

## 1. ヒ素

ヒ素の検査には、酸性条件下で加熱することによって銅に付着させるラインシュ法やジエチルジチオカルバミン酸法、グトツァイト法が利用されている。いずれも検出感度や特殊な器具が必要であることから、現場検査には利用されていない。メルコクアントヒ素イオンテストは、グトツァイト法の原理で試料中の無機ヒ素を検出できる。キットに入っている試験管に検査試料を入れ、付属の試薬を加えることでヒ化水素（アルシン、 $\text{AsH}_3$ ）が発生する。これが試験紙の反応部分に含まれている臭化水銀（Ⅱ）と反応し、黄茶色のハロゲン化ヒ素水銀錯体を形成することにより、ヒ素化合物の確認が可能となる。

本キットを尿検査に適用する場合、所定の時間（試薬添加後 30 分後）に結果を判断するのではなく、試薬添加 10 分後に判断する。尿での検出下限は  $0.5\sim 1.0\mu\text{g/ml}$  と致死域に近い濃度であり、ヒ素中毒の疑いであるか否かを判断するには困難であるが、食物、飲料などの検査には適応可能と考えられる。

本研究では、ヒ素中毒の疑いであるか否かを判断できる実用的な尿中ヒ素検査法について検討した。検討には、高価な機器を使用せずに一般病院の検査室などで検査可能である化学反応や市販キットを使用した。

### 1-1. モリブデンブルー法による尿中ヒ素の検査

リンやシリカ、ヒ素などは、モリブデン酸アンモニウムと反応してヘテロポリ酸の錯体を形成して青色を呈する。この反応を利用したモリブデンブルー法は、JIS 等にも採用され、リンやシリカ、ヒ素などを測定する精度高い方法であることが知られている。しかし、市販飲料や排水などリン酸などを多く含む試料の検査は困難であり、リン酸を排除する必要がある。これと同様に、尿中ヒ素の検査に適用するには、妨害成分からヒ素を抽出して検査試料とする必要があるため、尿中からのヒ素の抽出法について検討した。

### 【方法】

1. 検査試料 5ml をポリプロピレン容器に入れる。
2. 銅粒 3g と塩酸 2ml をポリプロピレン容器に入れる。
3. 100℃で 20 分間、加熱する。
4. 放冷後、容器内の溶液を捨てる。
5. 銅粒を蒸留水で洗浄し、軽く水分を拭き取る。
6. 銅粒に水酸化ナトリウム水溶液 (0.1M) 0.5ml を加え、銅表面に付着したヒ素を溶出する (この操作を 3 回繰り返す)。
7. 溶出液を合し、塩酸で中性にする。
8. 溶液に過マンガン酸カリウム溶液 ( $10^{-4}$ M) 50  $\mu$ l を加え、5 分間放置する。
9. アスコルビン酸溶液 (0.1g/ml) 50  $\mu$ l とモリブデン酸アンモニウム溶液 (13g/硫酸(9M) 100ml) 100  $\mu$ l を加え、50℃で 20 分間、加温する。
10. 分光光度計で 840nm の吸光度を測定し、予め作成した検量線より定量値を算出する。

### 【結果・考察】

未処理の尿にモリブデン酸アンモニウム溶液などの発色試薬を加えた結果、尿中ヒ素の有無にかかわらず、発色に差が認められなかった。モリブデン酸アンモニウムは、リン酸などと反応して発色することが知られており、尿中に存在するリン酸と反応したことが考えられた。そこで、検査試料からリン酸などのモリブデン酸アンモニウムと反応する成分を除く方法およびヒ素を抽出 (精製) する方法を検討した。

イオン交換樹脂やヒ素吸着樹脂によるリン酸の除去やヒ素の抽出を検討したが、良好な結果は得られなかった。ヒ素は、酸性条件下で銅に吸着することが知られているが、詳細な条件検討を行っている資料が無かったため、ヒ素の銅への吸着条件と銅からの溶出条件について検討した。また、既報では銅線や銅板が使用されているが、吸着させる銅の表面

積を広くする目的で、本検討では銅粒を使用した。

まず、銅板への吸着条件を検討する目的で、溶液の酸性度と加熱時間について検討を行った。既報では、直火で加熱していることから、加熱温度は 100℃とした。尿 5ml に対して添加する塩酸量を 1～3ml に変化させた結果、2ml 以上の添加でヒ素吸着量に増加は認められなかった。また、加熱時間を 10～30 分間で検討した結果、20 分間で最大となった。次に、吸着させる銅粒の量 (0.5～10g/尿 5ml) を検討した結果、3g で最大となった。

次に、銅板からの溶出条件を検討する目的で、溶出に使用する水酸化ナトリウムの濃度と抽出回数について検討を行った。1 回の抽出に使用する水酸化ナトリウムは 0.5ml (銅粒が十分に浸る量) とした。その結果、水酸化ナトリウムの濃度が 0.1M 以上でヒ素溶出量に増加は認められなかった。抽出回数が多いほどヒ素溶出量は増加したが、不用意に回数を増加させても溶出液中のヒ素濃度が低下し、見かけ上の検出下限値は低下する。これらを考慮して、抽出回数は 3 回とした。

最適化した条件下において尿中ヒ素を検査した結果、0.05～2.0  $\mu$ g/ml まで定量性が認められた。尿中ヒ素濃度を 0.2 と 2.0  $\mu$ g/ml となるように添加して繰り返し検査した結果、9.6 と 4.2% のばらつきで再現性が確認された。検出下限は 0.05  $\mu$ g/ml であり、中毒であるか否かを判断できる程度の尿中ヒ素を検査できることが判明した。1998 年に和歌山で発生したヒ素混入事件で救命された子供の尿中ヒ素濃度は、9.6、12.3、21.2  $\mu$ g/ml であり、本法で十分に検出できると推測される。

