d3 を内部標準物質として 300 ng 加えた後に十分ボルテックスした。
2. 抽出溶媒としてエーテル-ジクロロメタン（4 : 1）5 mL を加えキャップで密栓した。
3. 震盪、遠心分離後に抽出溶媒を新たな試験管に移した。
4. 抽出溶媒に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した。
5. 抽出溶媒を新たなネジ付試験管に移し、45°C の加熱下、窒素気流下で乾固した。
6. BSTFA+1%TMCS 50 μ L、アセトニトリル 50 μ L を加え、キャップ後に 80°C で 30 分間加熱して誘導体化した。
7. 冷却後、1 μ L を GC-MS 試料とした。

検量線は薬物陰性尿に 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い作成した。直線範囲は IMPA、MPA 共に 100–2500 ng/ml であった。

【GC-MS 条件】

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 μ m film thickness)

注入口温度：250°C

MS イオン源：230°C

MS 四重極温度：150°C

トランスファー温度：280°C

カラム温度：40°C (3 min)–15°C/min–290°C (1 min)

モニターイオン

IMPA : m/z 153.1, 195.1 (保持時間 9.18 min)

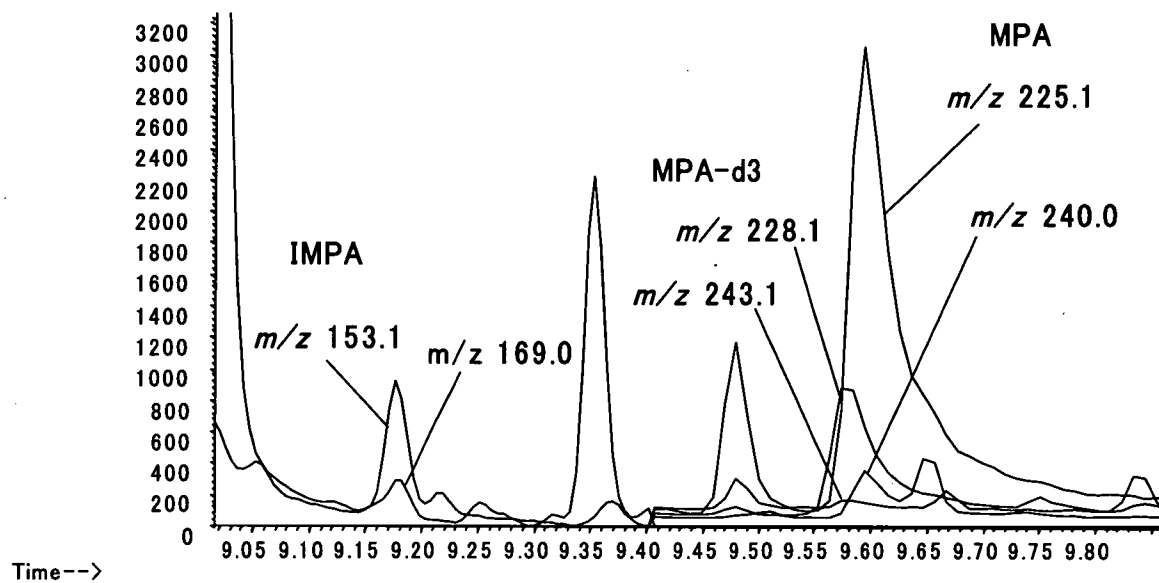
MPA : m/z 225.1, 240.1 (保持時間 9.61 min)

MPA-d3 : m/z 228.1, 243.1 (保持時間 9.58 min)

