

「健康管理へのガスクロマトグラフィーの利用」

(第247回ガスクロマトグラフィー研究会 特別講演会)

於； 国立公衆衛生院 講堂

2001年 12月 7日

日本分析化学会
ガスクロマトグラフィー研究懇談会

「健康管理へのガスクロマトグラフィーの利用」

第247回ガスクロマトグラフィー研究会 特別講演会 (2001年12月7日)
主催；日本分析化学会 ガスクロマトグラフィー研究懇談会
於； 国立公衆衛生院 講堂

目 次

I. プログラム

II. 基調講演

1. 「臨床検査における化学分析の役割」
(株) エスアールエル 医化学分析センター, 榎 佐和子…………… 1
2. 「ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC/MS) を用いる先天性
代謝異常症の診断システムの構築」
金沢医科大学, 久原とみ子…………… 11

III. 主題講演

1. 「有害物質に対する生体反応解明へのクロマトグラフィーの利用」
日本バイオアッセイ研究センター, 大西 誠…………… 21
2. 「尿中, 血中のVOCsのGC計測」
国立公衆衛生院, 村山留美子…………… 31
3. 「質量分析計をツールとする生体試料中の薬物・毒物およびその代謝物の分析」
(株) 三菱化学ビーシーエル, 植木真琴…………… 39

IV. 技術講演

1. 「SBSE(Stir Bar Sorptive Extraction) を用いるGC/MS法の紹介」
横河アナリティカルシステムズ, 中村貞夫…………… 43
2. 「ダグミックヘッドスペースGC/MS法による環境ホルモン調査項目の分析」
東亜D K K (株), 前田恒昭…………… 53
3. 「機器分析による口臭測定」
(株) 島津製作所分析機器事業部, 喜多純一 他…………… 59
4. 「SPMEを用いたカビ臭の分析及びその他の分析例紹介」
(株) 日立ハイテクノロジーズ ライフサイエンス事業統括本部, 本田俊哉…………… 69
5. 「室内環境における建材からの発生ガス測定手法の紹介」
ジールサイエンス(株), 星野邦広…………… 79
6. 「室内空気汚染物質の測定, 固相吸着-加熱脱着-GC/MS(チューブ法)」
(株) パーキンエルマー・ジャパン, 応用研究部…………… 97

V. 広告

VI. 会員名簿

【基調講演】

1. 「臨床検査における化学分析の役割」
(株) エスアールエル 医化学分析センター, 榎 佐和子
2. 「ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC/MS) を用いる先天性代謝異常症の診断システムの構築」
金沢医科大学, 久原とみ子,

臨床検査における化学分析の役割

株式会社エスアールエル
医科学分析センター
榎 佐和子

はじめに

広義の意味での臨床検査は図1に示すように「生体検査」と「検体検査」の2つに大別される。

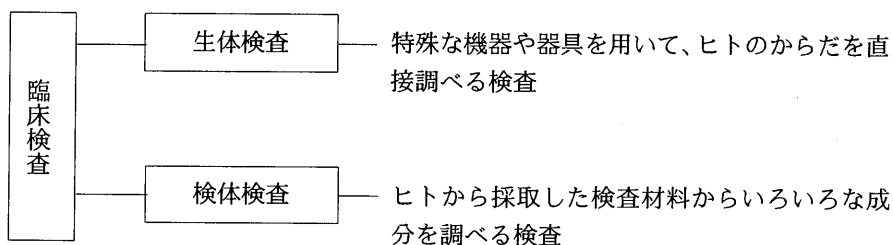


図1. 臨床検査の大別

診療の多くのプロセスの中において臨床検査は深い関わりをもっている。病気の疑いで診察を受けると、問診や視診、触診などとともに生体検査や血液、尿を採取して検体検査が行われる。医師はいろいろな角度から診察を行い、臨床検査から得られた結果を基にして診断を下す。そして、治療方針を決定して治療に入ることとなる。さらに治療後のプロセスにおいても、臨床検査は治療効果の判定などに使われる(図2)。

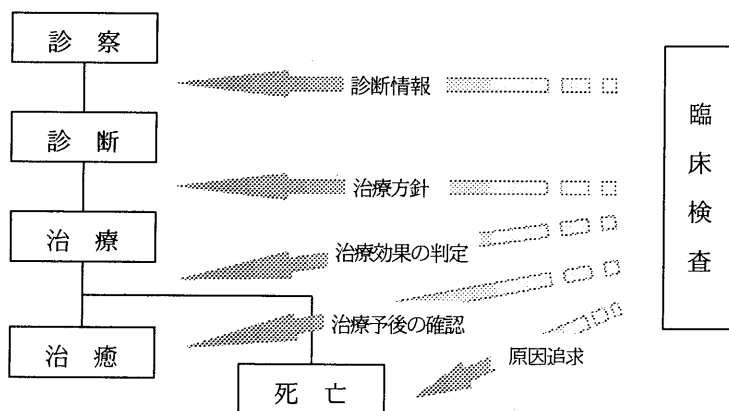


図2. 診療のプロセスと臨床検査

このように、臨床検査は医療に欠かせないものである。また、日々の進歩を続ける医学に対して臨床検査が果たしてきた役割は大きい。例えば、一昔前までは、癌は発見されれば、ほとんどが死に至る病であった。癌の研究が進み、外科的処置、抗癌剤投与などの化学的治療、放射線治療、遺伝子治療などの治療技術が進歩したのはもちろんであるが、臨床検査がもたらした早期発見、早期治療が、癌が死に至る病であることから脱却しつつあるという現実が大きく貢献している。

癌に限らず、様々な病気の早期発見、早期治療が可能となってきたことは、生体検査、検体検査である臨床検査の進歩がある。生体検査では、エレクトロニクス、コンピューターの目覚ましい進歩により、従来から実施されてきた心電図検査や脳波検査などに加え、MRI、CTスキャン、内視鏡といった画像診断の飛躍的な発展、検体検査では基礎医学、臨床医学などの研究が進み、新たな病気のマーカーの発見、その検査法の確立、検査機器の発展がそうである。これらを総合的に応用することによって、医学が大きく進展したのである。

今回、臨床検査を狭義の意味での検体検査に限って、化学分析、特にクロマトグラフィーとの関わりについて述べたいと思う。

臨床検査と化学分析の関わり

臨床検査の分野は内分泌、生化学、免疫血清、細菌、血漿蛋白、遺伝子・染色体、血液凝固系、薬物分析、病理・細胞診など、多岐にわたっている。検査手法ではラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、クロマトグラフィー、生化学的手法 (酵素法、比色法など)、形態学的手法 (鏡検) などが知られている。その手法の中で、生化学的手法、クロマトグラフィー、EIA、RIAなどが化学分析と非常に関わりが深い。

私たちが健康診断を受けた時や具合が悪くなって病院に行った時に血液や尿を採取されて行われる、いわゆる基本的な生化学検査はまさに化学分析からスタートしている。

たとえば、一般的な健康診断の項目であり、また、腎機能障害を疑う時に必ず検査項目に入るクレアチニンの代表的な検査方法である Jaffe 法の原理は図3の通りである。

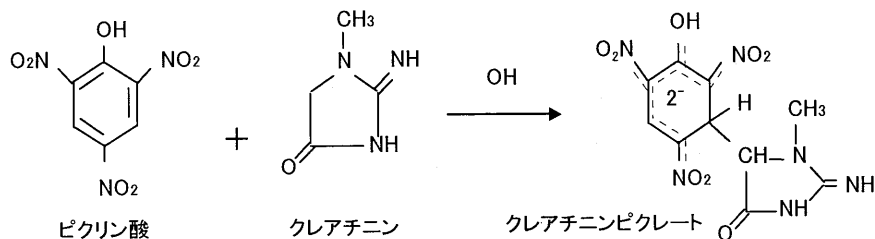


図3. Jaffe 法(クレアチニン測定)の反応式

臨床検査が行われ始めた頃、上記のような生化学検査は1項目ずつ臨床検査技師が1本1本の試験管の中で行い、反応液を1本ずつ角セルに移して分光光度計で吸光度を測光して、さらにマニュアルで計算をしてデータを出していた。

ところが、1970年代前半に自動分析機が生化学検査室に登場してから臨床検査の様子は大きく変わっていくことになる。短時間で大量のサンプルを数十項目以上処理できる自動分析機は、当然のごとくコンピューターに接続され、データ処理および配信まですべて自動に行えるようになった(図4)。

現在においては、E I A、生化学的手法において行われる汎用的な臨床検査は、より急速に自動化が進んできている。大量のサンプルを短時間で処理することで、臨床検査に求められている「医師の元に正しく早く検査結果を戻す」という最大の目的を果たすためである。もちろん、自動化されている検査項目の試薬はキット化されており、携わっている検査員にとってはその測定原理だけが化学分析とつながっているだけで、実際の手技において化学分析とのつながりを感じることは少ないのが現実である。かつては1本1本の試験管内で行われていた反応は、検体をセッティングするだけで自動分析機の中で目を見張るスピードで行われるのである。

また、生化学検査の将来を考えると、電子工学の進歩が劇的な変化をもたらす可能性がある。すでに実用化されつつあるが、マイクロチップを埋め込んだバイオセンサーがその主役となる。バイオセンサーはいろいろなタイプがあるが、臨床検査と関わるのは、小型、携帯型のもので、いずれベッドサイドで生化学検査が瞬時に行われるようになり、病院や検査センターでは生化学検査室が様変わりするかもしれない。

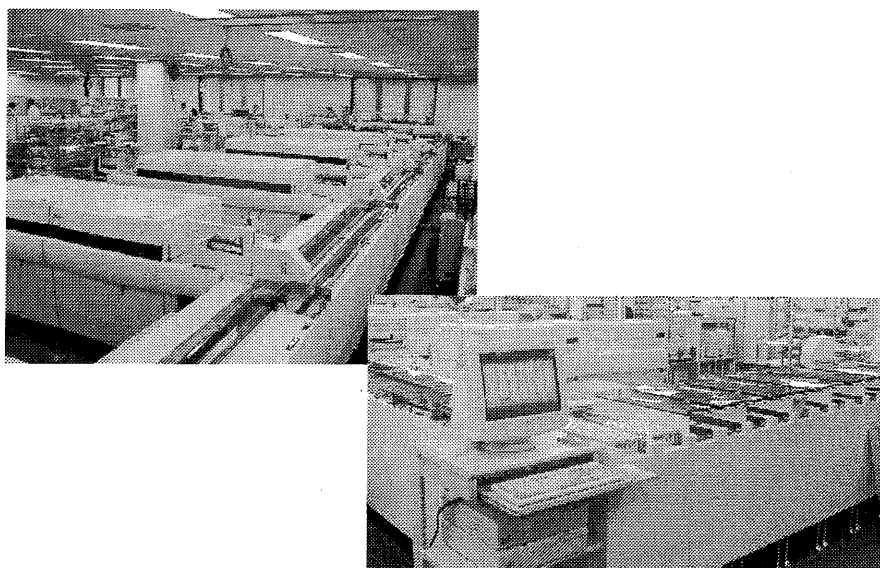


図4. 生化学検査室の様子

しかし、現在においても検査員と密接に化学分析とつながっている臨床検査がある。それはクロマトグラフィーを利用した検査である。生体内のある成分をクロマトグラフィーで測定するときには、ある程度まで目的の成分を精製しなければならない。精製工程では液-液抽出や固相カラム抽出などの手法を取り入れるが、目的成分の化学的性質と一般的な化学の知識を理解していなければ、最適の条件を探すのに苦労することとなる。また、目的ピークに夾雑ピークが重なる場合には、移動相の組成や分析条件を変更しなければならない。そのためにもやはり化学分析の基礎的な知識が必要となり、その知識を駆使しなければならないのである。

臨床検査におけるクロマトグラフィーの役割

臨床検査の長い歴史の中でクロマトグラフィーが取り入れられ始めたのは、1970年代である。エスアールエルでは、ステロイドホルモンである17ケテストステロイド3分画（アンドロステロン・エチオコラノロン・デヒドロエピアンドロステロン）の測定にガスクロマトグラフィー（GC）がはじめて導入された。その後、アミノ酸分析や副腎髄質ホルモンであるカテコールアミン類の多成分分析に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が次々と取り入れられ、また、質量分析計（MS）が検出器として導入されてからは、GC/MS、LC/MSが使用され始め、臨床検査におけるクロマトグラフィーの位置付けを確固たるものとした。

表1. クロマトグラフィーを用いた検査項目の例

分野	検査項目	主な検査法
内分泌	カテコールアミン分画	HPLC-ECD, HPLC-FP
	セロトニン	HPLC-ECD, HPLC-FP
	17-KS分画	GC-FID
血漿蛋白	ヘモグロビンA1C	HPLC-UV (専用システム)
血液凝固系	ビタミンK分画	HPLC-ECD
生化学	脂肪酸分画	GC-FID
	ビタミンA	HPLC-FP
	アミノ酸分析	HPLC-FP
	尿中馬尿酸	HPLC-UV
	尿中総三塩化物	GC-ECD
	有機酸分析	GC/MS
薬物分析	クロナゼパム	HPLC-UV
	メキシレチン	HPLC-UV
	アミオダロン	HPLC-UV

現在、クロマトグラフィーを用いて検査が行なわれている分野は多岐にわたっている（表1）が、新しく検査を導入する時はクロマトグラフィー法を用いていても、現在はE I A法になっている検査項目も少なくない。測定方法を開発しようとする生体成分の分子量が比較的小さなものは、まずクロマトグラフィーを用いて試みるものが多くあったが、その成分がある診断に有用であるとすると、ほとんどがキット化されてE I Aにとって替わってしまったからである。また、現在は、ある生体成分の検査が診断の有用性が高いと判断されると、すみやかに抗体が作製されてキット化が行われる。

臨床検査においては、もはや限られた項目、特殊な項目のみにクロマトグラフィーが用いられているといっても過言ではない。クロマトグラフィーを用いるほとんどの検査が前処理工程に精製や誘導体化を必要としてサンプルを大量処理できないばかりか、その処理に何時間もかかってしまううえに、さらに測定に1件あたり10～30分間（長いものは1時間以上）もかかるという最大の欠点を持っているからである。オートサンプラーを使用し、かつ数多くの装置を導入しても、このクロマトグラフィーもっている臨床検査における最大の欠点は100%を補うことはできない（表2）。