## 1-2. パックテストによる尿中ヒ素の検査

パックテストは、水道水や河川、工業用水の迅速検査に利用されているキットである。前項のリンモリブデンブルー法と同じ原理 (酸化モリブデン青比色法) を利用したキットであり、0.2～10  $\mu$ g/ml の範囲で定量可能とされている。前項のように試薬を用時調整する

必要が無く、加温しなくても発色するために、加温装置の無い施設でも適用可能と考えられるため、検討を加えた。

#### 【方法】

1. 検査試料 5ml をポリプロピレン容器に入れる。
2. 銅粒 3g と塩酸 2ml をポリプロピレン容器に入れる。
3. 100℃で 20 分間、加熱する。
4. 放冷後、容器内の溶液を捨てる。
5. 銅粒を蒸留水で洗浄し、軽く水分を拭き取る。
6. 銅粒に水酸化ナトリウム水溶液 (0.1M) 0.5ml を加え、銅表面に付着したヒ素を溶出する (この操作を 3 回繰り返す)。
7. 溶出液を合し、塩酸で中性にする。
8. 溶液を専用カップに入れ、K-1 試薬 4 滴を加える。
9. 蓋をして 2~3 回振る。
10. K-2 試薬 1 滴を加え、蓋をして 2~3 回振る。
11. チューブ先端のラインを引き抜き、穴を上にしてチューブ下半分を強くつまみ、中の空気を追い出す。
12. そのままの状態です穴を溶液の中につけ、つまんだ指を緩めながら溶液全量を吸い込む。
13. 5~6 回振り混ぜて、2 分後に標準紙の上のせて色を比較する。

#### 【結果・考察】

未処理の尿を検査した結果、尿中ヒ素の有無にかかわらず、発色に差が認められなかった。パックテストもモリブデン酸アンモニウムと同様の反応機構であるため、尿中に存在するリン酸と反応したことが考えられた。そこで、前記の銅板に吸着させて抽出した溶液

をパックテストで検査した。前記の方法に比べ、多少ばらつきが大きくなる結果となったが、モリブデン酸アンモニウムなどの試薬を調整する必要が無く、簡便に検査できると考えられる。

## 2. 有機リン系農薬

有機リン系農薬は神経性毒ガスの研究から派生して合成されたものであり、コリンエステラーゼの活性阻害作用を有する。パラチオンなど初期の製品は毒性が高く、中毒事故が多発し、その降、低毒性の製品が開発されているが、中毒事故は絶えない。

迅速検査法としては、コリンエステラーゼの活性阻害を指標とする検査紙、DTNB 法、イムノアッセイ法と呈色反応を指標とする有機りん系農薬検出キットがある。検査紙は簡便に検査できる利点があるが、自動分析器の普及によって姿を消している。有機りん系農薬検出キットは薄層クロマトグラフィーの検出試薬として利用されている 4-(4-ニトロベンジル)ピリジン (NBP) が溶液中で有機リン系農薬と反応する<sup>9)</sup>。検査試料中に有機リン系農薬が一定の濃度以上含まれていると、ピンク色～赤紫色に変色する。一部の有機リン系農薬では着色しないものもある。

### 2-1. カーバメート系薬剤スクリーニングキット (OP/Catrbamate) による有機リン系農薬の検査

カーバメート系薬剤スクリーニングキット (OP/Catrbamate) は、セティ社より販売されているコリンエステラーゼ阻害反応を利用したキットであり、有機リン系農薬やカーバメート系農薬が検出可能である。本キットは、環境、土壌、農産物などに含まれる有機リン系農薬やカーバメート系農薬(殺虫剤)を直接あるいは水または有機溶剤により抽出して検査できる。しかし、生体試料中の有機リン系農薬やカーバメート系農薬を検出した例は無いが、簡便な操作で検査可能であるため、尿中の有機リン系農薬やカーバメート系農薬の検査に利用可能であるかを検討した。

#### 【方法】

1. 透明なスクリュウキャップ試験管 (Bufer/Chromogen Reagent tube) と青色の試験官

(Cholinesterase Reagent tube) に試料名を記入する。

2. 透明なスクリーキャップ試験官に陰性コントロールとして洗浄液 A(あるいは洗浄液 B) 1ml を加える。
3. よく攪拌する。
4. 別の透明なスクリーキャップ試験官に検査試料 1ml を加える。
5. よく攪拌する。
6. それぞれの透明なスクリーキャップ試験官の溶液を、陰性コントロールあるいは検査試料と明記した青色の試験官に入れる。
7. よく攪拌する。
8. 5～10 分後、陰性コントロールと検査試料の色調を比較する。

#### 【結果・考察】

本キットは、検査試料中に有機リン系農薬やカーバメート系農薬などの殺虫剤が含まれているとコリンエステラーゼの作用が阻害され、反応溶液は白色のままである。しかし、検査試料中に有機リン系農薬やカーバメート系農薬が含まれていないとコリンエステラーゼの作用により、基質が酵素分解されて反応溶液が青色を呈する。

検査試料として未処理の尿を使用して検査した結果、有機リン系農薬の添加の有無にかかわらず反応溶液は青色を呈した。尿成分の影響が懸念されるため、液液抽出など、何らかの前処理を行って有機リン系農薬を抽出する必要がある。

本キットでは、洗浄液中の臭素の有無によって、試料中に含まれる農薬がカーバメート系農薬のみであるか、カーバメート系農薬あるいは有機リン系農薬であるかを選別できる可能性があるため、今後、更に詳細を検討していく予定である。