【定量結果】

MPA 4.6 μ g/mL

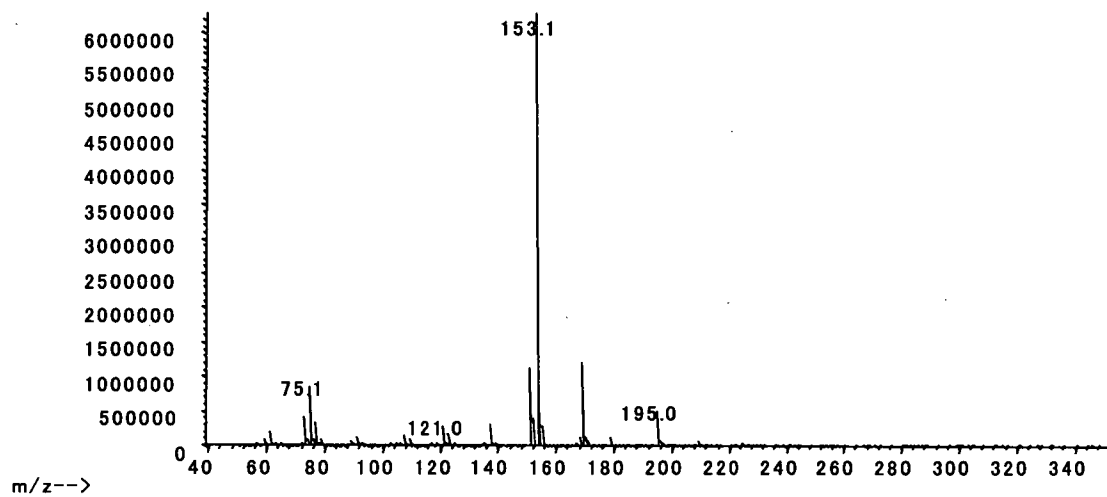
Abundance



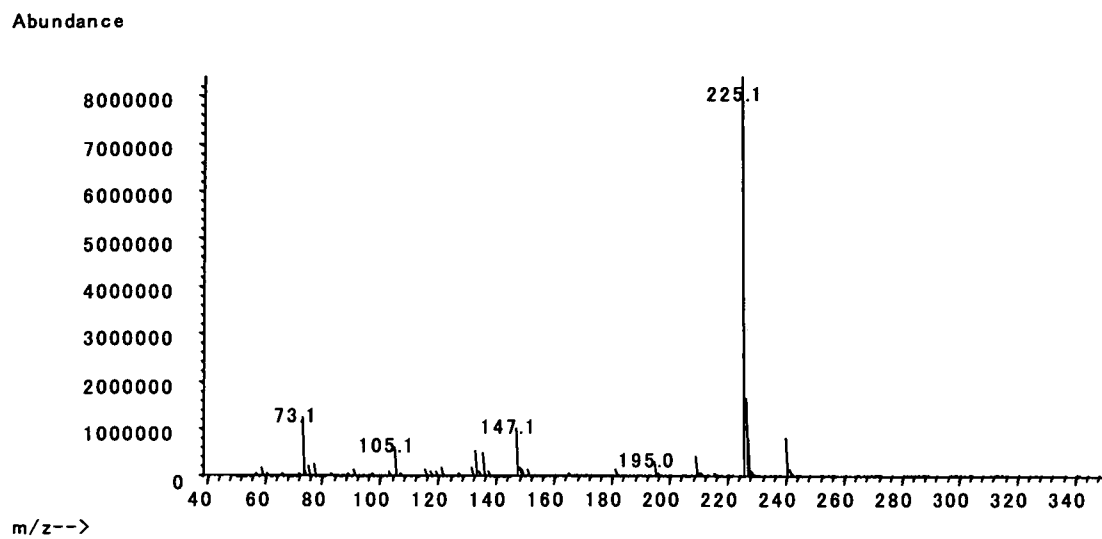
【資料】

IMPA のマスフラグメント

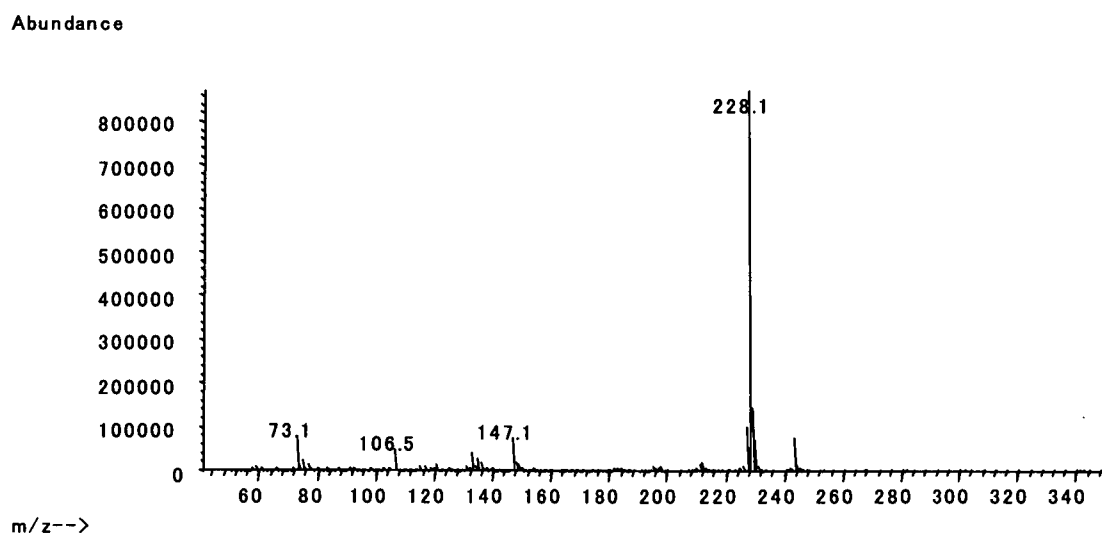
Abundance



MPA のマスフラグメント



MPA-d3 のマスフラグメント



サリン代謝物分析法の検討

—分析マニュアル原案作成の予備検討—

斉藤 剛

東海大学医学部専門診療学系救命救急医学

福家千昭

琉球大学大学院医学研究科法医科学分野

西田まなみ、奈女良 昭

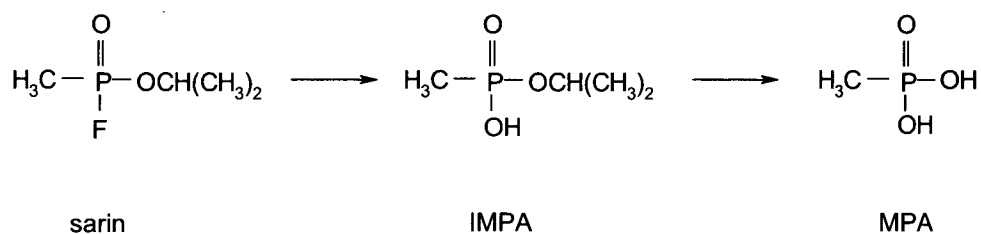
広島大学大学院医歯薬学総合研究科法医学

尿中サリン代謝物の分析

【はじめに】

1994年に発生した松本サリン事件、翌1995年に発生した地下鉄サリン事件でサリンの猛毒性が知られるようになった。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。