表2. クロマトグラフィーと自動分析の処理能力比較

検査法 (検査項目)	クロマトグラフィー		自動分析機 (生化学検査項目)
	(アミノ酸分析)	(カテコールアミン)	
1時間あたり テスト数	分析時間として 1テスト	分析時間として 4テスト	800～1800テスト
同時分析 項目/分画数	分画数 41	分画数 3	項目数 80～100
前処理	除蛋白操作のみ	除蛋白操作のみ	なし

しかし、臨床検査においてクロマトグラフィーがその位置を確固たるものに行っているのには、理由がある。先に述べたように検査項目の成分毎の分画を測定できるということと、非常に特異性、正確性が高いという点である。

このクロマトグラフィーの長所は、現在から今後に向けて、臨床検査が患者さんの診断や治療のために必要であるという範囲を越え、われわれの健康に貢献するというより広い意味で捉えられるときに発揮されると考えている。

臨床検査の新分野における化学分析（クロマトグラフィー）の発展

われわれの健康に貢献するために生体成分を測定するという広義の意味で臨床検査を捉えて、化学分析、特にクロマトグラフィーに焦点をあてると、今後発展していくのは次の分野であろう。

それは、① 新薬開発における薬物濃度分析、② 生体中の環境ホルモン類分析、③ ポストゲノムと言われているプロテオーム解析によってもたらされるタンパク質の定性・定量である。

新薬開発における化学分析の役割

病気の治療を目的として、製薬メーカーにおいて新薬が開発されるが、新規化学物質の創製の段階で、構造解析の手段のひとつとしてHPLCに質量分析計を2台接続したLC/MS/MSが使用されることが多い。また、LC/MS/MSは血中や尿中の新規薬物濃度測定にも適用される。薬物分析方法を開発するためにHPLCを使用すると目的成分を単一のピークにするためのさまざまな手法を必要とするが、LC/MS/MSを使用することで、このさまざまな手法を簡略化でき、効率的に開発研究を進めることが可能となるからである。

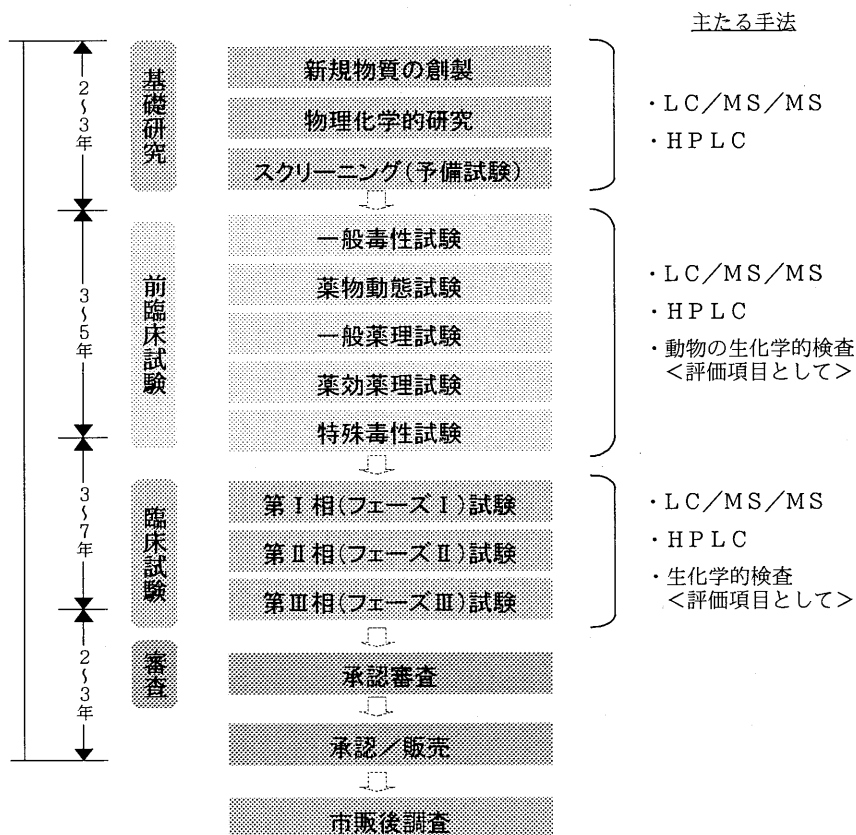


図5. 新薬開発のプロセスと化学分析の関わり

新薬の開発は、新規物質の創製から新薬としての承認を受けるまでにおよそ 10 ～ 18 年の期間が必要となる。その過程で、化学分析を中心として臨床検査は重要な役割を果たす (図 5)。

現在、新薬の開発は、厚生労働省から、安全性試験の実施に関して平成 9 年 3 月 26 日にだされた「GLP 省令 (厚生省令第 21 号)」、臨床試験の実施に関して平成 9 年 3 月 27 日にだされた「GCP 基準 (厚生省令第 28 号)」に基づいて行われる。そして、これらの省令に加え、近年の薬の副作用から起きている問題から、新薬の開発に対する厚生労働省の審査は非常に厳しいものとなっている。また、新薬開発にかかる費用削減や開発の効率化を考慮して、製薬メーカーは安全性試験 ～ 臨床試験までを全面的に外部委託するケースが多くなっている。

臨床検査としては、主に臨床試験 (いわゆる治験) での新薬の治療効果判定、副作用判定の補助的な評価として生化学検査、血液尿一般検査などを役割としてもち、そして同時に新薬開発において最も重要な薬物濃度測定が行われる。エスアールエルの生化学検査は、実はこのような治験からの依頼が約 20 ～ 30% も占めている。

一方、薬物濃度測定は、かなり臨床検査とは趣が異なる。これは、新薬承認審査までの安全性試験、臨床試験の薬物投与に対する生体の薬物濃度が治療効果、副作用の判断に重要な意味をもつためである。薬物濃度測定は先に述べた GLP 省令、GCP 基準に厳密にしたがって実施しなければならないのである。

生体内環境ホルモン類検査の現状と役割

近年、環境ホルモンと称される化学物質 (図 6) が、人の健康に及ぼすいろいろな影響が取り沙汰されている。ダイオキシン類、PCB、ビスフェノール A、DDT など人類が科学的進歩とともに作り出した、もしくは作り出してしまったものと、植物エストロゲンなどのように、もともと自然界に存在していたものがある。

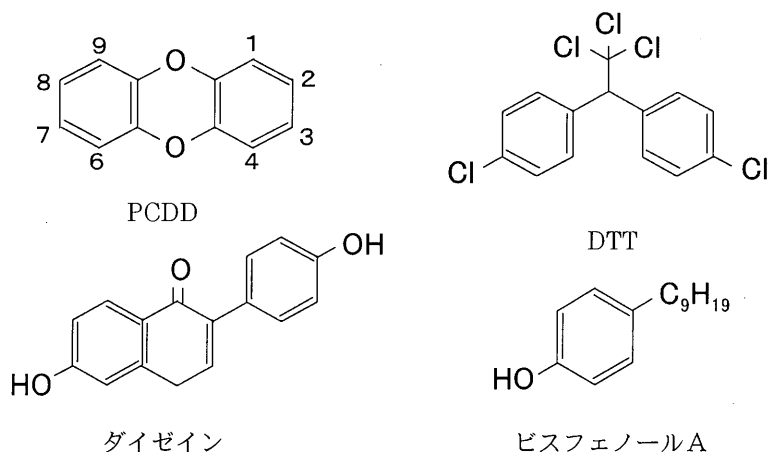


図6. 主な環境ホルモンの構造式

これら環境ホルモン類の多くはエストロゲンレセプターに結合し、エストロゲン作用ないし、抗アンドロゲン作用を有することが知られており、生体内に取り込まれると正常なホルモン作用に影響を与えることから、内分泌攪乱物質とも呼ばれている。

人類が作り出してしまった史上最強の猛毒といわれているダイオキシン類は異性体が400種類以上も知られているが、血液中、母乳中などの生体成分では、その中で特に毒性の強い29種類について測定が行われている。

血液中のダイオキシン類は下記に示す工程で4～5日かけて前処理(図7)され、高分解能GC/MSによって分析される(2,3,7,8-TCDDのSIM測定のカロマトグラムを図8に示す)。そして、それぞれの異性体に設定されている毒性等価係数(毒性等量)をかけて算出する。この毒性等価係数は、ダイオキシン類のなかで、最も毒性の高い2,3,7,8-TCDD(2,3,7,8-テトラクロロジベンゾパラジオキシン)に合わせて毒性を換算するための係数で、国際的に統一されている。

これらの環境ホルモン類が生体にどのように影響を与えるかを知るには、まず生体内に取り込まれている量がどれくらいかを正確に知る必要がある。生体中に微量に含まれている環境ホルモン類の測定には、クロマトグラフィーを用いるのが主流となっているが、中でも高分解能GC/MS、LC/MS/MSが、感度や特異性の高さから用いられることが多い(表3)。

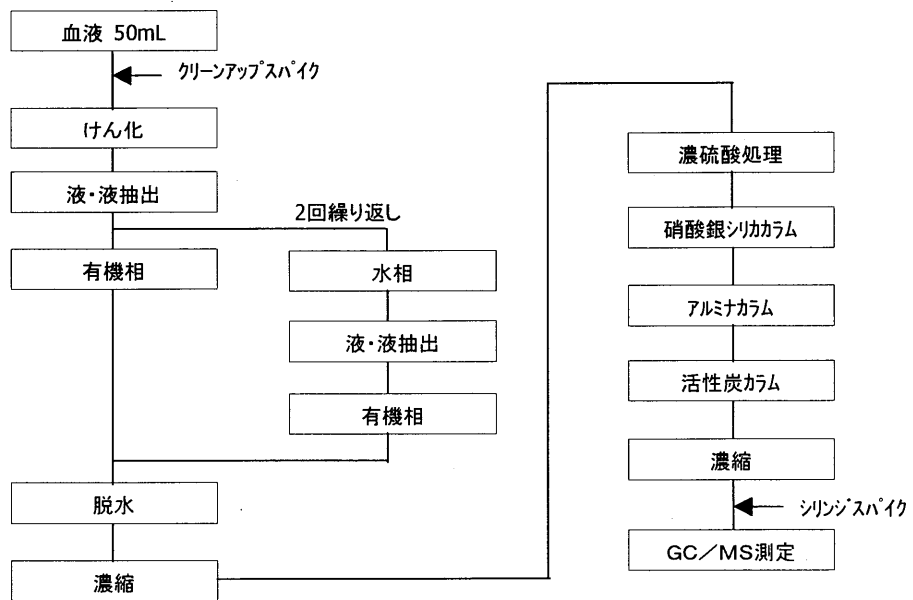


図7. ダイオキシン類前処理フロー

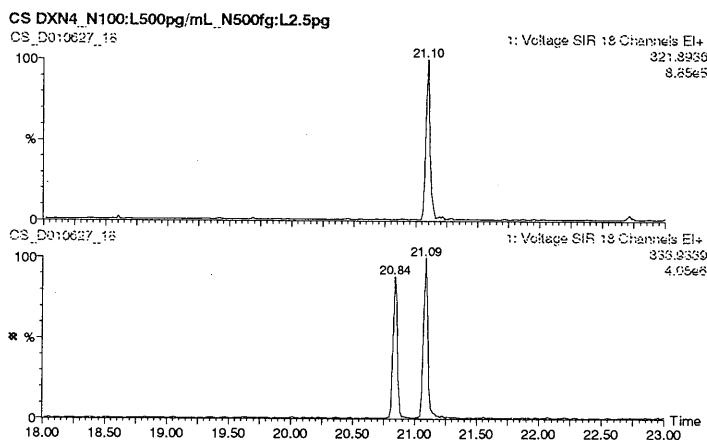


図8. 2, 3, 7, 8-TCDDのSIMクロマトグラム

ダイオキシン類やビスフェノールAなどはE I Aキットの開発が盛んに行われているが、生体試料への適用には、正確性（交差性）や定量下限値の問題がクリアにされていないのが実情であり、実用化にはまだまだの段階と考えて良いだろう。

このように環境ホルモンの生体への影響のメカニズムを解明していくうえで、また、暴露量を知るうえで、生体中の環境ホルモン類の分析にクロマトグラフィーが活躍し続けることは間違いが無いといえる。

表3. 主な環境ホルモンの影響と測定方法

環境ホルモン	カテゴリー	主な生体への影響 (推測を含む)	代表的な測定方法
ダイオキシン類	ポリ塩化有機化合物	生殖毒性 免疫毒性 発ガン性 催奇形性 抗甲状腺ホルモン作用	高分解能GC/MS
PCB	ポリ塩化有機化合物	生殖毒性 免疫毒性 抗甲状腺ホルモン作用	GC 高分解能GC/MS
DDT	有機塩素系農薬	生殖毒性	GC
DDE		エストロゲン様作用	
ビスフェノールA	フェノール類	エストロゲン様作用	LC/MS/MS
アルキルフェノール			HPLC GC/MS
ダイゼイン	植物エストロゲン	エストロゲン作用	LC/MS/MS
ゲニステイン			HPLC

プロテオーム解析へのクロマトグラフィーの役割

ヒトゲノム解析の結末が見えてきている今、遺伝子産物であるタンパク質の機能についての研究が進められている。ポストゲノムとして脚光を浴びているプロテオーム解析がそれである。

プロテオーム解析には二次元ゲル電気泳動システム、LC/MS/MSの他に、さまざまなイオン化法と分析部を組み合わせた質量分析装置が用いられている。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)、イオントラップ型質量分析計(IT-MS)、エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析計(ESI Q-TOF MS)などである。すでに海外では最新鋭の質量分析計を用いてプロテオーム解析が大きな規模で行われており、国内でもますます研究が盛んになってくるものと考えられる。さらに、高分解能、高感度、ハイスループットを目指した質量分析計の開発が進められており、また、質量分析の結果から構造を解析する、あるいはデータベースを解析するといったソフトウェアの開発も目覚しく進歩している。これらの進歩はプロテオーム解析をより一層発展させるであろう。

かつて、遺伝子解析は遺伝子検査、遺伝子治療へと繋がり、医療の発展や臨床検査の拡大に大きく貢献した。同様に、生体試料中のタンパク質の解析が進み、知られていなかったタンパク質の定性的、定量的な変化が捉えられることによって、新たな疾患に対する検査法の開発、新規薬剤の創製へと繋がっていく可能性が高いと考えている。