## 2-2. Agri-Screen Ticket による有機リン系農薬の検査

Agri-Screen Ticket は、Neogen 社より販売されている「コリンエステラーゼ阻害反応を利用した殺虫剤検出キット」であり、有機リン系農薬やカーバメート系農薬が検出可能である。本キットは、環境、土壌、農産物などに含まれる有機リン系農薬やカーバメート系農薬（殺虫剤）を直接あるいは水または有機溶剤により抽出して検査できる。しかし、生体試料中の有機リン系農薬やカーバメート系農薬を検出した例は無いが、簡便な操作で検査可能であるため、尿中の有機リン系農薬やカーバメート系農薬の検査に利用可能であるかを検討した。

### 【方法】

1. チケットが入っている小袋を開封し、チケットを取り出す。
2. チケットのカバーホイルを半分剥がし、酵素ディスク部（白色）を露出させる。
3. 尿 3 滴を、酵素ディスク部（白色）に滴下する。
4. アクチベーターアンプルを目盛り付の試験管内で割り、水 1ml を加えて希釈する。
5. 4.の希釈液 3 滴を酵素ディスク部（白色）に滴下し、3 分間放置する。
6. チケットのカバーホイルの残り半分を完全に取り除き、酵素ディスク部（白色）と基質ディスク部（紫色）の露出部分がきちんと合わさるように折り曲げ、3 分間しっかりと接触を保持する。
7. 3 分後、酵素ディスク部（白色）が白色であれば、検出下限以上のコリンエステラーゼ阻害活性物質の存在が示唆される。

### 【結果・考察】

本キットは、検査試料中に有機リン系農薬やカーバメート系農薬などの殺虫剤が含まれていると酵素ディスク部に含まれているコリンエステラーゼの作用が阻害され、酵素ディ



スク部は白色のままである。しかし、検査試料中に有機リン系農薬やカーバメート系農薬が含まれていないとコリンエステラーゼの作用により、基質が酵素分解され、酵素ディスク部が青色を呈する。

検査試料として未処理の尿に有機リン系農薬を添加して検査した結果、尿成分の影響もなくおおむね説明書に記載されている検出下限値まで検査可能であった。尿中有機リン系農薬検出の可能性が見いだせたことから、今後、更に詳細を検討していく予定である。

### 2-3. 有機りん系農薬検出キットによる代謝物の反応性の検証

これまでに、4-(4-nitrobenzyl)pyridine を用いた有機りん系農薬検出キットを開発してきたが、陽性を示したにも関わらず、機器分析において摂取した有機リン系農薬が検出されないことを経験した。当初、有機リン系農薬は、生体内で速やかに分解されてアルキルリン酸とエステル結合が分解した側鎖になる (Fig. 1) と考え、アルキルリン酸と側鎖について検証したが、本キットで陰性となった。文献を詳細に調査していくと、アルキルリン酸と側鎖のエステル結合が分解する前に、側鎖の置換基が還元などの修飾を受ける代謝経路 (Fig. 2) が存在することが判明した。そこで、本研究室にて保有していたフェニトロチオンの代謝物を使用し、本キットによるフェニトロチオン代謝物の反応性について検証した。検討に用いたフェニトロチオン代謝物は、アミノフェニトロチオン、アミノフェニトロオキソン、S-メチルフェニトロチオン、アセチルアミノフェニトロチオンの4化合物である。

#### 【試料調整】

薬物を服用していないヒトの尿に各代謝物を添加して  $20 \mu\text{g/ml}$  となるように調整し、検査試料とした。

### 【方法】

1. 試料1mlをNBP試薬入り試験管に採り、攪拌する。
2. キャップを閉め、尿を入れた試験管を100℃で10分間加温する。
3. 室温まで放冷し、TEP試薬を2滴加えて激しく攪拌する。
4. 抽出溶媒を1ml加える。
5. 転倒攪拌後、静置して上層の色を観察する。
6. 陽性の場合、上層（抽出溶媒層）は薄ピンク色～赤紫色を呈する。

### 【GC/MSにおける前処理法】

1. 試料 0.5ml に塩酸 (0.05M) 1.5ml を加え、攪拌する。
2. 混合液を Extrelut カラム (2g,  $\phi$  10mm) に注ぎ込む。
3. 室温で 20 分間、放置する。
4. 酢酸エチルで溶出し、溶出液 4ml を分取する。
5. 窒素気流下で溶剤を留去する。
6. 残渣に酢酸エチル 0.1ml を加えて、再溶解する。
7. その 1  $\mu$ l を GC/MS に注入して分析する。

### 【GC/MS 条件】

装置 : Agilent 6890GC / 5973 MSD

分析カラム : HP-5MS (0.25mm, 30m, 0.25  $\mu$  m)

カラム温度 : 50℃ (1分) ~20℃/分~280℃ (3分)

注入口温度 :

インターフェース温度 :

イオン化法 : EI (70eV)

検出質量範囲：m/z 50-450

#### 【結果・考察】

着色の程度は異なったが、各代謝物とも陽性を示した。最終代謝物である O,O-ジメチルチオリン酸および 3-ニトロ-4-メチルフェノールは陰性であった。各代謝物の検出下限の検討は行わなかった。

フェニトロチオンを服用したと思われる中毒事例の尿を分析した結果、フェニトロチオンが検出されたが、検出キットで陽性になる濃度ではなかった。既報を参考にして、マススペクトルを検索した結果、アミノフェニトロチオンが認められた。その他の代謝物は検出されなかった。

以上のことから、本キットでは服用した親化合物が検出されなくても代謝物が反応していることが推察される。本検討では、フェニトロチオンについてのみ検証を行ったが、今後、他の有機リン系農薬についても確認を進めていく予定である。