今回、サリン中毒が発生した場合、中毒患者から得られた尿を試料とし、尿中MIPAとMPAを分析する方法の検討を行った。分析はガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)とキャピラリー電気泳動(CE)した。以下にMIPAとMPAの構造式を示す。



1. GC-MS による尿中サリン分解物の分析

MIPA と MPA を GC-MS で分析を行う際の分析条件を設定した。MIPA と MPA の構造から GC-MS で分析を行うためには、シリル化による誘導体化が不可欠である。そこで、一般的にシリル化剤として用いられている BSTFA+1%TMCS を用いて誘導体化を行い、GC-MS のスキャンモードで分析を行った。以下に GC-MS 条件と MIPA と MPA のマスフラグメントを示す。

【GC-MS 条件】

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 μ m film thickness)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

MS イオン源：230 $^{\circ}$ C

MS 四重極温度：150 $^{\circ}$ C

トランスファー温度：280 $^{\circ}$ C

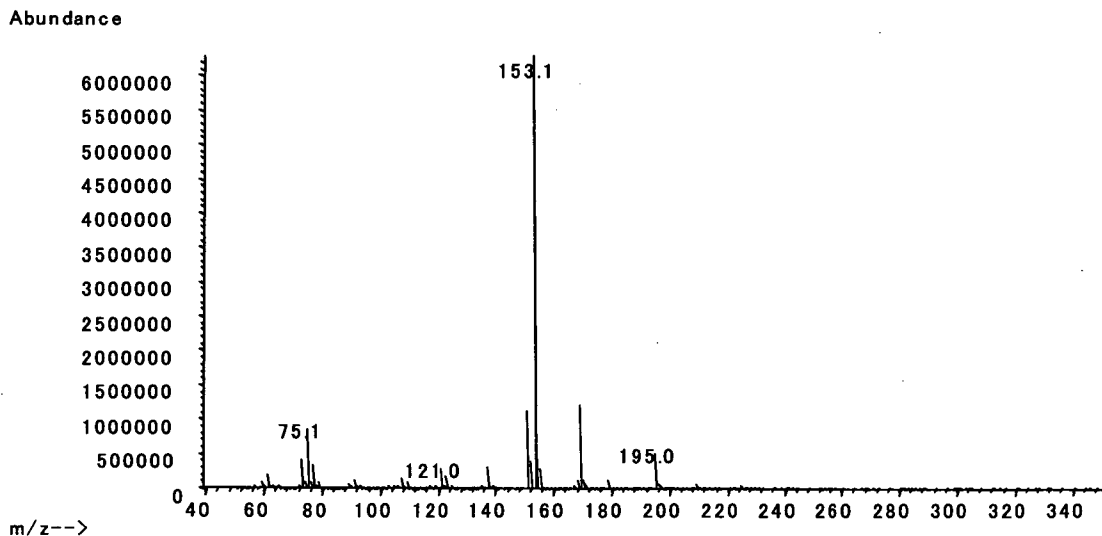
カラム温度：40 $^{\circ}$ C (3 min) - 15 $^{\circ}$ C/min - 290 $^{\circ}$ C (1 min)