おわりに

試験管の中の化学分析からスタートした生化学的検査は大きな変遷を経て現在に至り、そして将来においても変遷を続けていくものと考えられる。

今までの変遷において、生化学検査の中で亜流ともいえるクロマトグラフィーが果たしてきた役割は、EIAへのつながりであり、他に適切な検査法がないための補完的なものであるが多かった。しかし、過去においても、将来においても、新たな生体成分の分析法を開発するひとつの大きな柱はクロマトグラフィーである。装置の進歩と医学の発展が今まで以上にクロマトグラフィーに活躍の場を与え、医療へ貢献していこうと考えている。

ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC/MS) を用いる

先天性代謝異常症の診断システムの構築

金沢医科大学総合医学研究所
人類遺伝学研究部門 生化学
久原 とみ子

はじめに

先天代謝異常症 (inborn errors of metabolism, IEM) は DNA の異常が原因で、代謝を司る酵素の構造変化や酵素産生量の低下、あるいは補酵素の供給に支障を来し、酵素反応が著しく障害される結果おきる疾患である。先天代謝異常症には一般検査や臨床像からの診断が困難な疾患が多い。しかし、患者では健常人とは明らかに異なり、障害された反応の基質や、基質が増加したことに起因する副産物として、特定の有機酸、アミノ酸、糖アルコールなどの低分子量の代謝中間体が尿や血液などの体液に顕著に増加する。これらの代謝中間体をキャピラリー ガスクロマトグラフィー・質量分析法 (GC/MS) により同定し、障害された反応、したがって、異常酵素を、ついで、その構造遺伝子の異常を予測し、病名を化学診断できる。尿や血液に蓄積した低分子化合物を同定することでその病因を特定できる疾患で、同定に GC/MS が用いられた場合、その手法の厳密さ故に、確定診断とされることが多い。

先天代謝異常症の中で有機酸およびアミノ酸の代謝異常症は幼少児期に重度のケトアシドーシス、嘔吐、低血糖、高アンモニア血症、嗜眠、昏睡等の急性症状を呈し、つい最近まで、この時期の死因の重要なもののひとつであった。生存し得ても重度の精神発達遅滞を起こすなど難治性のものが多い。しかし、その中のかなりの疾患は特殊な食餌療法などを早期に導入することにより正常な発育が可能であり、そのためには早期診断が欠かせないことが理解されるようになった。わが国でも早期診断、早期治療を目的にろ紙血を用いたフェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシチン尿症、ガラクトース血症などの先天代謝異常症の新生児スクリーニングが、1975年から施行されている。しかし、これ以外の多くの先天代謝異常症では発症前にも診断でき、早期の発症前診断による早期治療が最も有効であるにも拘らず、現実には発症していても、尿を用いる化学診断法の存在を知らない、又はその精度が一定でない等で、診断されずにいる患者も少なくないと思われる。金沢医科大学総合医学研究所人類遺伝学研究部門 生化学では、GC/MS を用いる自動診断システムの構築を目的とした定量の高精度化、自動化、新規疾患の診断法の開発を行っている。尿を用いる新生児スクリーニング試験研究も行っている。本稿では下記の項目について最新の成果も含めて紹介したい。

- ・ 先天性代謝異常症ハイリスク患者の化学診断
- ・ 試料としての尿と血液の比較、尿試料採取上の注意点
- ・ ウレアーゼ法
- ・ 先天性ピリミジン代謝異常症患者を抗がん剤 5-FU による致死的な副作用から予防する
- ・ ろ紙尿を用いるプロピオン酸血症等 22 項目の新生児スクリーニング試験研究
- 多種の疾患が高率に検出できる、日本人には軽症型プロピオン酸血症が多い
- ・ 日本医用マススペクトル学会精度管理委員会活動
先天性代謝異常症検査 [D010 特殊分析]
- ・ 腎不全患者群から蔞酸結石(オキザロース)特型を化学診断：肝移植前後のモニタリング

I. 先天性代謝異常症ハイリスク患者の化学診断

我が国における GC/MS を用いた先天性代謝異常症の化学診断のあゆみは、1976 年、当時、久留米大学で松本 勇（現金沢医科大学名誉教授）が GC/MS によるハイリスクスクリーニングを開始したときに遡る。1977 年、22 疾患の依頼分析を開始し、1982 年、アミノ酸分析を併用して 75 疾患に拡張した。1983 年、金沢医科大学で DX-300 GC/MS を導入し、100 疾患に拡張、1985 年には、DX-303 を増設して 120 疾患以上に拡張、1995 年には、4 研究機関で新生児スクリーニング試験研究を開始した。2000 年には GC/MS による化学診断を柱のひとつとして活動している、日本医用マススペクトル学会に精度管理委員会が設置された。

II. 試料としての尿と血液の比較、尿試料採取上の注意点

尿、血清、脳脊髄液などの体液や組織などを含む生体試料のうち最もよく分析に用いられるのは尿である。その理由は単に採取しやすいだけでなく、脂肪酸長鎖のモノカルボン酸やモノヒドロキシモノカルボン酸、中・長鎖ジカルボン酸、フィタン酸などの脂溶性の高い有機酸は例外として、尿が非常に多くの代謝中間体を含有し、したがって得られる情報量が他の試料と比較にならないほど多いからである^{1, 2)}。通常腎で再吸収される成分（多くの糖やアミノ酸など）で尿では検出されにくいものでも、病態により血中の濃度が閾値を超える時は尿中に多量に排泄されるので、代謝障害を血液を用いるよりも鋭敏に観察できる。

尿は原則として早朝初回尿を用いる。尿は清浄な容器に採り速やかに凍結し、分析直前まで -20℃ 以下で保存する。血清では有機酸の濃度を評価する場合は単位容積当たりでよいのに対し、尿では同一試料尿のクレアチニン濃度に換算することが必要である。筆者らは尿採取が簡単であることや以下に述べるような理由から初回尿や随時尿を用いている。初回尿を用いるのは食事や投薬の影響が最も少なく、患者の代謝特性が観察しやすいからである。採尿は早朝 1 回尿、発作時尿、随時尿のいずれか、やむを得ず導尿するときは開始、終了時間を記録する。

ほとんどの有機酸血症では、症状のない寛解期にも疾患に固有の代謝中間体が増加しているため、早朝尿で化学診断できる。しかし、感染、飢餓、運動負荷などが引き金となって急性症状が発現する脂肪酸代謝異常症や糖新生系異常症では、平時は代謝中間体の蓄積が少なく、化学診断の精度が著しく低下するので、発作時の尿が必要である。また、発症期から回復期にかけて代謝動態を反映して、尿中有機酸プロファイルは同一個人でも短時間に劇的に変化し、蓄尿では多くの場合これらの変化が相殺されるので、分析に必要な尿量が得られるなら蓄尿しない方がよい。

尿は可能な限り治療開始前に採取する。尿素回路異常症で蛋白制限開始後、糖新生系異常症で低血糖発作中とはいえ、ブドウ糖投与後、あるいはチロジン症でフェニルアラニン、チロジン制限開始後は尿代謝物プロファイルは速やかに正常化するため化学診断は難しくなる。フィッシャー輸液などの使用も疾患によってはデータの解釈を複雑にし、あるいは誤らせる。したがって、治療内容にもよるが、可能な限り治療開始前の尿を採取することが望ましい。また、試料採取前後の治療内容はデータ解釈から化学診断に至るまでの重要な情報である²⁾。

III. ウレアーゼ法

著者らは Shoemaker ら³⁾ のウレアーゼを用いる前処理法を大幅に変更し、尿の有機酸、アミノ酸、脂肪酸、糖、糖アルコール、核酸塩基類を簡便に一斉分析できる尿の簡易ウレアーゼ処理・GC/MS 法を開発した(松本、久原の方法)⁴⁻⁶⁾。従来の尿の前処理法である有機溶媒抽出では、モノカルボン酸やジカルボン酸や中性化合物のみが分画され、極性の強いトリカルボン酸や有機酸ではないアミノ酸、糖、糖アルコール、プリン、ピリミジン塩基などは尿素とともに水層に残されて有機溶媒層に移行せず、そのため分析できなかった。本法では TMS 化されて揮発性の化合物に変えられる大部分の尿中低分子化合物が GC/MS 分析できるため、従来とは大いに異なり代謝上、多次元の解析ができる⁷⁾。

室温融解した尿あるいは尿ろ紙から溶出した尿 0.1ml に内部標準物質として一定量の D3-creatinine、n-heptadecanoate、2,2-dimethylsuccinate および重水素標識したアミノ酸を添加後、30 単位のウレアーゼ (Type C-3, Sigma) を加え、37℃ で 10 分間反応させ、尿中に大量に含まれ分析を妨害する尿素をアンモニアと炭酸ガスに分解して除去する。この反応液に 0.9ml のエタノールを加え 10,000g 3 分間の遠心でウレアーゼを除蛋白操作で除去する。得られた上清をエバポレーターで減圧濃縮し、次いで窒素気流下で乾固の後、BSTFA と trimethylchlorosilane (TMCS) の混合液 (10 : 1) を 100 μ l 加え、80℃、30 分間加熱して TMS 誘導体とし GC/MS 分析の試料とする。血清と異なり尿は蛋白を含まないが、添加したウレアーゼを除蛋白する必要がある。従って、エタノール終濃度 90% は絶対条件ではなく、0.2ml の尿に 0.8ml のエタノールを加えてもよい。最近の GC/MS は分離能、感度が高いのみでなくダイナミックレンジが非常に大きい (~100 万) ので新生児尿でも尿量は一定で 0.1ml と少量で十分であった。成人尿ではさらに 3~5 倍の希釈尿が望ましいこともある。

また、尿をウレアーゼ処理しアルコール除蛋白、濃縮乾固後 TMS 化する新しい尿試料調製法ではクレアチニンも回収できる。したがって、試料調製に先立って重水素標識クレアチニンを一定量加えておくと、クロマトグラフィーで標識体と非標識体の比からクレアチニン濃度を知ることができる。但し、この方法ではクレアチンがクレアチニンに変化するため、高い値（和）となるが、化学診断には十分であると考えられる。とは言え、一般にはクレアチニンを基準にするので、別途、オートアナライザーでクレアチニン、クレアチンを測定し、両方の値を保存し、比較検討している。上述のウレアーゼ処理により調製した試料 0.2~1 μ l を 10 : 1 から 30 : 1 の間のスプリット比で GC/MS に注入し測定する。

表 1. 簡易化された前処理法と GC/MS 測定に要する時間

尿の分画・前処理法	前処理 (時)	GC/MS 測定 (分)
ウレアーゼ法による一斉分析		
我々の方法	1*	15
Shoemaker の方法	5	60
従来の有機酸分析		
有機溶媒抽出法	5	30~60
Sweetman らの硅胶カラムを用いる方法	10	30~60
DEAE-Sephadex カラムを用いる方法	14	30~60

*バッチ法では 30 検体/3hr

IV. 先天性ピリミジン代謝異常症の診断

従来法では不可能であったがウレアーゼ法を用いることで高精度の診断が可能になった新規疾患として先天性ピリミジン代謝異常症がある。そのねらいは患者（多くは潜在的）を抗がん剤 5-FU などのピリミジンアナログによる致死的な副作用の発生から予防するためである。

Thymine や Uracil 等のいわゆるピリミジンの異化経路における Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)欠損症、および Dihydropyrimidinase (DHP)欠損症は常染色体劣性遺伝病である。発生率は比較的高く、臨床像は無症状も含め、多様である。抗がん剤として広く使用される 5-Fluorouracil 等のピリミジンアナログは本異化経路で分解され、これらの投与による致命的な副作用が初発症状となる例が報告されている。ピリミジンアナログの副作用を予防するための潜在的なピリミジン代謝異常症の迅速・高精度スクリーニングについて検討した。

その結果、尿-ウレアーゼ処理・GC/MS 分析法を用いて、DPD 欠損症と DHP 欠損症

の鑑別診断法を確立できた⁷⁾。DPD 欠損症では Uracil と Thymine の顕著な増加を認めた。DHP 欠損症では 5,6-Dihydrouracil と 5,6-Dihydrothymine の顕著な増加、Uracil と Thymine の軽度増加を認めた。¹⁵N₂-Uracil を内標準とした本法ではこれらの回収率、CV 値は良好で、従来の感度、特異性、定量性について大きな改善をみた。以上より、本法は 5-Fluorouracil 投与前の癌患者のスクリーニングおよび迅速な診断に有効であることが確認された。

本研究は米国化学会発行のModern Drug Discovery誌のNews in Briefで紹介された⁸⁾。

表 2. 5-FU 毒性

欠 損	Homozygote	Heterozygote
DPD	+ ^a	+ ^a
DHP	+ ^b	- ^c

a: have described

b, c: have suggested by uracil-loading test

V. ろ紙尿を用いるプロピオン酸血症等22項目の新生児スクリーニング試験研究

有機酸、アミノ酸、脂肪酸、糖、糖アルコール、核酸塩基類を簡便に一斉分析できる尿の簡易ウレアーゼ処理・GC/MS 法を用いて、金沢医科大学、久留米大学、島根医科大学、千葉県こども病院を含む国内4機関合同で平成7年度から、検索対象疾患として表3に示すように、現行の新生児マススクリーニングの対象疾患4疾患を含めた22疾患を選定して、先天性代謝異常症の新生児スクリーニング試験研究を開始した⁹⁾。¹⁰⁾。それ以外にも異常を認めたものは収集した。両親のインフォームドコンセントを得て、ガスリー採血と同日に採尿、ろ紙尿として搬送すること、新生児に何らかの臨床上的異常所見を認めるときは、生直後でも直ちに採尿し分析することなどを申しあわせた⁹⁾。

ところで、ろ紙尿を用いて、尿中有機酸をGC/MS分析することでスクリーニングを開始したのはTuchmanら¹¹⁾である。尿中代謝物を一斉分析し、プロピオン酸血症等22項目の疾患を対象とした、ろ紙尿を用いる新生児スクリーニング試験研究が開始され、5年が経過した。国内4機関で計4.7万人を対象とし、異常例の発見率は1/1,394人であった。これは欧米でのろ紙尿のタンデムMSを用いる新生児スクリーニングの発見率¹²⁾の2.5倍、同手法を用いた我が国での試験研究の発見率の4倍も高い数値である。即ち、表4に示すようにウレアーゼ法を用いた4試験機関の成績は総数47,400児を検査し、プロピオン酸血症、高フェニルアラニン血症、シトルリン血症、メチルマロン酸尿症、2-アミノアジピン酸尿症、グリセロール尿症を含む計34例を発見し、1/1,394人の高