資料8

## 生体試料中メタミドホス分析に関する研究

# メタミドホス分析法の検討

琉球大学医学部法医学分野  
福家 千昭

炎光光度検出器付ガスクロマトグラフによる生体試料中のメタミドホスの分析法を検討した。

## 1. 分析条件の検討

### 1) 装置および分析条件

|            |  |
|------------|--|
| 装置         | : Agilent 7890A GC system  |
| 検出器        | : 炎光光度検出器 (リンフィルター装着)  |
| カラム        | : DB-5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 $\mu$ m)   |
| キャリアガス     | : ヘリウム   |
| キャリアガス流速   | : 1.0 ml/min   |
| オープン温度     | : 50 $^{\circ}$ C (4 分間保持) - (20 $^{\circ}$ C/min) - 320 $^{\circ}$ C (7.5 分間保持) |
| 注入口温度      | : 320 $^{\circ}$ C   |
| 検出器温度      | : 200 $^{\circ}$ C   |
| 水素流量       | : 75 ml/min  |
| 空気流量       | : 100 ml/min   |
| メイクアップガス流量 | : 60 ml/min  |
| 注入方法       | : スプリットレス  |
| 試料注入量      | : 1 $\mu$ l  |

### 2) 標準溶液およびガスクロマトグラフ注入用試料の調整

21 種類の有機リン系化合物 (トリクロルホン, チオメトン, メタミドホス, ジクロルボス, ジスルホトンスルホキシド, アセフェート, ジメトエート, ダイアジノン, シアノホス, エチルチオメトン, フェニトロチオンオクソン, クロルピリホスメチル, ピリミホスメチル, フェニトロチオン, マラチオン, クロルピリホス, フェントエート, メチダチオン, イソキサチオン, スルプロホス, EPN) について, 1 mg/ml のメタノール溶液を調製する。

1 mg/ml 標準溶液を酢酸エチルで希釈し, 1  $\mu$ g/ml 酢酸エチル溶液を調製する。

### 3) 結果

本分析条件による 21 種の有機リン系化合物の保持時間を表 1 に示す。メタミドホスのピークは 10.54 分に出現し, 他の有機リン系化合物とは完全に分離しており, メタミドホスとの相違の判別は可能であった。

表 1 有機リン系化合物の保持時間

| 化合物          | 保持時間    | 化合物          | 保持時間    |
|--------------|---------|--------------|---------|
| トリクロルホン      | 6.83 分  | フェニトロチオンオクソン | 14.48 分 |
| チオメトン        | 10.42 分 | クロルピリホスメチル   | 14.59 分 |
| メタミドホス       | 10.54 分 | ピリミホスメチル     | 14.81 分 |
| ジクロルボス       | 10.62 分 | フェニトロチオン     | 14.88 分 |
| ジスルホトンスルホキシド | 11.20 分 | マラチオン        | 14.92 分 |
| アセフェート       | 11.94 分 | クロルピリホス      | 15.03 分 |
| ジメトエート       | 13.77 分 | フェントエート      | 15.52 分 |
| ダイアジノン       | 14.01 分 | メチダチオン       | 15.71 分 |
| シアノホス        | 14.02 分 | イソキサチオン      | 16.19 分 |
| エチルチオメトン     | 14.20 分 | スルプロホス       | 16.59 分 |
|              |         | EPN          | 17.26 分 |

## 2. 前処理法の検討

### 1) 前処理法その1

- (1) 試料 100  $\mu$ l をマイクロチューブに取る.
- (2) 酢酸エチル 100  $\mu$ l を加える.
- (3) ボルテックスミキサーで1分間攪拌する.
- (4) 15000 回転で5分間遠心分離する.
- (5) 上清を分取する.
- (6) その 1  $\mu$ l をガスクロマトグラフに注入する.

### 2) 前処理法その2

- (1) 無水硫酸ナトリウム 1 g を脱脂綿を詰めたパスツールピペットに入れる.
- (2) 酢酸エチル 1 ml を (1) のパスツールピペットに流す.
- (3) 試料 100  $\mu$ l をパスツールピペットに注入する.
- (4) 試料が硫酸ナトリウムに吸収されるのを待つ.
- (5) 酢酸エチル 1 ml を流す.
- (6) さらに酢酸エチル 1 ml を流す.
- (7) 流出してきた酢酸エチルを試験管に集める.
- (8) 窒素ガス, 水浴中で乾固する.
- (9) 残渣を酢酸エチル 100  $\mu$ l に溶解する.
- (10) その 1  $\mu$ l をガスクロマトグラフに注入する.

### 3) 前処理法その3

- (1) 試料 100  $\mu$ l をマイクロチューブに取る.
- (2) 酢酸エチル 1 ml を加える.
- (3) ボルテックスミキサーで1分間攪拌する.
- (4) 15000 回転で5分間遠心分離する.
- (5) 上層を分取する.
- (6) 下層に酢酸エチル 1 ml を加える.
- (7) ボルテックスミキサーで1分間攪拌する.
- (8) 15000 回転で5分間遠心分離する.
- (9) 上層を分取する.
- (10) 上層を合わせ窒素ガス, 水浴中で乾固する.
- (11) 残渣を酢酸エチル 100  $\mu$ l に溶解する.
- (12) その 1  $\mu$ l をガスクロマトグラフに注入する.

### 4) 遠心エバポレータによる酢酸エチル抽出液の濃縮乾固の検討

10  $\mu$ g/ml メタミドホス-酢酸エチル溶液 1 ml を遠心エバポレータにて乾固したところ, メタミドホスの回収率は  $1.3 \pm 2.2\%$  であった.