IMPA: m/z 153.1, 169.1, 195.1

MPA: m/z 225.1, 240.1

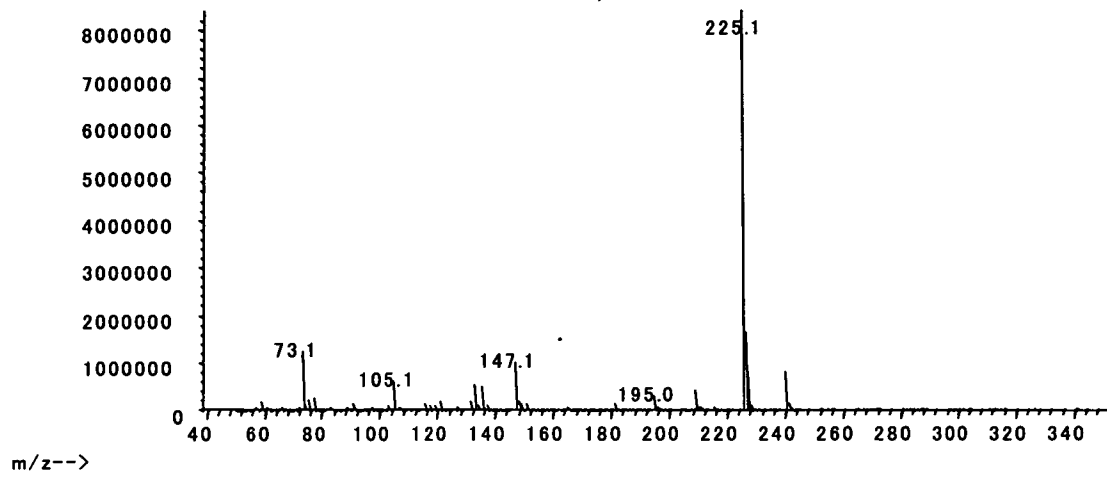
【マスフラグメント】

IMPA のマスフラグメント



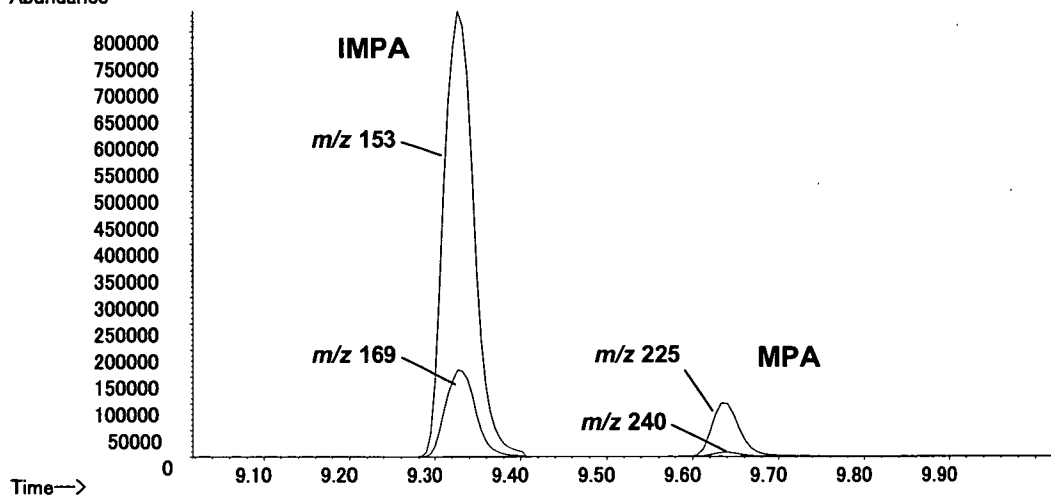
MPA のマスフラグメント

Abundance



【クロマトグラム】

Abundance



【固相抽出】

尿中 IMPA と MPA の抽出方法に関する以下の論文が、科学警察研究所から報告されている。
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

上記の抽出方法に準じて固相抽出を行った。

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。

抽出方法

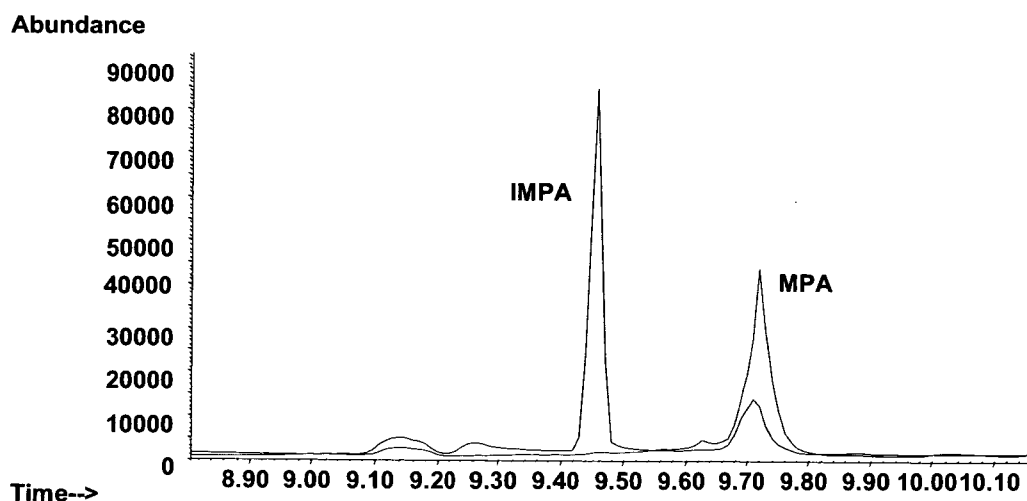
1. Bond Elut SAX (500 mg/3 ml) をメタノール 2 mL、純水 2 mL、1M フッ化ナトリウム溶液 12 mL、純水 5 mL を順次通して活性化する。
2. 試料 (尿) 0.5 mL をカラムに通す。
3. 純水 3 mL で洗浄する。
4. ネジ付き試験管中に 3%アンモニア/メタノール 5 mL で溶出する。
5. 溶出液を 60°C の加熱下、窒素気流下で乾固する。
6. BSTFA+1%TMCS 50 μL 、アセトニトリル 50 μL を加え、キャップ後に 80°C で 30 分間加熱して誘導体化する。
7. 冷却後、1 μL を GC-MS 試料と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

結果

MIPA と MPA の抽出、分析は可能であったが、抽出溶媒 (3%アンモニア/メタノール) の乾固に比較的長い時間を要した。また、乾固した試験管内に白色の残渣が大量に残るため誘導体化前に試料としては好ましくないと思われた。

そこで、より迅速な抽出方法が必要と判断し、液-液抽出の検討を行った。

固相抽出後のクロマト



【液-液抽出】

IMPA と MPA の各 10 µg を 1 mL の尿に添加して、ヘキサン、クロロホルム、弱酸性下でジクロロメタン、エーテル：アセトニトリル(85:15)の4種の抽出を行い、BSTFA+1%TMCS で誘導体化しました。

	検出結果	
	IMPA	MPA
ヘキサン	○	○
クロロホルム	○	○
ジクロロメタン(弱酸性下)	◎	○
エーテル：アセトニトリル(85:15)	×	◎
エーテルとジクロロメタン(4:1) (弱酸性下)	◎	◎

上記の結果、弱酸性下エーテルとジクロロメタン(4:1)の抽出が IMPA、MPA に対して最高のアバンドランスが得られた。

次に、酸性条件の検討を行った。

尿 1 mL に 0.1 N~0.01 N 塩酸 1 mL を加え、5 mL のエーテル：ジクロロメタン(4:1)で抽出を行った、何れも遜色ない結果が得られた。

以下の抽出を行い、検量線の作成を行った。

抽出方法

1. ネジ付試験管に既知濃度の IMPA、MPA を添加し、ブランク尿 0.5 mL、0.05 N 塩酸 1 mL を加え十分ボルテックスした。
2. 抽出溶媒としてエーテル-ジクロロメタン (4 : 1) 5 mL を加えキャップで密栓した。
3. 震盪、遠心分離後に抽出溶媒を新たな試験管に移した。
4. 抽出溶媒に無水硫酸ナトリウムを加え脱水した。
5. 抽出溶媒を新たなネジ付試験管に移し、45°Cの加熱下、窒素気流下で乾固した。
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°Cで 30 分間加熱して誘導体化した。
7. 冷却後、1 µL を GC-MS 試料とした。