い発見率であった。なお、表5に示したように、現行の先天代謝異常症4疾患を対象とした新生児スクリーニングの22年間の発見率は1/16,385人である。ガスリー法は実に簡便であるが、項目が増えるごとに手法が追加される。これに対し、MSを用いる方法はろ紙血のタンデム法であれ、ろ紙尿のGC/MS法であれ、20以上の疾患を一斉に検索できる。さらに、尿のGC/MS法はろ紙血を用いたタンデムMS法に比較して化学診断の精度が格段に高いが、試験研究で病気の発見率も高いことが認められた。本法では新生児一過性ガラクトース尿症や、未熟児に多い新生児一過性チロシン尿症も検索できる¹²⁾。一過性のものは真性のガラクトース血症やチロシン血症のパターンとは明らかに異なり、鑑別できる。このような一過性異常も、シトルリン血症II型の病態研究やヘテロ検索や肝障害予防に役立てられる。

金沢医大、久留米大を中心とした成績から、日本人には軽症型プロピオン酸血症が多いことが分かった¹⁰⁾。(推定60例 / 120万人)

表5には現行の新生児スクリーニングで発見される先天代謝異常症およびその発見率と血中指標物質を、表5右欄にはウレアーゼ法を用いる新生児スクリーニング試験研究における尿中指標物質を示した。

表 3. 尿を用いる新しい新生児スクリーニング検査法で発見できる疾患

- 1 メチルマロン酸尿症
- 2 プロピオン酸血症
- 3 イソ吉草酸血症
- 4 β -メチルクロトニルグリシン尿症
- 5 β -ヒドロキシ- β -メチルグルタル酸尿症
- 6 β -ケトチオラーゼ欠損症
- 7 マルチプルカルボキシラーゼ欠損症
ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症
ピオチニダーゼ欠損症
- 8 グルタル酸尿症 I 型
- 9 高チロシン血症
- 10 オルニチントランスカルバミラーゼ以降の尿素回路異常症
OTC 欠損症
シトルリン血症
アルギニノコハク酸尿症
アルギニン血症
- 11 ジカルボン酸尿症 (グルタル酸尿症 II 型を含む)
- 12 高乳酸血症
- 13 グリセロール尿症
- 14 アルカプトン尿症
- 15 ピログルタミン酸尿症
- 16 α -アミノアジピン酸- α -ケトアジピン酸尿症
- 17 ニ塩基性アミノ酸尿症 (シスチン尿症、リジン尿症)
- 18 高グリシン血症
- 19 メープルシロップ尿症
- 20 フェニルケトン尿症・高フェニルアラニン血症
- 21 ガラクトース血症
- 22 高メチオニン血症/ホモシスチン尿症
(23 神経芽細胞腫)

表4 新生児スクリーニング4試験研究機関で発見された疾患と症例数

疾患 / 機関	合計	金沢医大	久留米大	島根医大	千葉こども病院
プロピオン酸血症	3	1	2	-	-
高乳酸血症	1	1		-	-
シトルリン血症	1	-	1	-	-
OTC 欠損症	1	-	1	-	-
高フェニルアラニン血症	1	-	-	1*	-
メチルマロン酸尿症	6	3	3	-	-
グリセロール尿症	2	-	2	-	-
ハートナップ病	1	1	-	-	-
シスチン尿症	3	1	2	-	-
α -アミノアジピン酸/ α -ケトアジピン酸尿症	9	2	7	-	-
オロット酸尿症	1	1	-	-	-
ガラクトース尿症 / チロシン尿症	1	1	-	-	-
神経芽細胞種	2	-	2	-	-
ジヒドロピリミジン デヒドロゲナーゼ欠損症	1	-	1	-	-
ジヒドロピリミジンナーゼ欠損症	1	-	1	-	-
異常例合計	34	11	22	1	-
総計	47,400	12,494	28,386	4,424	2,096
発見率	1/1,394	1/1,136	1/1,290	1/4,424	

*フェニルアラニン-d5 を用いることを本法では規程している。そのようにしてフェニルアラニン高値を確認できた。

表 5. 現行のマスクリーニング対象疾患と 22 年間の患者発見率 (1977～1998)

疾 患 名	患者数 (人)	発症頻度	現行での 血中指標物質	GC/MS を用いる新法 での尿中指標物質
高フェニルアラニン血症	383	1/77,400	フェニルアラニン	フェニルアラニン フェニル乳酸 0-ヒドロキシフェニル酢酸
メープルシロップ尿症	59	1/502,700	ロイシン	ロイシン イソロイシン バリン 2-ヒドロキシイソ吉草酸 2-ヒドロキシイソカプロン酸 2-ヒドロキシ-3-メチル吉草酸
ホモシスチン尿症	164	1/180,800	メチオニン	メチオニン ホモシスチン メチルマロン酸
ガラクトース血症	839	1/35,300	ガラクトース	ガラクトース ガラクトチール ガラクトン酸
合 計	1,810	1/16,385		

受診者 2,966 万人、受診率 95%

出典 厚生省：特殊ミルク情報 No.36, P107

VI. 日本医用マススペクトル学会精度管理委員会活動

ハイリスク患者の GC/MS 診断は、平成 12 年 4 月より高度先進医療から保険適用となった。即ち、「臨床症状・検査所見・家族歴等から先天性有機酸代謝異常症が強く疑われた患者に対し、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーを用いて診断を行った場合に算定される」(先天性代謝異常症検査 [D010 特殊分析] 1200 点)。そこで、金沢医科大学が中心となり日本医用マススペクトル学会では精度管理委員会を発足させ、活動を開始した。第 1 回精度管理を施行した。

VII. 腎不全患者群から尿酸結石(オキザロース)(特型を化学診断：肝移植前後のモニタリング

臨床像より oxalosis I 型(肝peroxisomeに局在する AGAT 酵素の欠損による)と診断されていた腎不全患者の血液中に、oxalate、glycolate の著増を認め、本症の化学診断を行った。両物質の精密な定量法を検討し、迅速な肝移植の効果判定、モニタリングの指標とし、その有用性を確認したので、これについても紹介する。

VIII. 参考文献

- 1) 臨床化学診断学: 松本勇、坂元正一 (監修) 久原とみ子、芳野信、須藤正克 (編者) ソフトサイエンス社, 1995.
- 2) 久原とみ子: 化学診断法. 臨床化学診断学 松本勇、坂元正一 (監修) 久原とみ子、芳野信、須藤正克 (編者) ソフトサイエンス社, 27-41, 1995.
- 3) J.D. Shoemaker, W.H. Elliott: Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *J. Chromatogr.* 562: 125-138, 1991.
- 4) 久原とみ子、松本勇: GC/MSによる尿中代謝物一斉分析- マスククリーニングへの応用の試み *Proc. Jap. Soc. Biomed. Mass Spectrom.* 20: 45-51, 1995.
- 5) I. Matsumoto, T. Kuhara: A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Reviews* 15: 43-57, 1996.
- 6) T. Kuhara: Diagnosis of inborn errors of metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *Review. J. Chromatogr. B* 758: 3-25, 2001.
- 7) T. Kuhara, C. Ohdoi, M. Ohse: A simple gas chromatographic-mass spectrometric procedure for diagnosing pyrimidine degradation defects for prevention of severe anticancer side effects. *J. Chromatogr. B.* 758: 61-74, 2001.
- 8) *Modern Drug Discovery, News in Brief*, 4(9): 15, 2001.
- 9) T. Kuhara, T. Shinka, Y. Inoue, Z. Xia, M. Ohse, I. Yoshida, T. Inokuchi, S. Yamaguchi, M. Takayanagi, I. Matsumoto: Pilot study of gas chromatography-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J. Chromatogr. B*, 731: 141-147, 1999.
- 10) 久原とみ子: 尿ウレアーゼ法・安定同位体希釈法・GC/MS法による新生児スクリーニング試験研究報告 日本医用マスペクトル学会サーキュラー No.51: 4-6, 2001.
- 11) M. Tuchman, M.T. McCann, P.E. Johnson, B. Lemieux: Screening newborns for multiple organic acidurias in dried filter paper urine samples: method development. *Pediatr. Res.* 30: 315-321, 1991.
- 12) T. Shinka, Y. Inoue, H. Peng, Z. Xia, M. Ohse, T. Kuhara: Urine screening of five-day-old newborns: metabolic profiling of neonatal galactosuria. *J. Chromatogr. B*, 732: 469-477, 1999.

【主題講演】

1. 「有害物質に対する生体反応解明へのクロマトグラフィーの利用」
日本バイオアッセイ研究センター, 大西 誠
2. 「尿中, 血中の VOCs の GC 計測」
国立公衆衛生院, 村山留美子
3. 「質量分析計をツールとする生体試料中の薬物・
毒物およびその代謝物の分析」
(株) 三菱化学ビーシーエル, 植木真琴

有害物質に対する生体反応解明へのクロマトグラフィーの利用

日本バイオアッセイ研究センター 大西誠

【はじめに】

ビフェニルは産業化学、一般社会において熱媒体およびその原料・合成樹脂原料・染色助剤¹⁾、防かび剤²⁾等として広く使用され、その年間生産量は約 5,000 t にも達している。ビフェニルの代謝について、古くから研究³⁻¹¹⁾ されているが、ビフェニルの長期毒性影響について詳細に調査した報告はない。当センターにおいてラットを用いた 2 年間の動物実験を行った結果、ビフェニルはラット雄の膀胱に癌を誘発させた^{12, 13)}。雄では 50 匹中 43 匹(86%)に、雌では 50 匹中 8 匹(16%)に膀胱内に結石の存在が認められ、その内雄の膀胱に限って 43 匹中 24 匹(48%)に癌の誘発が認められた(Table 1)。この結果は、「ビフェニル投与が重大な生体への影響をもたらす」ことを示すものである。しかしながら、膀胱癌を誘発した結石の成分、構造および生成メカニズムに関する研究はほとんど行われていない。その理由として

- 1) ラットの膀胱結石はかなり小さいもの (3~10mm) であり、構造解析をする上でその取り扱いが難しい。
- 2) 膀胱結石は、医学生理学または毒性病理学の研究者が取り扱う分野にあり、無機化学、物理化学的な視野から結石の研究がなされていない。

などがあげられる。

今回、有害物質の一例としてビフェニルを取り上げ、ラットの雌雄におけるビフェニル投与による膀胱結石および膀胱癌の発生率の差 (結石生成メカニズム) の起因を、クロマトグラフィー(HPLC、LC-MS/MS)及び物理化学的分析手段を用いて明確にした研究¹⁴⁻¹⁷⁾について紹介する。

Table 1. Macroscopic and microscopic types of lesions of the urinary bladder in rats given diets with and without biphenyl

	Male ¹⁾		Female ¹⁾	
	Control	Biphenyl	Control	Biphenyl
Number with urinary calculi	0	43 (86) ²⁾	0	8 (16)
Transitional cell carcinoma	0	24 (48)	0	0

1) n=50 2) %

【実験方法】

1 試薬

ビフェニル、4-HBP、4,4'-DHBP と 2-HBP は、和光純薬工業(株)の試薬を用いた。3,4-DHBP は、関東化学(株)の試薬を用いた。4-HBPOS と 4,4'-DHBPOS はビフェニル水酸化体を原料として、合成した。4-ヒドロキシビフェニル-*O*-硫酸のカリウム塩(4-HBPOSK) は上記の反応液に 20%の水酸化カリウム液を加え、その後、溶液から沈殿させた。その沈殿物はエタノールで再結晶して、4-HBPOSK の純品を得た。4-HBPOS は塩析(飽和の塩化ナトリウム液)によって沈殿し、その沈殿物はアセトニトリルで再結晶して、4-HBPOS の純品を得た。4-HBPOSK と 4-HBPOS は白銀色で、それらはメタノール、アセトニトリル、水に可溶であった。

2 動物の飼育、投与条件およびラット膀胱から結石の摘出操作

実験に用いた動物は日本チャールス・リバーより購入した F344/DuCrj ラットの雄を使用した。ラットは生後 4 週齢で導入し、各 1 週間の検疫、馴化を経た後、実験に供した。動物は飼育期間を通して、温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ 、明暗サイクル：12 時間点灯(8:00~20:00)/12 時間消灯(20:00~8:00)、換気回数 15~17 回/時の環境下で飼育した。動物はステンレス製二連ケージ(170W×294D×176H mm)に収容し、ケージ交換は 2 週間毎に実施した。投与方法は経口投与(混餌自由摂取とし、一週間に一度餌を交換)で投与期間は 2 年間(104 週)とした。ビフェニル添加飼料は、ビフェニルの濃度が 4.5mg/g になるように粉餌を加え、スパイラルミキサーによって 20 分間混合し、調製した。その飼料は 3 ヶ月ごとに調製し、使用するまで 4°C で保存した。なお、ラットは 2 年間の試験において 1 日平均 15g の摂餌量であり、1 日当たりのラットのビフェニル摂取推定量は、68mg であった。

結石は解剖時にラットの膀胱から取り出し、そしてその結石はすぐに尿を取り除き、乾燥した。これらの結石は雌雄において 1 匹の動物の膀胱内に 1 個または複数個が存在した。

3 結石成分の分析に関する試料調製

結石はめのう乳鉢で粉碎し、その後アセトニトリル 50%水溶液に溶解し、室温で 5 分間超音波抽出を行った。蒸留水で希釈したその溶液はビフェニル代謝物を測定するために HPLC を用いた。

4 機器測定条件

4. 1 HPLC、LC-MS/MS

結石のビフェニル代謝物と標準品の HPLC 測定は、HP-1090 (ヒューレットパッカー社)を用いて分析した。HPLC のカラムは東ソーの TSK-Gel ODS-80TM (2mmφ×150mm)を用い、流量は 1.0mL/min、室温下で行った。移動相はアセトニトリル-10mM 酢酸アンモニウム (pH4.5 に調整) = (1:1, v/v)とした。HPLC の溶出液は 254nm の波長で吸収を測定して定量分析を行った。