### 5) 結果

前処理法その1では, 0.1  $\mu$ g/ml メタミドホス添加尿を用いて検討したところ, 検出可能であったが, 回収率が 10%程度で試料中濃度が 0.1  $\mu$ g/ml が検出下限であった.

前処理法その2では, 同様に 0.1  $\mu$ g/ml メタミドホス添加尿を用いて検討したところ, 回収率が 120%と大幅向上し抽出効率の改善が認められた. しかし, 0.1  $\mu$ g/ml メタミドホス添加血液で検討したところ, 硫酸ナトリウムと血液が接したところで血液が凝固してしまい, 酢酸エチルでの溶出が困難であった.

前処理法その3では, 0.1  $\mu$ g/ml メタミドホス添加尿で回収率が 112%, 0.1  $\mu$ g/ml メタミドホス添加血液でも 116%であり, 良好な結果が得られた. また, ブランク尿, 血液を同様に処理したところ妨害となるピークは認められなかった.

メタミドホスの前処理操作に遠心エバポレータを使用することは困難であった.

以後, この前処理法その3にて生体試料中のメタミドホスを抽出することとする.

### 3. 定量性の検討

#### 1) 標準溶液での検討

有機リン系の化合物で化学構造が比較的類似したアセフェートを内部標準として使用し、0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml メタミドホス-1 µg/ml アセフェート含有酢酸エチル溶液を用いて検量線を作成した。

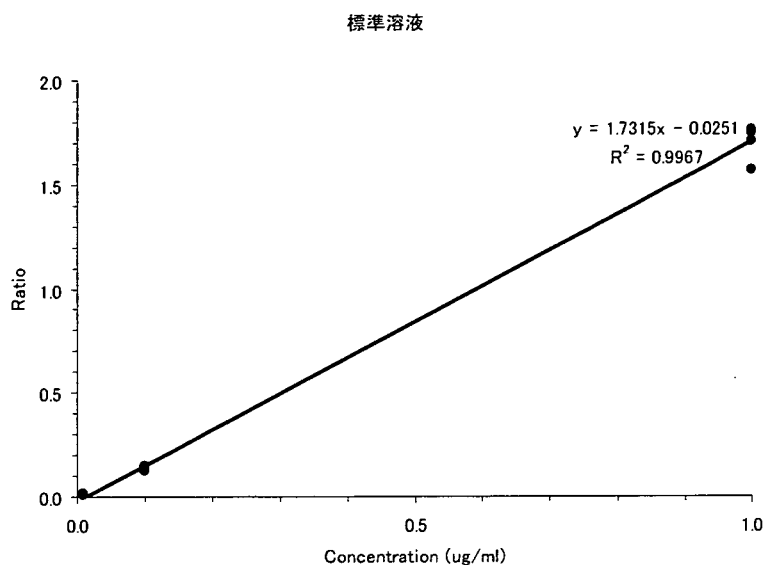


図 1. 酢酸エチル標準溶液でのメタミドホスの検量線

各濃度を 5 回注入し、濃度とアセフェートのピーク面積に対するメタミドホスのピーク面積の割合をプロットしたところ相関係数 0.997 の相関性を持つ直線が得られた。また、各濃度におけるピーク面積比の変動係数は、0.01 µg/ml で 20.2%, 0.1 µg/ml で 7.1%, 1.0 µg/ml で 4.8%であった。

#### 2) 血液での検討

血液にメタミドホスを 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml となるように添加し、同じくアセフェートを 1 µg/ml となるように添加し、前処理操作を行い血液での定量性を検討した。

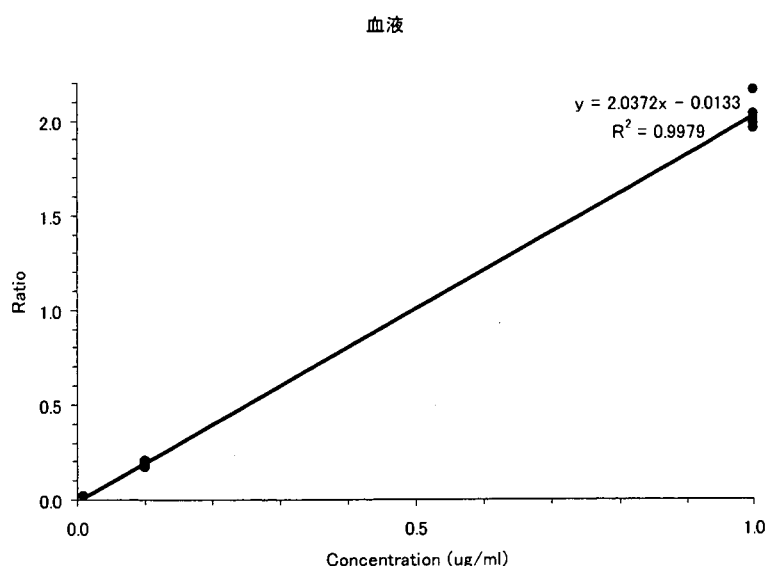


図 2. 血液中のメタミドホスの検量線

各濃度を 5 検体を処理し分析した。濃度とアセフェートのピーク面積に対するメタミド

ホスのピーク面積の割合をプロットしたところ相関次係数 0.998 の相関性で直線性が得られた。各濃度におけるメタミドホスの血液からの回収率を表にまとめた。

表2 メタミドホスの血液からの回収率

|            |           |            |          |
|------------|-----------|------------|----------|
| 濃度 (µg/ml) | 0.01      | 0.1        | 1.0      |
| 回収率 (%)    | 59.5±11.4 | 115.6±11.5 | 90.5±7.3 |
| 変動係数 (%)   | 19.1      | 10.0       | 8.1      |