結果

IMPA、MPA 共に検出可能ではあるものの、抽出効率が一定とならず、満足な検量線が作成できない。従って、似たような構造を有する化合物を内部標準物質として使い、検量線を作成する方法が良いと考えられた。

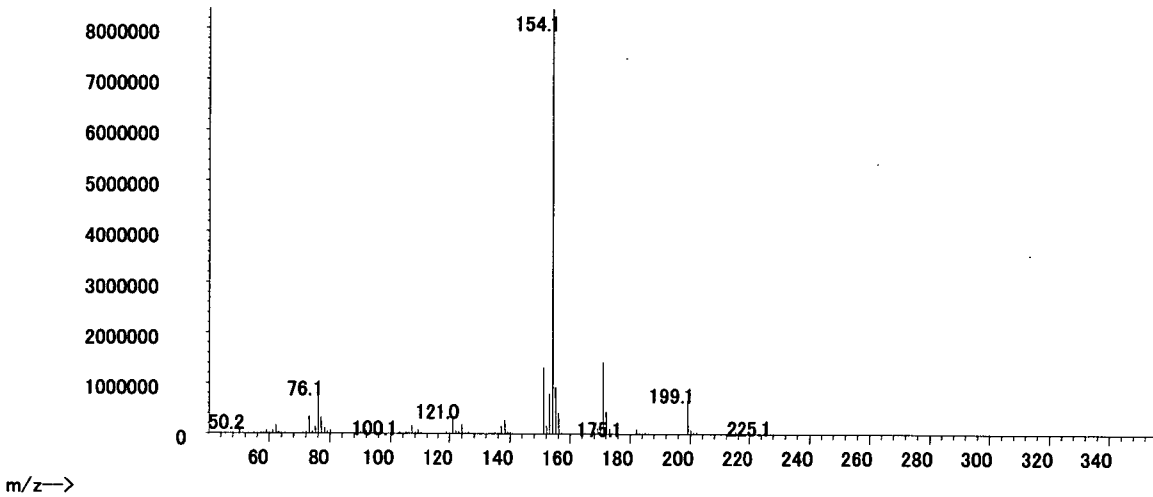
内部標準物質

内部標準物質として、IMPA-d7、MPA-d3 の検討を行った。

各化合物を BSTFA+1%TMCS 50 μ L、アセトニトリル 50 μ L で誘導体化したマスフラグメントを下に示す。

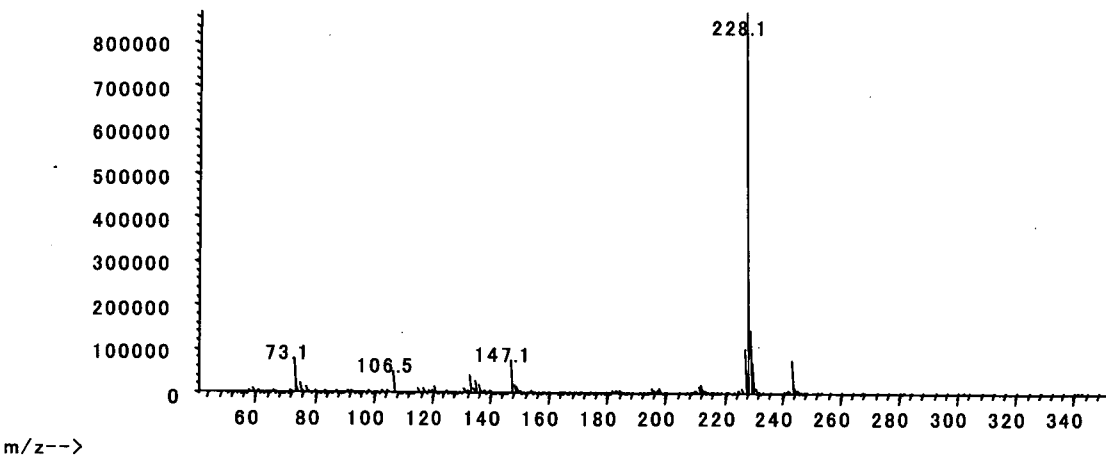
IMPA-d7 のマスフラグメント

Abundance



MPA-d3 のマスフラグメント

Abundance



IMPA-d0 と IMPA-d7 のベースピークイオンは分子量が 1 しか異ならず、内部標準物質としては使えない。一方、MPA-d0 と MPA-d3 のベースピークイオンは分子量が 3 異なるため、内部標準物質として使える。

そこで、MPA-d3 を内部標準物質として 300 ng 添加して、前述の抽出を行い検量線の作成を行った。

結果

固相抽出に比べ、バックグラウンドノイズが多少出現するものの、IMPA、MPA 共に検出可能であり、MPA-d3 を内部標準物質として使うことによって、直線範囲 100–2500 ng/ml の間で良好な検量線が得られた。