LC-MS/MS は TSQ-7000 (サーモクエスト社)、イオン化法はエレクトロスプレー(ESI)、

測定モードはネガティブ、シースガスは 70psi、キャピラリー温度は 230℃、印加電圧は 4.5kV、コリジョンガスはアルゴン、そのガス圧は 2.0mmTorr とした。

4-HBPOS の定量は、 $m/z:249$ のイオンピークをプリカーサーイオンとして $m/z:169$ のプロダクトイオンを用いる Selected Reaction Monitoring (SRM) 法により実施した。また、4,4'-DHBPOS の定量は、 $m/z:265$ のイオンピークをプリカーサーイオンとして $m/z:185$ のプロダクトイオンを用いる SRM 法により実施した。

4. 2 顕微 FT-IR

結石はマイクロトームの刃で半分に切断した。FT-IR スペクトルを測定するために、その表面の微小部分を顕微鏡で観察しながらマイクロマニピレーターを用いて採取した。試料と標準試料 (4-HBPOSK、4-HBPOS とリン酸カルシウム) の mFT-IR 測定は、顕微 FTIR-8200PC (島津製作所) を用い、 $700\sim 2000\text{cm}^{-1}$ の範囲で分解能 8cm^{-1} とした。

【結果】

1 結石の成分分析 (HPLC および LC-MS/MS 測定)

ビフェニルを投与したラット膀胱に生成した結石は、直径が約 3mm から 10mm であった。それらの結石の色は白色、灰色、黒色であった。この結石をめのう乳鉢で細かく粉碎し、50%アセトニトリル水溶液を加え超音波抽出を行い、フィルターろ過した溶液を、フォトダイオードアレイ検出器付の HPLC を用い測定した結果、2つのピークが認められた。その 3次元クロマトグラムを Fig.1 に示した。保持時間約 2分に認められたピーク 1 は 260nm に、約 5.5 分に認められたピーク 2 は 255nm に、それぞれ紫外外部吸収のピークが認められた。上記のフィルターろ過した溶液を、LC-MS/MS を用いて測定した結果、ネガティブモードにおいて、HPLC と同様にマスキロマトグラム上に 2つのピークが認められた (Fig.2)。約 2 分にみられたピーク 1 のマススペクトルでは $m/z:265$ にイオンピークがみられた。このピークをプリカーサーイオンとしてマススペクトルを測定したところ、Fig.2 に示すように $m/z:185$ にプロダクトイオンピークがみられ、ネガティブモードでイオン化していることから、このプリカーサーイオンピークは物質の分子量を示す $[M-H]$ の擬分子イオンであると考えられた。次に、マスキロマトグラム上で約 5.5 分にみられたピーク 2 のマススペクトルを測定すると、 $m/z:249$ にイオンピークがみられ、このピークをプリカーサーイオンとしてマススペクトルを測定したところ、 $m/z:169$ にプロダクトイオンピークがみられ、このプリカーサーイオンピークは物質の分子量を示す $[M-H]$ の擬分子イオンであると考えられた。これらのマスキロマトグラムでみられた 2つのピークのマススペクトルは、

- 1) ネガティブモードでイオン化していること
- 2) 擬分子イオンが $m/z:265$ と 249 であること
- 3) プリカーサーイオンとプロダクトイオンの質量数の差が硫酸抱合体を示す 80 であること

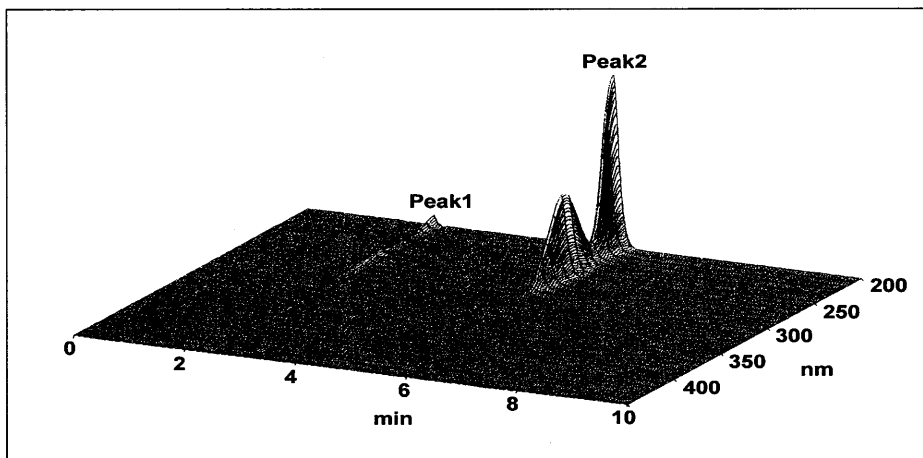


Fig. 1. 3-Dimensional chromatogram of components in the calculus by HPLC photodiodearray detector.

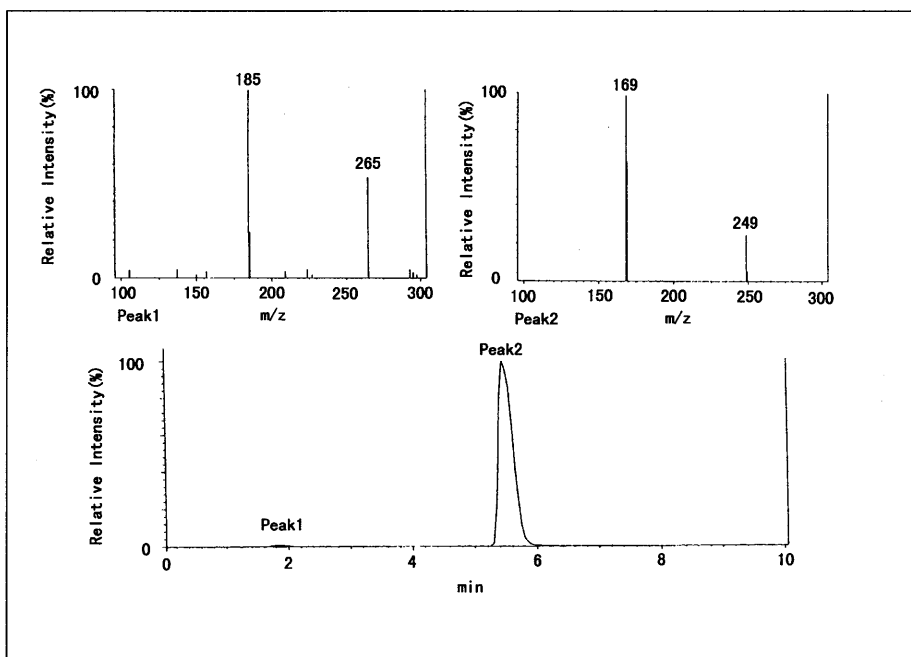


Fig. 2. Mass chromatogram and the mass spectra of components in the calculus by LC-MS/MS.

であった。以上のことに加えて、ビフェニルのラット尿中におけるその最終代謝物は、4-ヒドロキシビフェニルと 4,4'-ジヒドロキシビフェニルを主とした抱合体であることが報告されているため⁹⁾、結石のマスキログラムでみられた2つのピークは、標準

品を合成し、比較した結果、4-ヒドロキシビフェニルと 4,4'-ジヒドロキシビフェニルの硫酸抱合体であった。

2 ビフェニルを投与した尿中の代謝物の分析 (LC-MS/MS 測定)

Fig.3 に、ビフェニルを投与したラット尿中の硫酸塩抱合体に関して得られた MS クロマトグラムを示した。分析の結果、ラット尿中のビフェニル代謝物 (すなわち 3 つの HBPOS の異性体と 5 つの DHBPOS の異性体) の存在がみられた。HBPOS の 3 つの異性体は、2-、3-と 4-HBPOS、また DHBPOS の 5 つの異性体は、4,4'-DHBPOS、3,4-DHBP-3-OS、3,4-DHBP-4-OS、2,3-DHBPOS、と合成した標準試料による比較に対応した 2,5-DHBPOS であることが判明した。

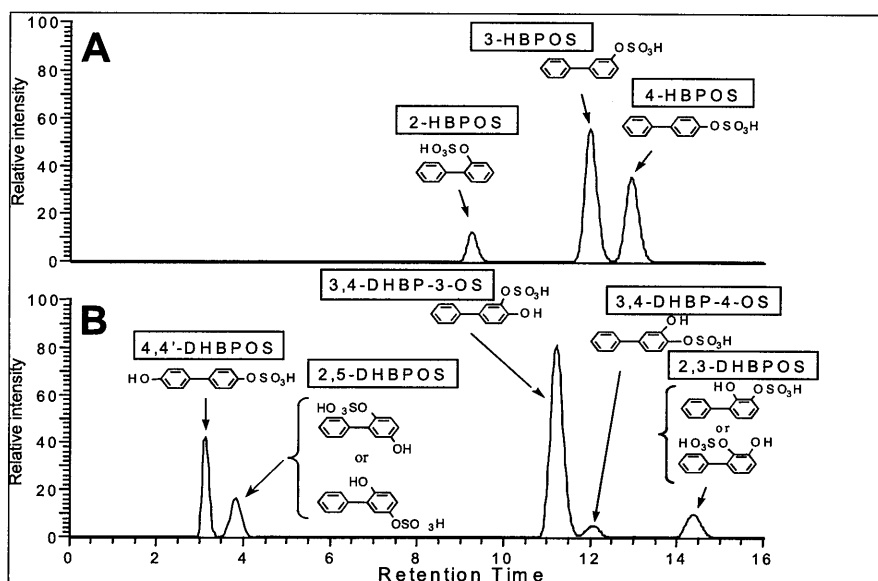


Fig. 3. MS chromatograms obtained for biphenyl sulfate conjugates in the urine of rats fed a diet containing biphenyl; (A) MS analysis conditions were the mass of the precursor ions was adjusted to 249 m/z and then the mass of the product ions was adjusted to 169 m/z; (B) MS analysis conditions were the mass of the precursor ions was adjusted to 265 m/z and then the mass of the product ions was adjusted to 185 m/z.

3 結石中のビフェニル代謝物の定量分析

HPLC によって結石中のビフェニル代謝物の平均含量を分析した結果を Table2 に示した。HPLC 分析のための雄と雌のラット由来の結石数 (ラット 1 匹の膀胱に複数個の結石が存在する場合、その中の 1 個をランダムに選択した) はそれぞれ 34 例と 4 例であった。結石中の 4-HBPOS の含量は、雄で 65% であり、それに対して雌ではわずか 3% であった。さらに雌の 4-HBP 含量は 44% であり、しかし雄ではわずか 1% であった。従って、雄結石の主成分は 4-HBPOS であり、雌の結石では 4-HBP であることが明確であった。

Table 2. Contents of the Biphenyl Metabolites in the Urinary Calculi in the Male and Female Rats

	Biphenyl metabolites contents(%)	
	Male ¹⁾	Female ²⁾
Sulfate		
4-HBPOSK	65.3 ± 9.80 ³⁾	3.40 ± 0.90
4,4'-DHBPOS	1.08 ± 0.49	N.D. ⁴⁾
Hydroxide		
4-HBP	1.34 ± 3.04	44.4 ± 5.10
4,4'-DHBP	N.D.	0.59 ± 0.30
2-HBP	N.D.	0.10 ± 0.08
3,4-DHBP	N.D.	0.04 ± 0.05

1) n=34. 2) n=4. 3) Mean ± standard deviation. 4) Not detected.

4 雌雄の結石の顕微鏡検査と顕微鏡 FT-IR スペクトル

雄のラット結石の断面の写真を Fig.4A に示した。結石の断面部分の形態について調べたところ、それは多層構造であった。この1つの層の厚さは約 250 μ m (Fig.4B) であり、層と層の間に空間が観察された。Fig.5 に示す雄ラット結石の外側の層の3つの位置(外側、中側、内側)の赤外吸収スペクトルの 1050 cm^{-1} の広い幅のピークは、標準物質の赤外吸収スペクトルと比較してその3つの位置にリン酸カルシウムが存在することを確認した。標準試料を用いて、内側と中心部の 4-HBPOSK の存在は Fig.5B と Fig.5C の 1235 cm^{-1} と 1070 cm^{-1} での赤外吸収の鋭いピークが確認され、1050 cm^{-1} と 1070 cm^{-1} のピークの重なりが明確であった。4-HBPOSK の含量は各位置での外側の層から内側の層へ向けて増加する傾向であった。さらに、その 4-HBPOSK 含量は、層の外部から内部へ向けて増加する傾向であった。

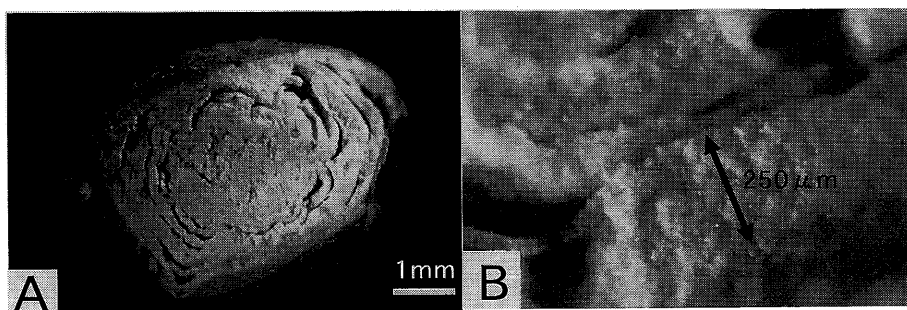


Fig. 4. Cut surface of a urinary calculus induced by biphenyl administration in a male rat. (A) cut surface of the calculus; (B) magnified image of the outer layer.