### 3) 尿での検討

尿にメタミドホスを 0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml となるように添加し, 同じくアセフェートを 1 µg/ml となるように添加し, 前処理操作を行い尿での定量性を検討した。

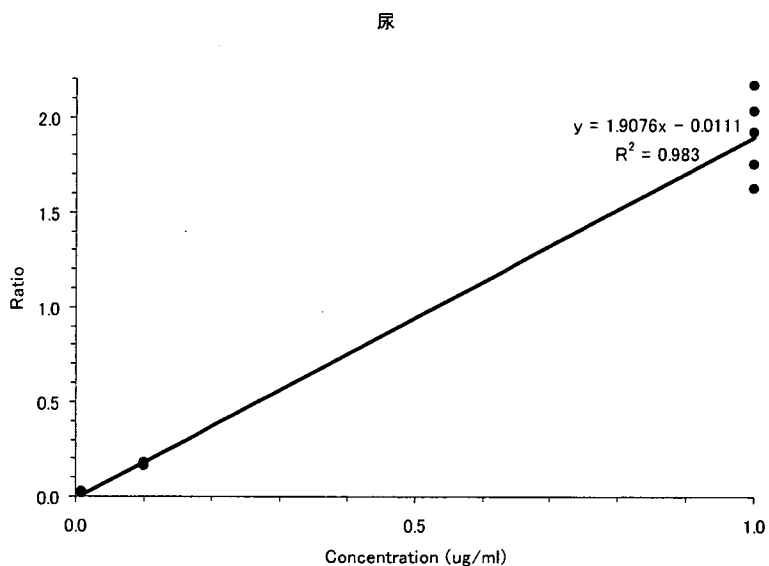


図3. 尿中のメタミドホスの検量線

各濃度を 5 検体を処理し分析した。濃度とアセフェートのピーク面積に対するメタミドホスのピーク面積の割合をプロットしたところ相関次係数 0.983 の相関性で直線性が得られた。各濃度におけるメタミドホスの尿からの回収率を表にまとめた。

表3 メタミドホスの尿からの回収率

|            |           |           |           |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| 濃度 (µg/ml) | 0.01      | 0.1       | 1.0       |
| 回収率 (%)    | 77.0±14.4 | 111.6±6.6 | 86.4±11.5 |
| 変動係数 (%)   | 18.7      | 5.9       | 13.3      |



#### 4. 応用例

メタミドホスが検出されたとされる冷凍食品と同じ製品を食し、体調不良を訴えた人から採取した血液と尿について、本分析法を応用した。

##### 1) 血液試料について

血液について前処理を行い分析したところ、メタミドホスに一致するピークは検出されなかった。この血液に  $0.01 \mu\text{g/ml}$  となるようにメタミドホスを添加し、同様に前処理を行い分析したところメタミドホス (10.54 分) の保持時間に一致するピークを確認した (図 4)。