以下に最終的な抽出条件と GC-MS 条件を示す。

抽出方法

1. ネジ付試験管に内部標準物質として MPA-d3 を 300 ng を添加し、試料尿 0.5 mL、0.05 N 塩酸 1 mL を加え十分ボルテックスする。
2. 抽出溶媒としてエーテル-ジクロロメタン (4 : 1) 5 mL を加えキャップで密栓する。
3. 震盪、遠心分離後に抽出溶媒を新たな試験管に移す。
4. 抽出溶媒に無水硫酸ナトリウムを加え脱水する。
5. 抽出溶媒を新たなネジ付試験管に移し、45°C の加熱下、窒素気流下で乾固する。
6. BSTFA+1%TMCS 50 μ L、アセトニトリル 50 μ L を加え、キャップ後に 80°C で 30 分間加熱して誘導体化する。
7. 冷却後、1 μ L を GC-MS 試料とする。

GC-MS 条件

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 μ m film thickness)

注入口温度 : 250°C

MS イオン源 : 230°C

MS 四重極温度 : 150°C

トランスファー温度 : 280°C

カラム温度 : 40°C (3 min) – 15°C/min – 290°C (1 min)

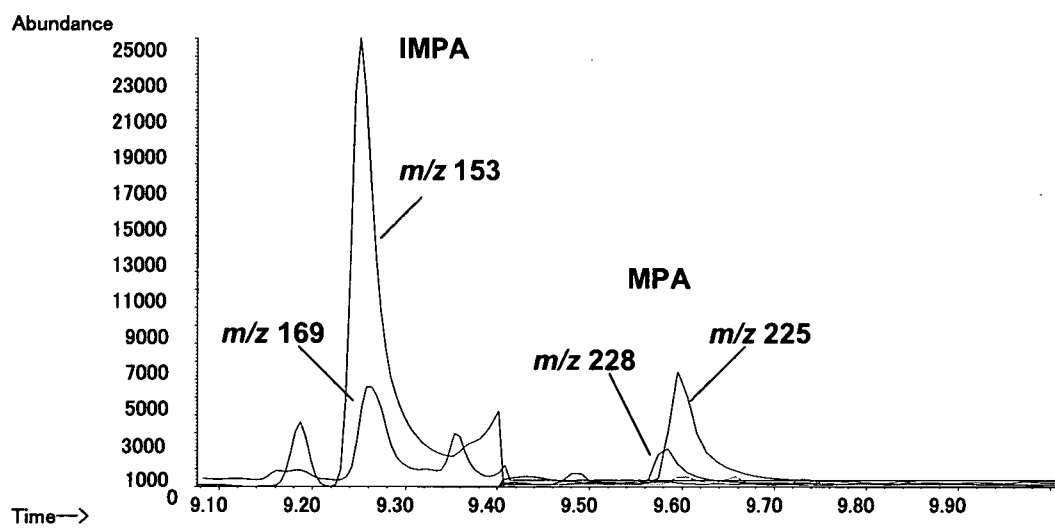
モニターイオン

IMPA : m/z 153.1、195.1 (保持時間 9.28 min)

MPA : m/z 225.1、240.1 (保持時間 9.61 min)

MPA-d3 : m/z 228.1、243.1 (保持時間 9.58 min)

液-液抽出により分析を行った IMPA と MPA のクロマト



【水分乾固による抽出】

GC分析において、尿サンプルを直接GCに注入（水溶液の状態）することは、カラムや検出器（特にMS）に対してダメージを与える。従って通常は、有機溶媒抽出や固相抽出などの前処理を行う必要がある。しかし、このような前処理操作において、測定対象物質の損失を生じる場合が多い。そこで、上記前処理を必要とせず、酸触媒下で水と反応して有機溶媒（メタノール及びアセトン）を生じる2,2-dimethoxypropane (DMP)を用いた尿サンプルの新規前処理法を検討した。

抽出方法

1. 試験管に尿および標準液 200 μ l を分取し、17.5%塩酸 20 μ l 2ml を加え、直ちに栓をして室温で10分間放置する。
2. 炭酸ナトリウム 2.7g（15mm試験管蓋1杯分）を加え、5分間放置し中和する。
3. 遠心（3,000rpm×10分間）後、上澄みをバイアルに分取する。
4. 窒素気流下で乾固する。
5. BSTFA+1%TMCS 50 μ L、アセトニトリル 50 μ L を加え、キャップ後に 80°Cで30分間加熱して誘導体化する。
6. 冷却後、1 μ L を GC-MS 試料とする。

結果

簡便なる MIPA と MPA の抽出、分析は可能であった。しかし、MIPA と MPA のピークに重なりは認められなかったものの、精製を行っていないために尿素のピークが検出され、機器の汚れが懸念される。今後は、ウレアーゼなどによる尿素分解を行い、常在成分の影響を除く必要がある。

2. CEによる尿中サリン分解物の分析

前処理

- 1) 試料100 μl に100 $\mu\text{g/ml}$ エチルメチルホスホン酸溶液 (内部標準溶液) 10 μl を加え, 攪拌しながらアセトニトリル100 μl を加える. さらにアセトニトリル400 μl を加え十分に攪拌する
- 2) 12000 x g, 5分間遠心分離する.
- 3) 上清を分取し, 窒素ガス (室温) にて乾固する.
- 4) 水100 μl を加え攪拌後, 12000 x g, 5分間遠心分離する.
- 5) 上清50 μl を試料瓶に入れCEにセットする.