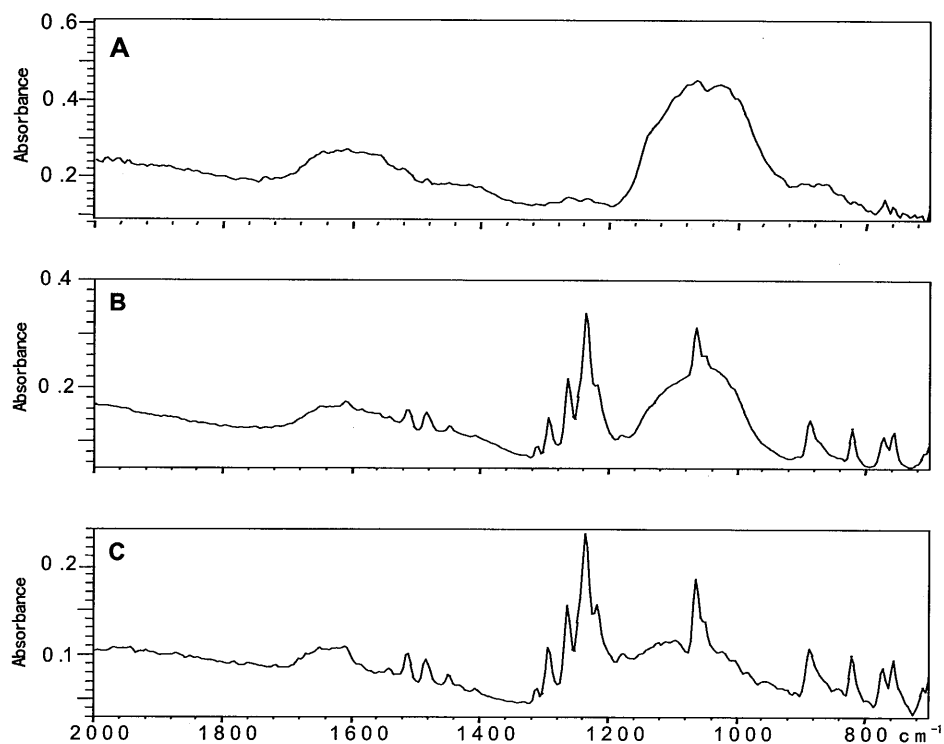


Fig.5. Infrared spectra of the outer layer of a calculus from a male rat (see Figure 4B), at three positions. (A) outside; (B) center; (C) inside.

一方で、雌のラット結石の断面の写真は Fig.6A に示した。雌の結石の形態は、雄でみられたような多層構造はみられず、開口部が観察された。その開口部の中に針状結晶が見られ、Fig.6B に示した。その結晶の長さはおよそ 150~200 μm であった。矢印で示した雌の結石の開口部中の針状結晶の顕微赤外吸収スペクトルは Fig.7 に示した。その赤外吸収スペクトルは 4-HBP (細線) の合成した標準品試料と一致した。

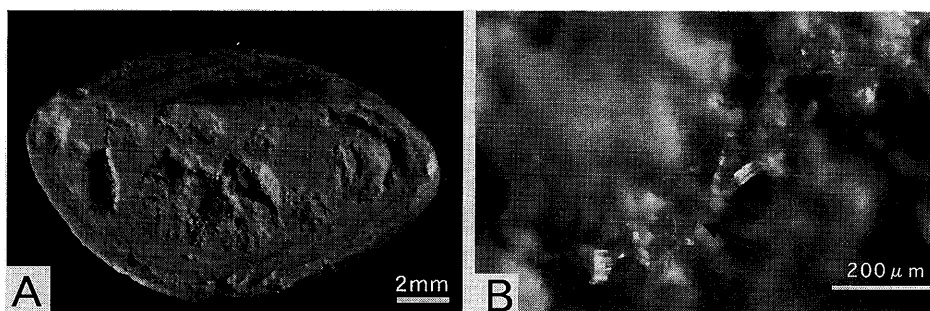


Fig.6. Cut surface of a urinary calculus induced by biphenyl administration in a female rat. (A) cut surface of the calculus; (B) magnified image of needle-shaped crystals in an open hole.

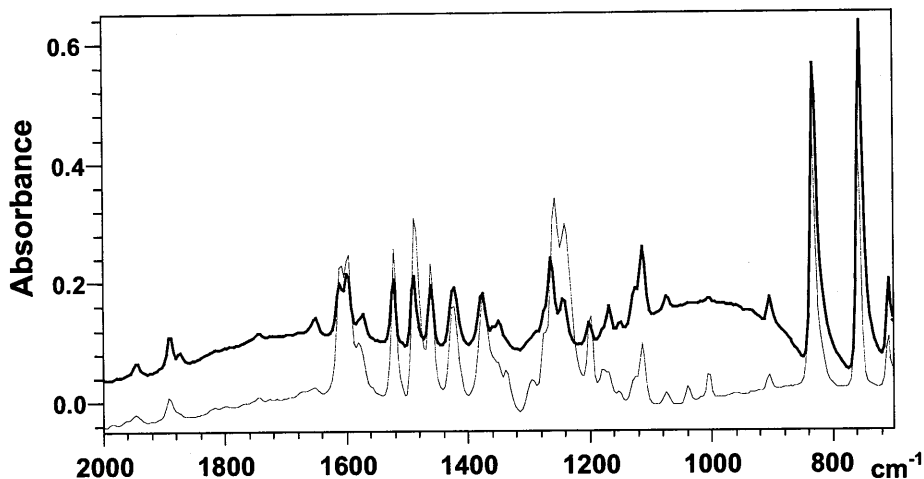


Fig.7. Infrared spectra of a calculus from a female rat and standard samples.

Bold line: needle-shaped crystals in an open hole.

Thin line: standard sample of 4-HBP.

【まとめ】

ビフェニルをラットに2年間投与して、膀胱に誘発した結石の成分と構造が明らかとなった。雄の結石は4-ヒドロキシビフェニル硫酸カリウム塩を主成分とした多層構造体であり、一方、雌の結石は開口部の中に針状結晶を含む4-ヒドロキシビフェニルを主成分とする堆積構造体であり、雌雄の結石の成分と構造は明確な違いがあった。また、雌雄の膀胱結石の成分と構造から、雌雄の結石生成メカニズムの違いが明らかとなり、雌雄の結石の発生率の違いは結石生成メカニズムの違いに依存したことを見出した(Fig.8)。これらのメカニズムを明確にできた背景として、クロマトグラフィーの存在がある。ビフェニルのような有害物質の毒性生体反応解明を行うために、クロマトグラフィーの利用は必須であった。

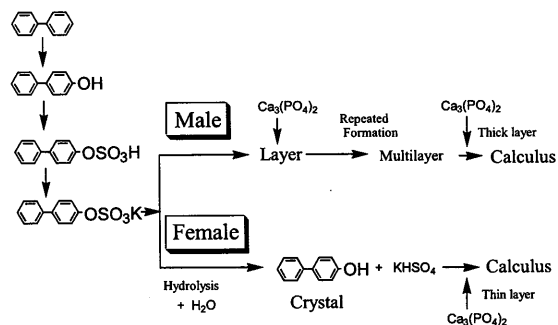


Fig.8. Mechanism of formation of urinary calculi induced by biphenyl administration in male and female rats.

【参考文献】

- 1) “13700 の化学商品”、(2000) 化学工業日報社 p738.
- 2) “食品添加物公定書解説書”、(1987) 広川書店.
- 3) West, H. D., Lawson, J. R., Miller, I. H., and Mathura, G. R. (1956) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 60, 14-20.
- 4) Meyer, T., Aarbakke, J., and Scheline, R. R. (1976) *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 39, 412-418.
- 5) Meyer, T., and Scheline, R. R. (1976) *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 39, 419-432.
- 6) Wiebkin, P., Fry, J. R., Jones, C. A., Lowing, R., and Bridges, J. W. (1976) *Xenobiotica* 6, 725-743.
- 7) Burke, M. D., and Prough, R. A. (1977) *Analytical Biochemistry* 83, 466-473.
- 8) Halpaap, K., Horning, M. G., and Horning, E. C. (1978) *J. Chromatogr.* 166, 479-490.
- 9) Haugen, D. A. (1981) *Drug metab. Dispos.* 9, 212-218.
- 10) Golbeck, J. H., Albaugh, S. A., and Radmer, R. (1983) *Journal of Bacteriology* 156, 49-57.
- 11) Powis, G., Moore, D. J., Wilke, T. J., and Santone, K. S. (1987) *Analytical Biochemistry* 167, 191-198.
- 12) Kano, H., Ohno, H., Yamazaki, K., Matsumoto, M., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (1997) *Proceedings of The Japanese Cancer Association, 56th Annual Meeting. Jpn. J. Cancer Res.* 88 Supplement, p69.
- 13) Matsumoto, M., Ohno, H., Yamazaki, K., Kano, H., and Matsushima, T. (1998) *Abstract of The 72th Annual Meeting. Jpn. Society for Occupational Health,* p715.
- 14) Ohnishi, M., Take, M., Sagawa, M., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (1998) *衛生化学* 44, 256-263.
- 15) Ohnishi, M., Yajima, H., Yamamoto, S., Matsushima, T., and Ishii, T. (2000) *Chemical Research in Toxicology* 13, 727-735.
- 16) Ohnishi, M., Yajima, H., Takemura, T., Yamamoto, S., Matsushima, T., and Ishii, T. (2000) *Journal of Health Science* 46, 299-303.
- 17) Ohnishi, M., Yajima, H., Takeuchi, T., Saito, M., Yamazaki, K., Kasai, T., Nagano, K., Yamamoto, S., Matsushima, T., and Ishii, T. (2001) *Toxicology and Applied Pharmacology* 174, 122-129.

尿中、血中のVOCsのGC測定

国立公衆衛生院 労働衛生学部 村山留美子

1 はじめに

近年、従来の大気汚染物質（SO_x、NO_x、SPM、光化学オキシダント等）に加え、ベンゼンなどの発がん性化学物質による健康への影響が心配されている。平成8年1月の中央環境審議会による「今後の有害大気汚染物質対策のあり方について」の中間答申においても、その対策の重要性が指摘され、その環境影響の評価にはリスクアセスメント手法を用いて環境目標を決定すべしとされており、その方針に従って4月には大気汚染防止法が改正された。わが国においては、ベンゼンをはじめとする化学物質の生体試料中濃度を測定し、曝露評価を行う、いわゆるバイオモニタリングは、従来職場環境の中での、ある程度の高濃度曝露を前提に行われてきた。従って、近年問題になっている一般環境中の非常に低濃度の有害大気汚染物質にそのまま当てはめることはできず、環境中に微量に存在するこれらの化学物質に一般の人がどの程度曝露されているかという曝露評価は、これまでほとんど研究はなされてこなかった。

これに対して、現在、ようやくそのような低濃度の有害大気汚染物質についてのバイオモニタリングに応用可能な手法が開発されつつある段階にある。汚染防止に有効な対策を立てるためにも、そのような手法を用いた曝露アセスメント手法の開発と測定は急務である。また、大気環境のみならず室内環境や、個人の摂取する食料品や飲料水、またタバコのような嗜好品によってもおこる有害化学物質への個人のトータルな曝露状態を明らかにするためには、生体試料を用いた評価が非常に有効であると思われる。今回は著者らが行っている、生体試料測定を用いた血中及び尿中VOC量の測定を紹介する。

2 分析方法

2-1 試料採取

尿については、一部を紙製の採尿カップに採取した後、洗浄済みの保存用 10ml バイアルに気相がなるべく少なくなるように満たしてフタをし、4℃で測定まで保存した。血液については、ディスポーザブルシリンジで採血した後、ヘパリンナトリウム入りのガラスの真空採血管に採取し、尿と同様に4℃で測定まで保存した。

また被験者には行動記録の用紙を配布し、採尿の場所や採尿間の食事や外出、喫煙等の行動を記録してもらうこととした。

測定時には尿と血液をそれぞれ保存用のバイアル又は採血管からシリンジで2ml採取し、洗浄済みの測定用 10ml バイアルビンに移した。これに内部標準（フルオロベンゼン）を添加した後、35℃で80分加温し、ダイナミックヘッドスペース-GC-

P I Dにより測定する。

2-2 分析条件

分析は以下の条件で行った。なお、Headspace sampler 装置 (VOC-100 / 東亜 DKK) の動作の概要について図 1 に示した。

GC : HP5890

Carrier Gas: He

Temp. profile: 40 °C for 8min; 4 °C/min to 110 °C; 50 °C/min to 220 °C; 8min hold;
235 °C 15min hold

Headspace sampler: VOC-100 (東亜 DKK)

Purge Gas : He

Trap temp.: Trap 25 °C Injection 230 °C

Purge : 20ml/min 3 min

Dry Purge: 20ml/min 1.5min

Injection Time: 5min

Baking: 230 °C 40min

定量下限値 : 50ng/L

3 結果

3-1 調査 1 血中及び尿中成分の時間変動について

血液及び尿中の VOC の検出結果の違いと、時間や行動による変化を検討するために、被験者 1 名から外出前、外出直後、外出後 1 時間の計 3 回、1 時間毎に尿、血液を採取した。

図 2 及び 3 に尿中及び血中の VOC のクロマトグラム例を、図 4 に尿中及び血中のベンゼンの Peak area 値の変動と添加した内部標準の Peak area 値を、示した。血中及び尿中から検出された成分にそれ程大きな違いはなかった。ただし、同じ時間に採取された試料と比較するとベンゼン、トルエンなどでは血液よりも尿の方が大きな Peak area 値を示した。また、添加した内部標準の Peak area 値においても尿、血液ともに同量添加したにもかかわらず、血液よりも尿の方が常に高い値を示しており、同じ purge 時間では尿と血液では成分の回収に差があると思われた。

また、尿中ベンゼンの Peak Area 比は外出前 < 外出直後 < 外出 1 時間後と高くなっており、血中ベンゼンは外出前と外出直後には大きな差はなかったが、外出 1 時間後に高い値を示した。

3-2 調査 2 尿中成分の日間変動について

尿中ベンゼンの日間変化を検討するために、被験者 1 名に通常の生活をしてもらい、午前 6 時、午後 12、14、16、18 時の 1 日 5 回、3 日間定期的に、2 の分析方法の項

目に記した方法で採尿し、尿中ベンゼンの濃度変化を測定した。

尿中のベンゼン濃度の推移を図5に示した。濃度は89～392ng/Lの範囲であった。濃度の推移では1日目は午前6時から午後にかけて濃度の低下が見られるが、2～3日目では大きな変化は認められなかった。

3-3 調査3 尿中成分の変動の個人差について

尿中成分の日内変動の個人差を検討するために、被験者には普段と同様に生活してもらい、起床時から就寝するまでの間、排尿する際に、2の分析方法の項目に記した方法で尿を採取した。ただし、被験者のうち、喫煙を行う1名については、最初の採尿を行う12時間前から禁煙してもらい、1日目は24時間禁煙した状態で、2日目は通常通り喫煙して採尿し、一日の変動を見た。