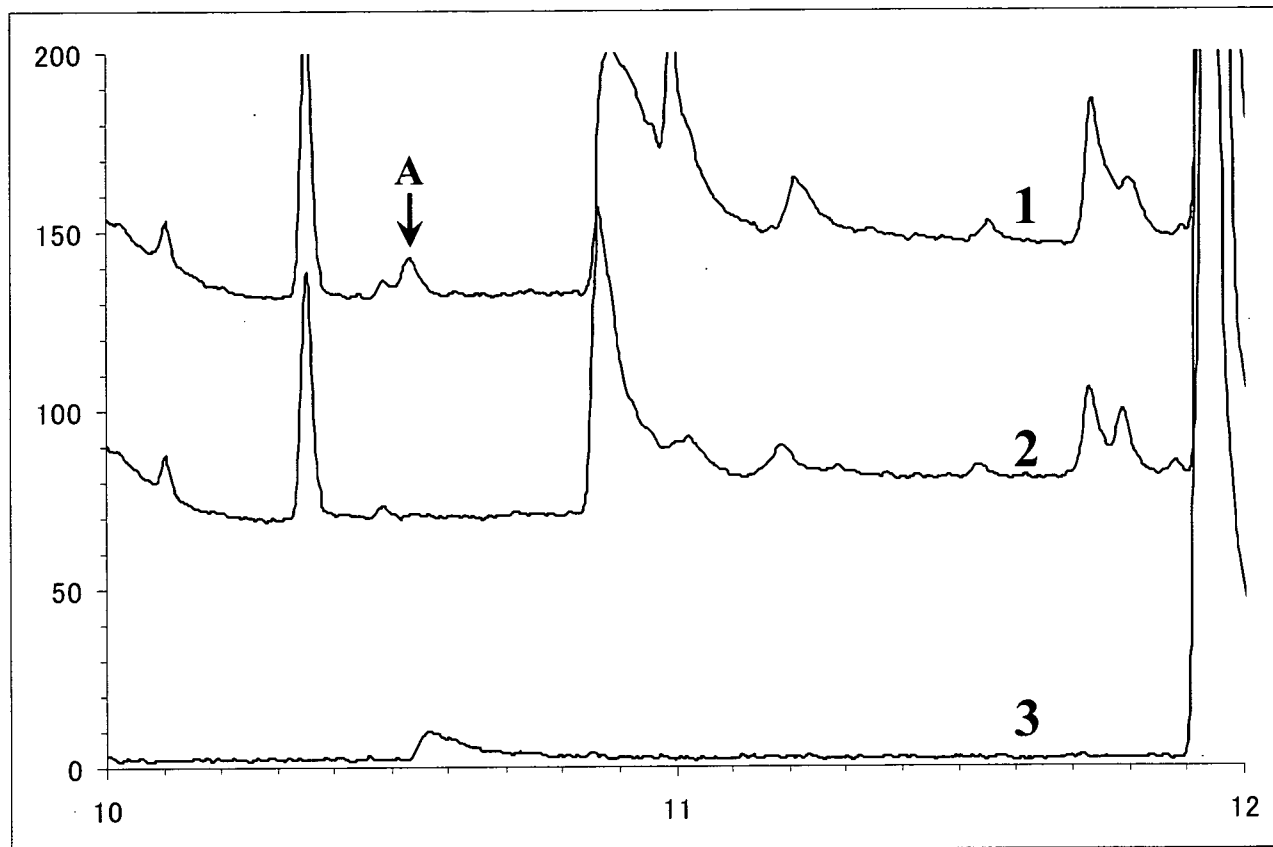


図 4. 血液中メタミドホスの定性分析のクロマトグラム

- 1: 血液にメタミドホス ( $0.01 \mu\text{g/ml}$ ) を添加
- 2: 血液
- 3: メタミドホス-酢酸エチル溶液 ( $0.01 \mu\text{g/ml}$ )
- A: メタミドホス

##### 2) 尿試料について

尿について前処理を行い分析したところ、メタミドホスに一致するピークは検出されなかった。この尿に  $0.01 \mu\text{g/ml}$  となるようにメタミドホスを添加し、同様に前処理を行い分析したところメタミドホス (10.54 分) の保持時間に一致するピークを確認した (図 5)。

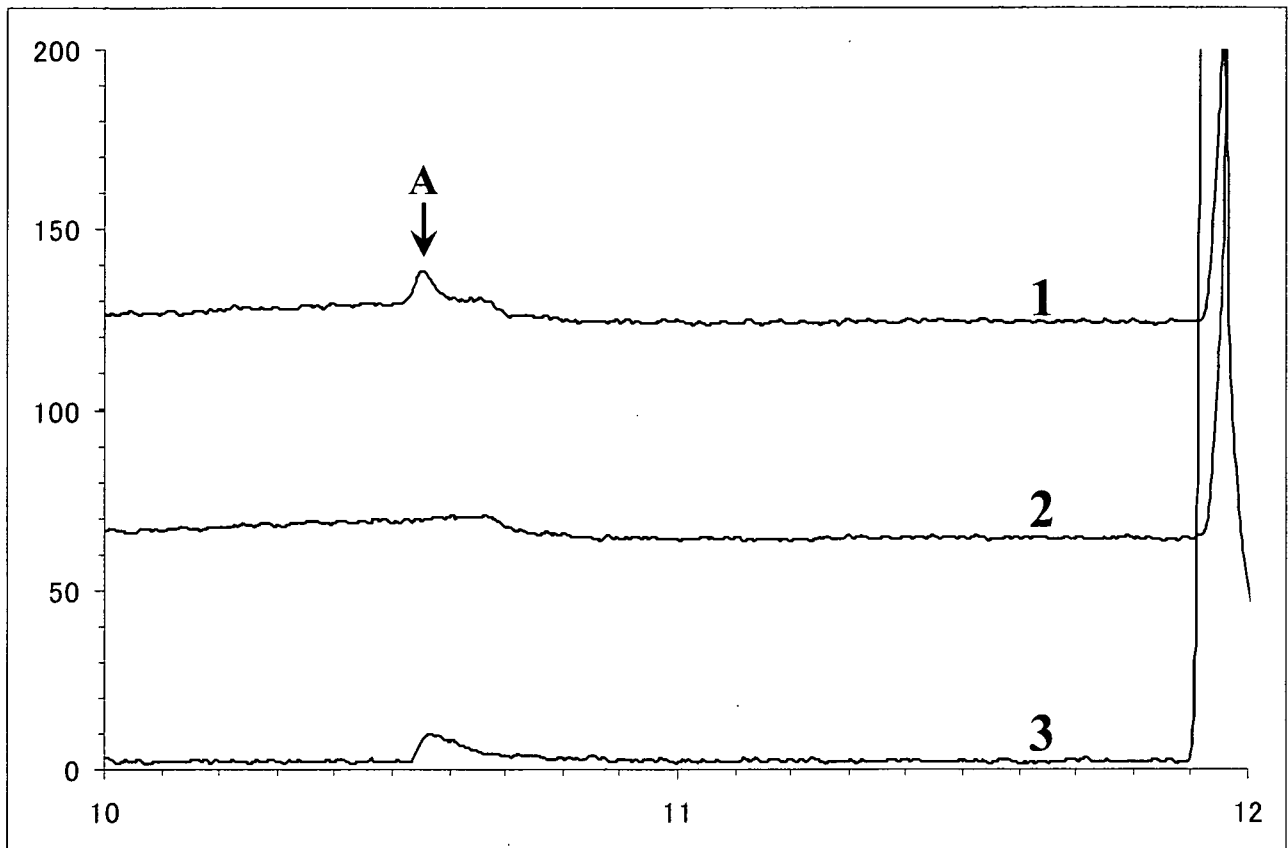


図5. 尿中メタミドホスの定性分析のクロマトグラム

- 1: 尿にメタミドホス (0.01  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加
- 2: 尿
- 3: メタミドホス-酢酸エチル溶液 (0.01  $\mu\text{g/ml}$ )
- A: メタミドホス

### 3) 結論

依頼された検体（血液，尿）からはジクロルボス（DDVP），メタミドホスは検出されなかった。検査した検体中にジクロルボス（DDVP）とメタミドホスが存在する可能性があるならば，その濃度は検出下限(0.01  $\mu\text{g/ml}$ )よりも低いと考える。