分析条件

• キャピラリー電気泳動

装置 : Agilent CEシステム

キャピラリー : Fused silica capillary tube (75 μm i.d., 100 cm long)

キャピラリー温度 : 20 $^{\circ}\text{C}$

分析用電解液 : 1 M 酢酸-10%メタノール溶液

注入 : H₂O; 50 mbar x 5 sec, Sample; 50 mbar x 20 sec, Electrolyte; 50 mbar x 5 sec

印加電圧 : -25 kV

検出器 : MSD

• 質量分析計

装置 : Agilent 1100 MSD

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

極性 : Positive

キャピラリー電圧 : 4000 V

フラグメンター電圧 : 20 V

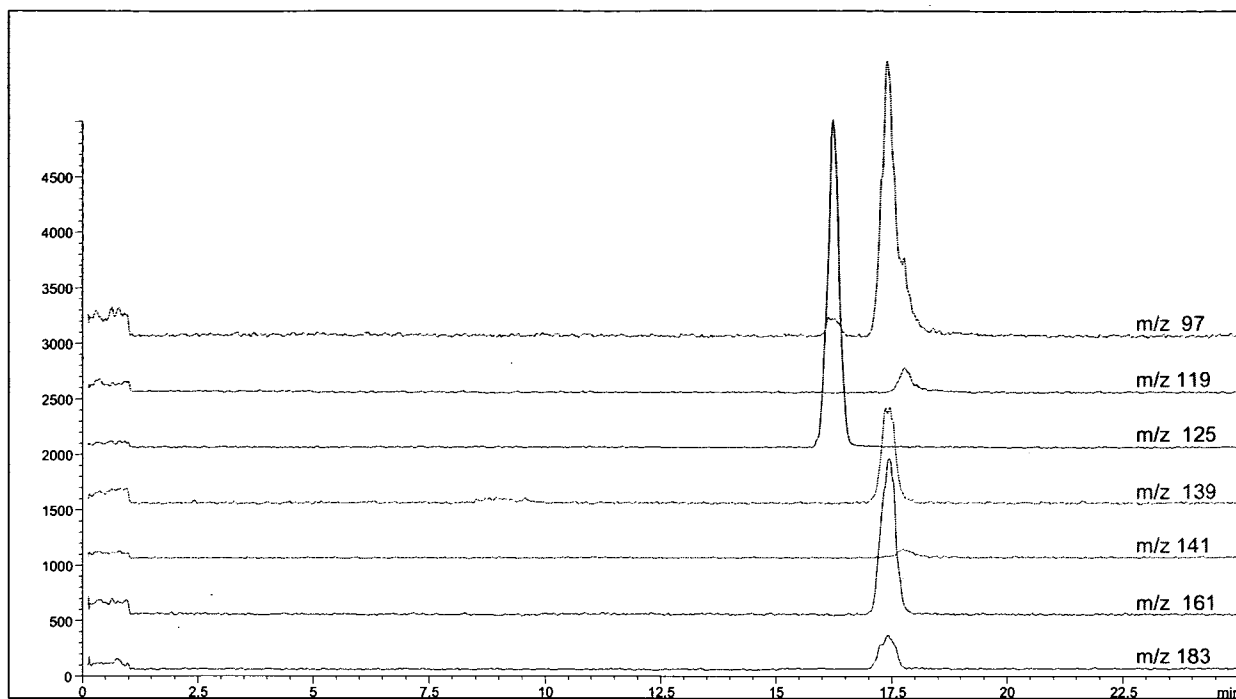
ドライガス流量 : 10 l/min (窒素)