3-3-1 非喫煙者のベンゼン等の日内変動例

各被験者のうち、非喫煙者5名の尿中ベンゼン及びトルエンの濃度変化の例を図6に示した。5名の被験者は衛生院勤務者で、自宅と衛生院で採尿していた。日内変動を見ると、自宅在宅中にベンゼン及びトルエン濃度が高い例や、逆に衛生院にいる間の方が若干高い例など様々であったが、どの被験者においても衛生院内にいる間は大きな変動は認められなかった。衛生院内における非喫煙者のベンゼンの平均値は104.1 ± 27.7ng/L (range 50.3-165.5)であった。

3-3-2 喫煙者のベンゼン等の日内変動例

被験者のうち、喫煙者1名の尿中ベンゼン及びトルエンの濃度変化の例を図7に示した。非喫煙時(図7a)には途中大きな変動はあるものの、他はベンゼン濃度が60-80ng/L以下と低い値で推移していたが、喫煙時(図7b)には約100ng/Lと上昇した。

3-3-3 尿中クレアチニン量との相関

各被験者の尿中ベンゼン濃度と尿中クレアチニン量の相関を図8に示した。ベンゼン濃度とクレアチニン量との間に明確な相関関係は認められなかった。

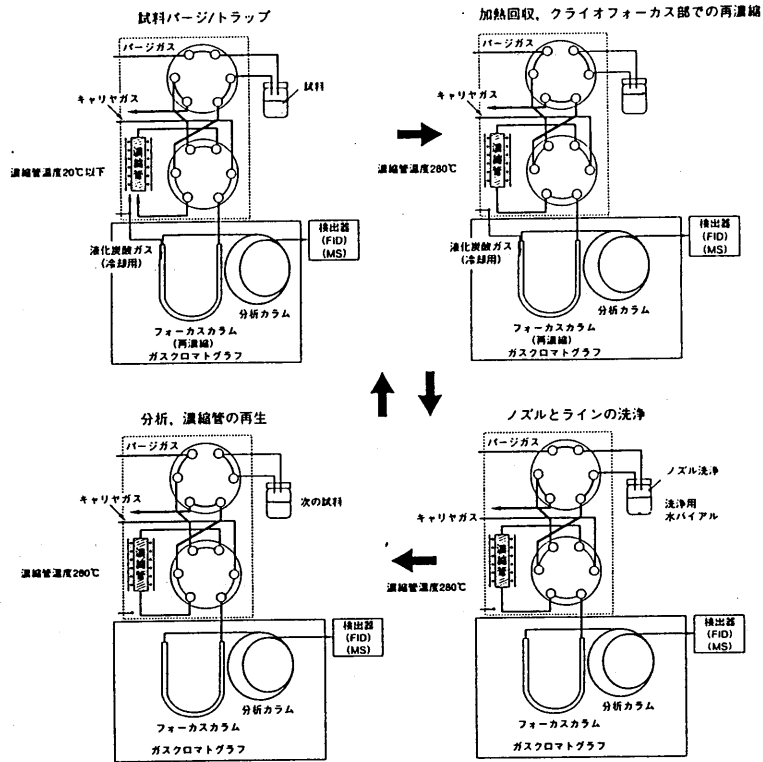


図1 ヘッドスペース装置の動作概要

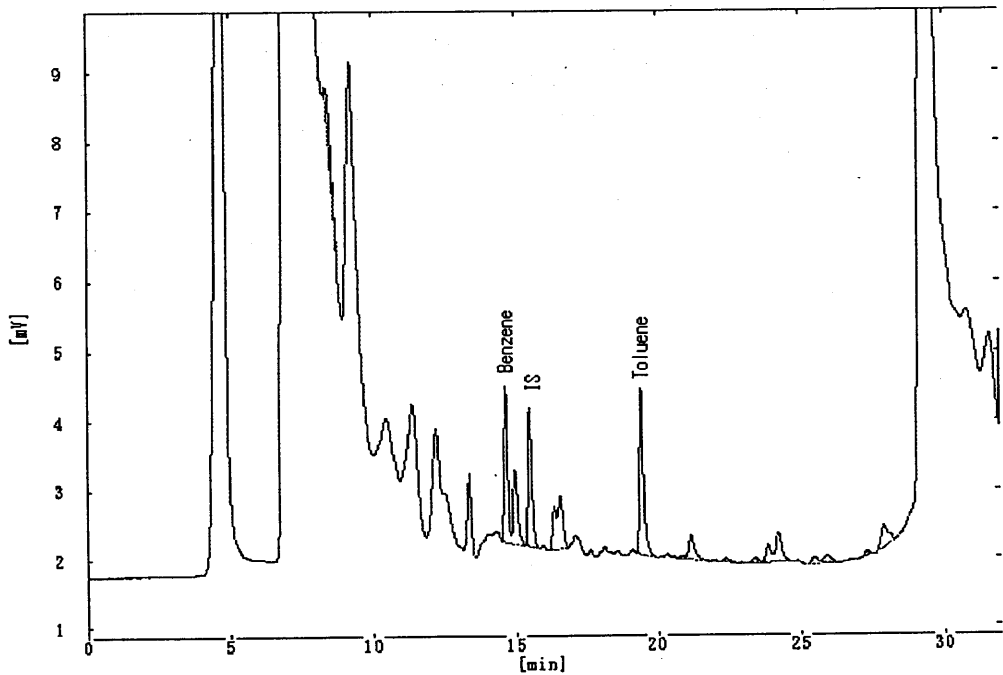


図2 血中VOC のクロマトグラム例

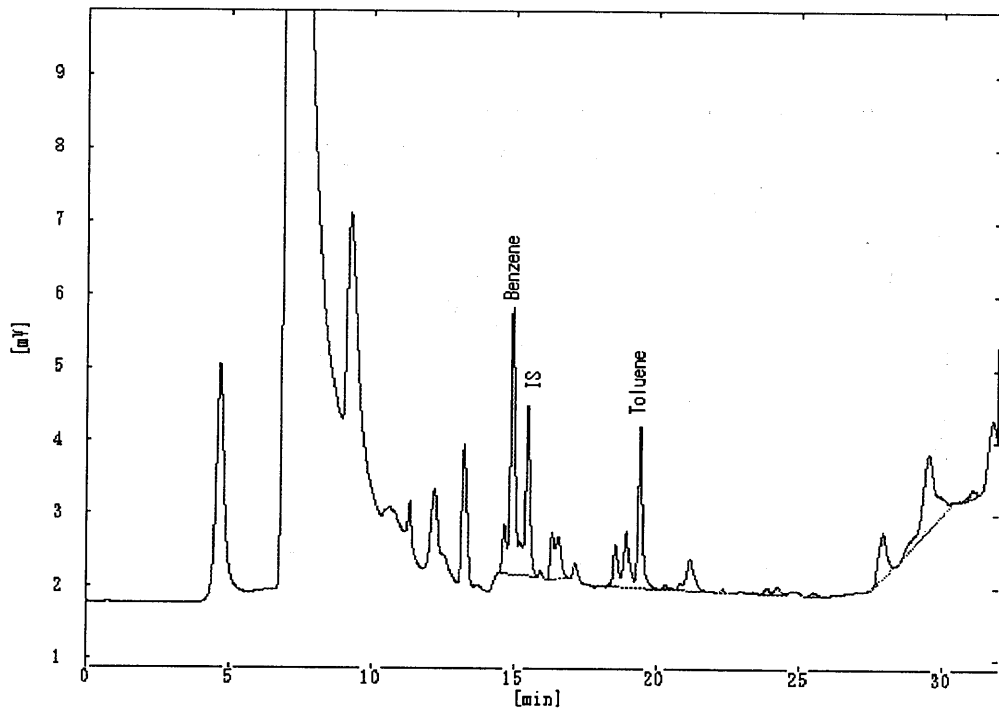


図3 尿中VOC のクロマトグラム例

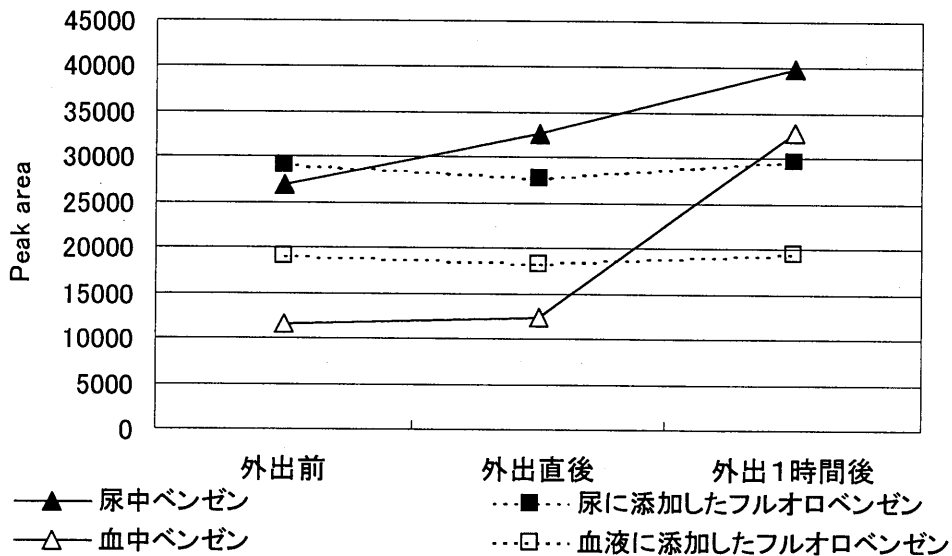


図4 1時間毎の尿及び血中ベンゼンのPeak area値の推移

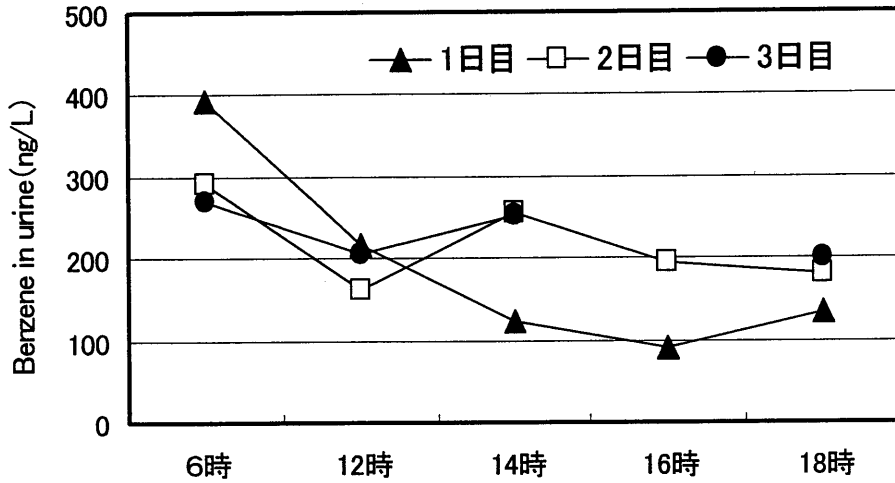
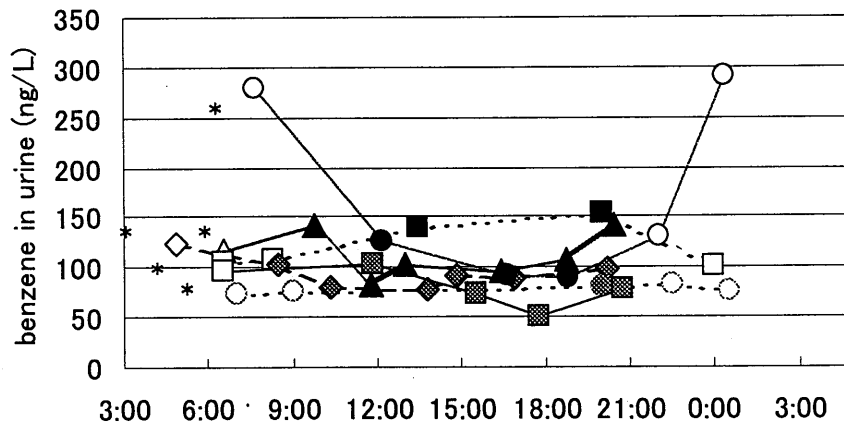
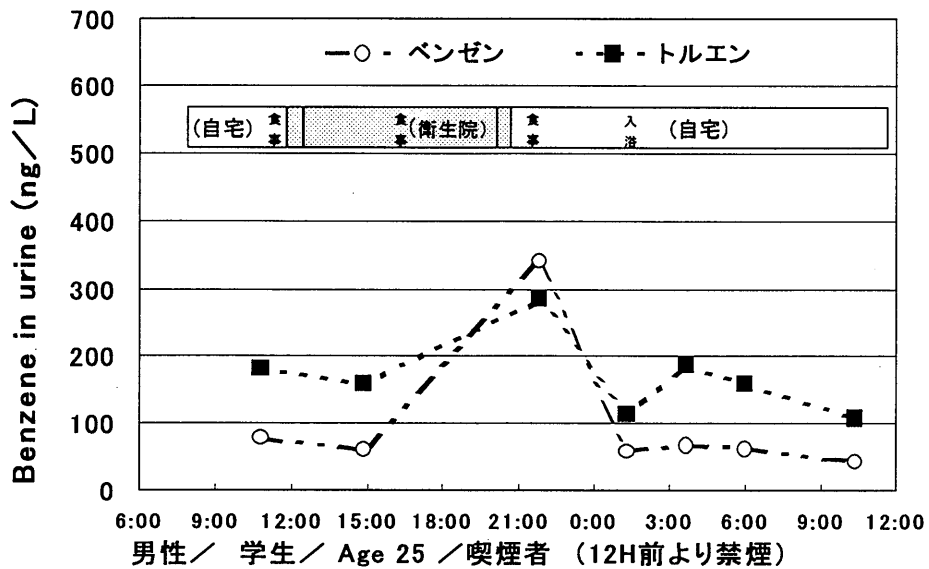