### まとめ

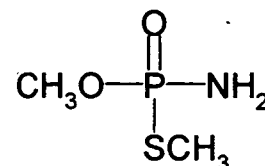
炎光光度検出器付ガスクロマトグラフによる生体試料中のメタミドホスの分析法を検討し，確立した。血液，尿中のメタミドホスの検出下限は 0.01  $\mu\text{g/ml}$  で，定量範囲はと 0.01  $\mu\text{g/ml}$ ～1.0  $\mu\text{g/ml}$  とした。

# LC-MS を用いた体液中メタミドホスの分析方法

東海大学東海大学医学部  
専門診療学系救命救急医学  
齊藤 剛

## 【はじめに】

メタミドホス (Methamidophos) とは有機リン化合物であり殺虫剤として使われるが、ヒトへの有害性が強い為、本邦では使用されていない。しかし、安価で殺虫効果が高いという理由から未だにメタミドホスを使用している国が存在する。本邦ではメタミドホスが使用されていないことから、輸入食品に対する残留農薬の検査対象化合物という位置であった。しかし、本邦においてごく最近、中国から輸入した餃子を食した後に有機リン中毒を惹起し、その餃子からメタミドホスが検出された事実が生じた。これまで、メタミドホスは食品における残留農薬という位置づけであったが、これをきっかけに中毒患者の検体からも検出を行う必要性が生じた。そこで今回、体液中メタミドホスの分析方法の検討を高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)で行ったので報告する。



メタミドホス

## 【LC-MS-SCAN】

LC : LC10

MS : QP8000  $\alpha$  APCI (+)

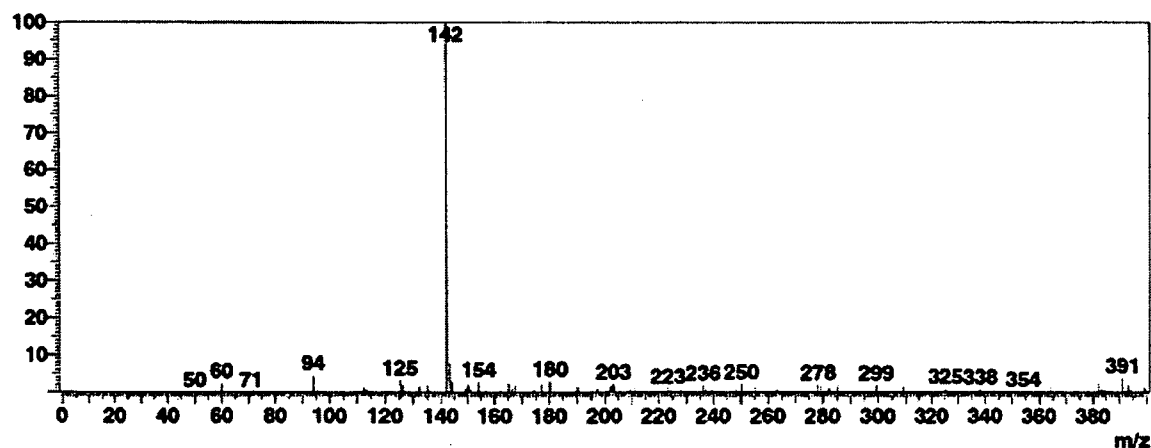
移動相 : A : 0.1%酢酸

B : 0.05%酢酸/メタノール

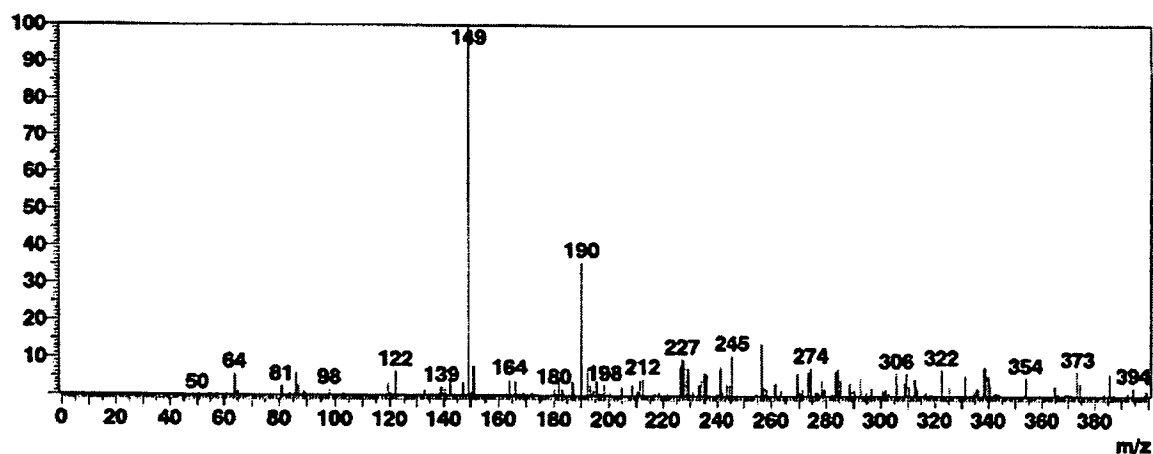
流速 : 0.2 mL/min

## 【マスフラグメント】

メタミドホスのマスフラグメント



アセフェート-d6 のマスフラグメント



【分析条件】

メタミドホスとアセフェート-d6 のベースピークイオンが m/z 142 と m/z 149 であったことから、下記の分析条件を設定した。

LC : LC10

MS : QP8000  $\alpha$  APCI (+)

カラム : XTerra MS C18

カラム温度 : 50°C

移動相 : A : 0.1%酢酸

B : 0.05%酢酸/メタノール

流速 : 0.2 mL/min

モニターイオン

メタミドホス : m/z 142

アセフェート-d6 : m/z 149

・メタミドホスとアセフェート-d6 のSIMクロマトグラフ