ドライガス温度 : 350 $^{\circ}\text{C}$

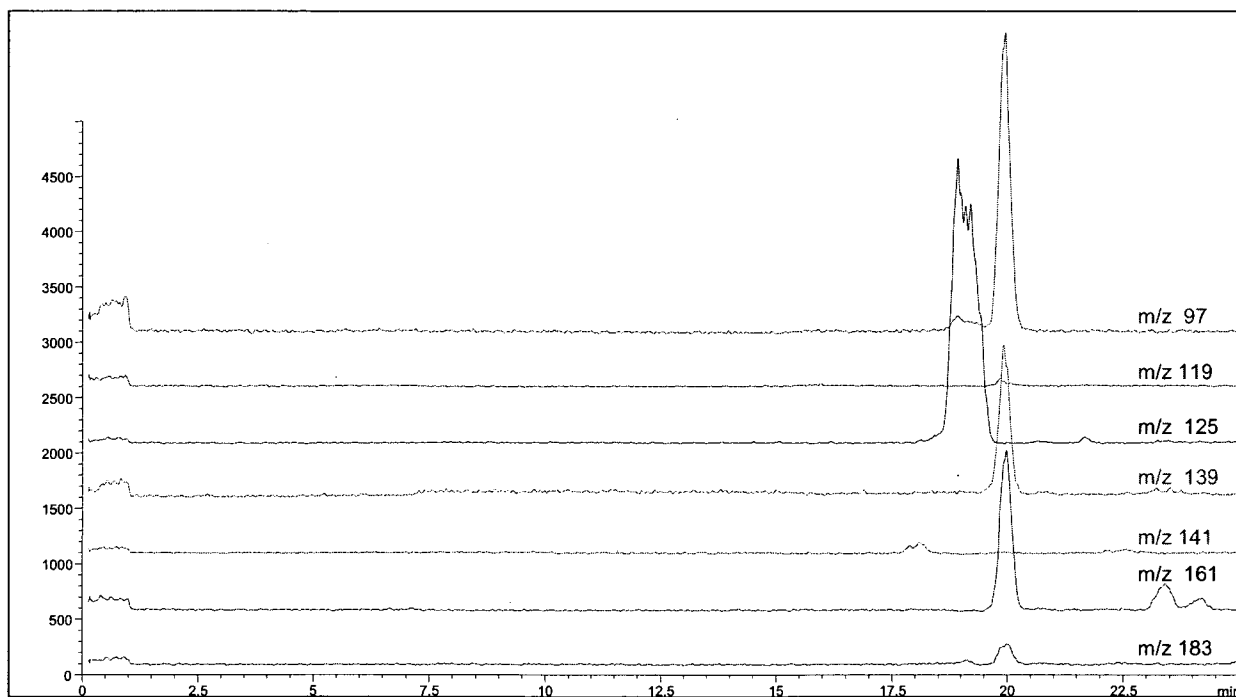
ネブライザーガス圧 : 10 psi

シース液 : 5 mM 酢酸アンモニウム-50%メタノール溶液

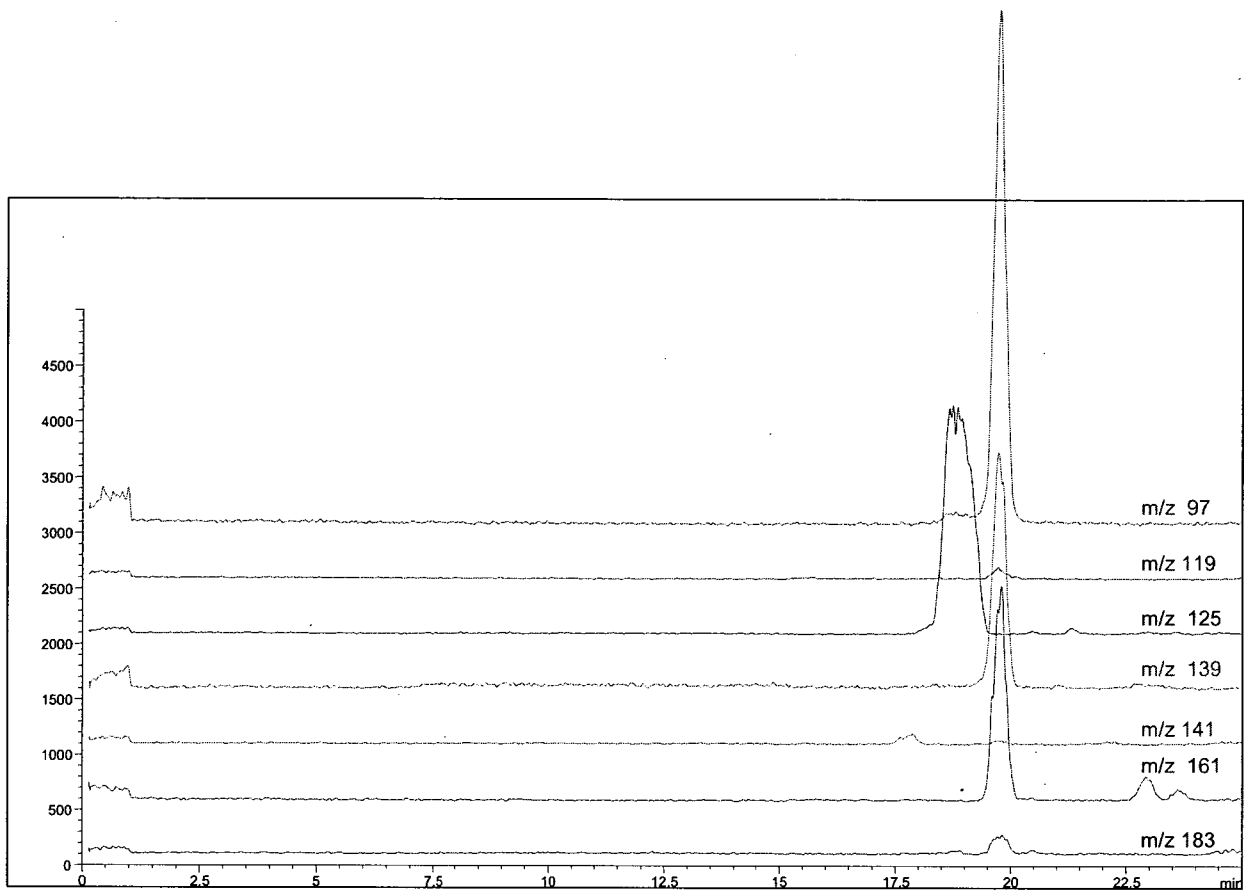
シース液流量 : 10 $\mu\text{l}/\text{min}$



標準用液の選択イオンエレクトロフェログラム (各 10 μg/ml 溶液)



症例3尿の選択イオンエレクトロフェログラム



症例3尿に標準物質（各 $10 \mu\text{g/ml}$ 溶液）を添加したものの選択イオンエレクトロフェログラム

結果

- 1) キャピラリー電気泳動質量分析法を用いることにより誘導体化することなく迅速に検出が可能となる。
- 2) 尿ではメチルホスホン酸はイソプロピルメチルホスホン酸と重なるので分析条件の検討が必要である。

健康危機管理における効果的な医療体制のあり方に関する研究
厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
平成 19 年度 総括研究報告書

平成 20 年 3 月 発行

主任研究者 大友 康裕
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科救急災害医学
〒113-8519 東京都文京区湯島 1 丁目 5 番 45 号

印刷 富沢印刷株式会社