図5 尿中濃度の推移

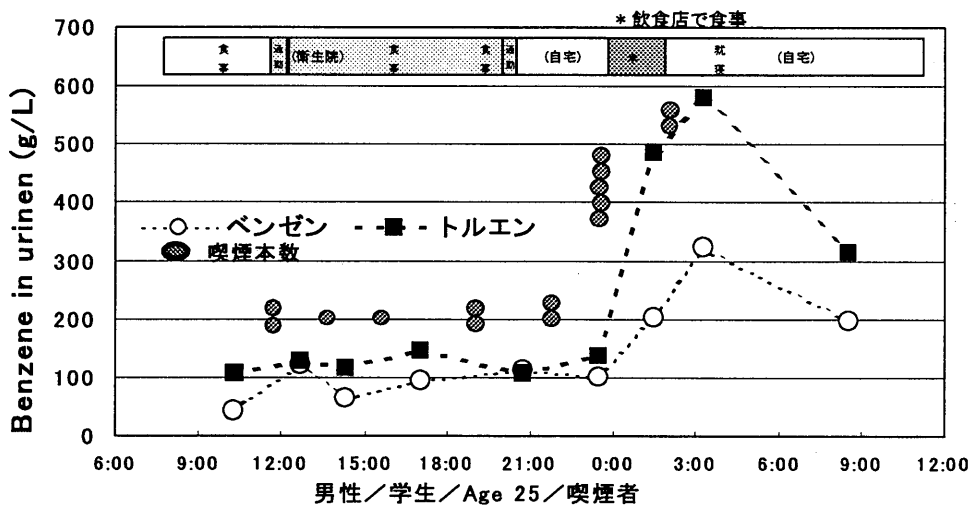


* 記号の中ヌキは自宅で、それ以外は衛生院で採尿した

図6 衛生院勤務者の尿中ベンゼンの日内変化



a 非喫煙時の日内変動



b 喫煙時の日内変動

図7 喫煙者の喫煙時／非喫煙時の尿中ベンゼン及びトルエンの日内変動

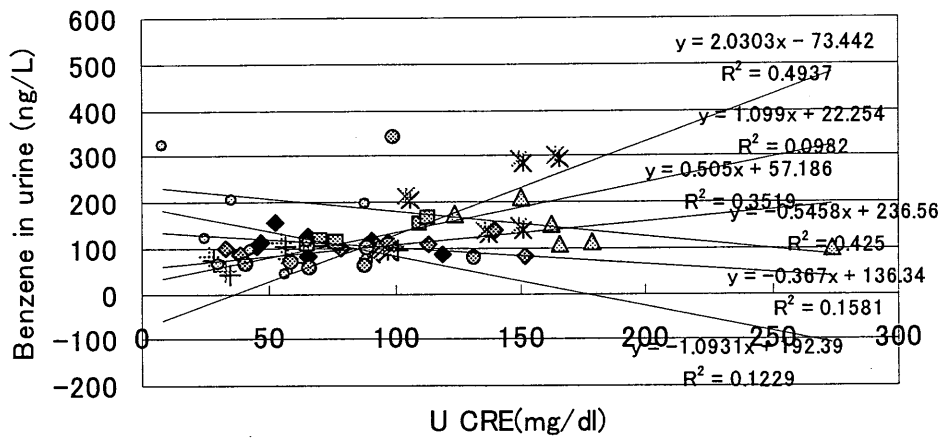


図8 尿中ベンゼンと尿中クレアチニン量との相関

質量分析計をツールとする生体試料中の薬物・毒物およびその代謝物の分析

- Analysis of drugs, toxins and their metabolites by means of GC mass spectrometry -

三菱化学ピーシーエルドーピング検査室

Doping Control Laboratory, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.

植木眞琴, Makoto UEKI

1. はじめに

競技スポーツでは選手に対するしいドーピング検査が実施される。当初の検査は興奮剤、麻薬鎮痛剤などおよそ30種類程度の薬物を対象に開始されたが、その後スポーツ界の薬物乱用の実態に合わせて毎年のように追加され、蛋白同化ステロイド剤、利尿剤、 β -遮断剤、 β -刺激剤、ペプチドホルモンを初め、検査をごまかす隠蔽剤や血液製剤を含むドーピング手法までもが検査対象となっている¹⁾。また、一般社会では歌山毒カレー事件とそれに続く模倣事件の多発により日本全土が大混乱する事態が発生し、以来薬毒物の迅速かつ正確な同定手法が求められるようになった²⁾。検査の結果次第で法的問題が発生する上記のような分析においては、構造情報が得られるMS分析が最も有効な確認手段の一つとして用いられている。

2. 検査方法と検査機器

検査に許される時間は、オリンピックでは16時間以内(翌日の競技開始前まで)、世界選手権や救命救急検査では24時間、国際大会・国内選手権では3から7営業日程度であり、例として長野オリンピックのピーク時には80人の検体について、16時間以内におよそ150種類の薬物の有無を確認することが必要条件とされた。実際には広範囲の成分を対象とする7種類のGC/MSスクリーニングを行い、陽性が疑われる検体については目的物に最適な条件で、ただちに確認分析が実施された。検査システムの概要を図-1, 2に示したが、このようなシステムにより、広範囲の対象物を短時間で検査し、同時に別の検査員によるベリファイを可能としている。

3. 検査の品質基準

薬毒物検査に際して、国際的に認められた第三者品質保証機関、例えば国際標準化機構(ISO)の化学試験所品質基準を満たす事が要求されるようになってきた。ドーピング検査では、国際オリンピック委員会医事委員会の認定を受ける際に、あらかじめ校正を行う試験所のための国際規格ISO/IEC17025(旧ISO/IECguide25)の認定を受けていることが必須条件とされるようになった。我々が最初にISOguide25の認定を取得した当時、国内のISO審査認定機関は自機関開発検査法に対する審査経験がなかったため、各国との間で最も広範囲の相互受け入れ契約(Mutual Recognition Agreement)を結んでいるNATA:National Association of Testing Authorities, Australiaを招いて適合性を立証した。ISOの要求事項の重要な要件には計量標準の国際規格へのトレーサビリティの検証、測定の不確かさの推定、国際基準に基づく品質体系の確立、精度に影響する外部調達品の管理、顧客サービスと不適合事項の是正・予防措置の実施などが含まれる。

ここでは同一化学種の薬剤の由来を同位体比MSで見分ける最新の技術を含めて解説する。

1) IOC Medical Commission, "Olympic Movement Anti-Doping Code"

原文; http://www.olympic.org/ioc/e/org/medcom/medcom_intro_e, 和文;<http://www.mbcl.co.jp>

2) 植木眞琴、陰山信二、毒劇物中毒事件に関する研究、平成10年度厚生科学特別研究事業

3) 植木眞琴：“バイオロジカルマスマスペクトロメトリー”、上野民夫、平山和雄、原田健一編、p.204, (1997), (東京化学同人)。

4) 植木眞琴：法中毒、13, 163-181(1995)

Figure-1 Overview of the testing system for screening of drugs and their metabolites.

4.1 Testing System:

Doping control tests in MBC laboratory consists of two stages i.e.

SCREENING PROCEDURES:

Analytical procedures to eliminate negative samples from further considerations.

CONFIRMATION ANALYSES:

Conclusive analyses to make sure if the sample is analytically positive.

4.2 Overview of the Screening Procedures:

Screening Procedure-1

GC/NP screening of nitrogen containing compounds and the metabolites that are excreted as free in urine. (Amphetamines, Ephedrines, Ecstasies, Caffeine, some Narcotics, and few β -blockers)

Screening Procedure-2

GC/MS screening of nitrogen containing compounds and the metabolites that are excreted as free or conjugates in urine. (Phenolalkylamines, Desalkylated narcotics, some β 2-agonists and some β -blockers etc.)

Hydroxyethyl starch, a plasma volume expander, is screened by a procedure with modified sample hydrolysis conditions and derivatization based on this screening-2.

Screening procedure-3

This screening procedure is not normally done. (Caffeine quantification by HPLC)

Screening procedure-4

GC/MS screening of anabolic agents and some high potency drugs. (Nandrolone, Stanozolol, Marijuana metabolites and Clenbuterol etc.) In this screening, the target compounds are detected as total fraction. All the samples are analyzed simultaneously both by GC/MSD and HR-MS for low concentration anabolic agents. High sensitive analysis and the data evaluation must follow the IOC guideline for reporting low concentration anabolic agents.

Screening procedure-5

GC/MS screening of diuretics and other acidic compounds. (Etacrynic acid, Canrenone, Probenecid and Xipamide etc.)

Screening procedure-6

GC/Combustion/Isotope Ratio MS screening of naturally occurring doping agents. Testosterone, DHT and their precursors are the targets of GC/C/IRMS analysis.

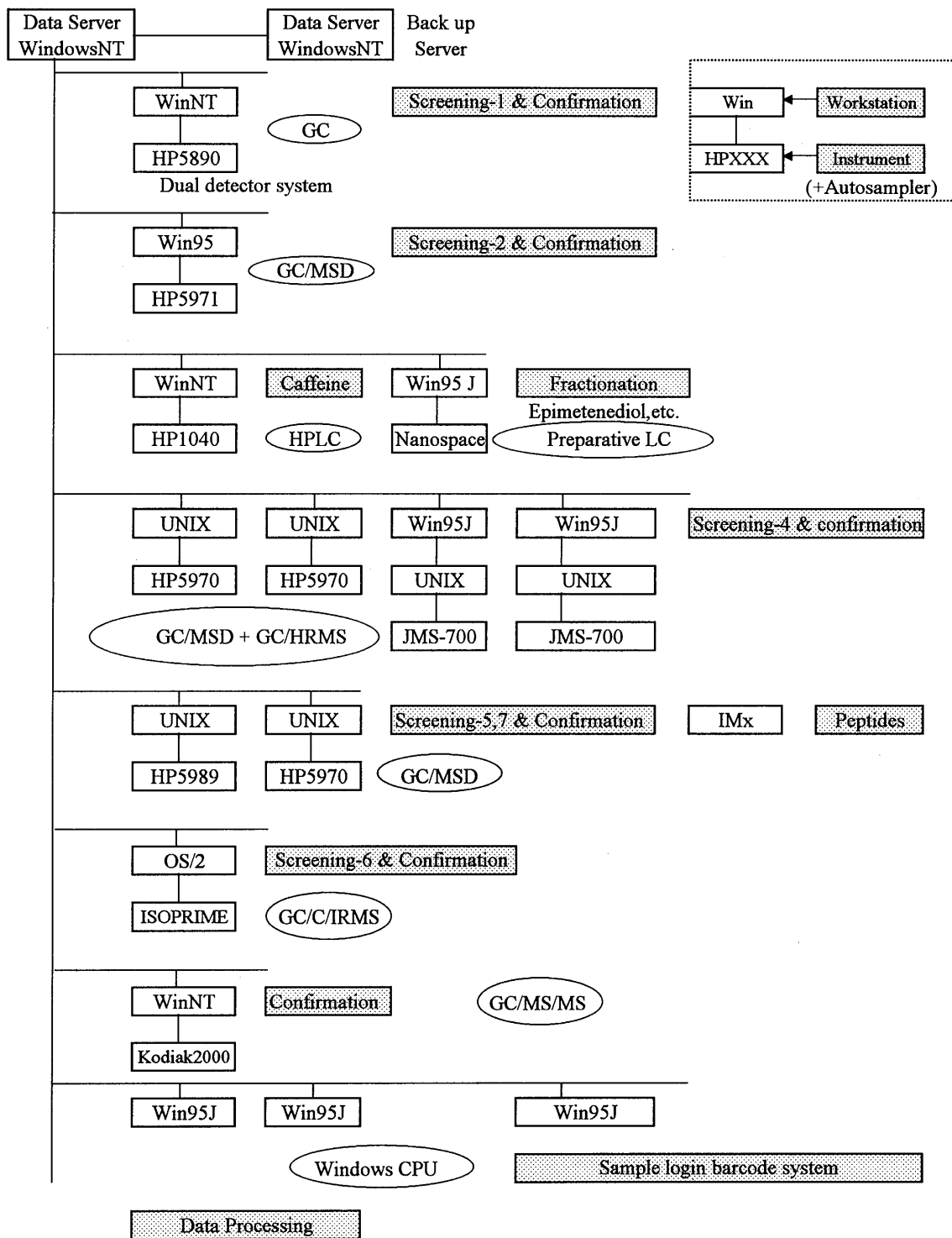
Screening procedure-7

GC/MS screening of β -blockers.

Screening procedure of peptide hormones

Peptide hormones (β -hCG, LH, FSH) are measured using automated Immunoassay system type IMx from Abbott etc. Recombinant EPO is identified by double southern blotting.

Figure-2 Configuration of the analytical instruments.



【技術講演】

1. 「SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) を用いる GC/MS 法の紹介」
横河アナリティカルシステムズ, 中村貞夫
2. 「ダイミクヘッドスペース・GC/MS 法による環境ホルモン調査項目の分析」
東亜DKK (株), 前田恒昭
3. 「機器分析による口臭測定」
(株) 島津製作所分析機器事業部, 喜多純一 他
4. 「SPME を用いたカビ臭の分析及びその他の分析例紹介」
(株) 日立ハイテクノロジーズ ライフサイエンス事業統括本部, 本田俊哉
5. 「室内環境における建材からの発生ガス測定手法の紹介」
ジーエルサイエンス(株), 星野邦広
6. 「室内空気汚染物質の測定, 固相吸着-加熱脱着-GC/MS (チューブ法)」
(株) パーキンエルマージャパン, 応用研究部

SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) を用いる GC/MS 法の紹介

横河アナリティカルシステムズ (株)
アプリケーションセンター

中村貞夫

1. はじめに

分析の対象となる化合物は、通常さまざまなマトリックスと存在している場合が多く、濃度も希薄なことがあるため、GC/MS で分析を行う際は一般に試料の前処理が必要となる。試料から目的成分を抽出し、目的成分が微量な場合は濃縮を行い、必要に応じてクリーンアップ、誘導体化が行われる。従来から行われている溶媒抽出などは時間がかかり、労力を必要とする。そのため、分析機器メーカー及びユーザーは GC/MS の前処理装置の開発を行ってきた。ヘッドスペース、超臨界流体抽出、固相抽出、マイクロ固相抽出 (SPME) などの自動前処理装置が開発され、さまざまな分野で使用されている。これらの前処理装置は、前処理にかかる時間を短縮し、精度を向上させる。最近、Baltussen らによって、Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) 法が開発され、新しい抽出法として注目されている。原理は、SPME 法と同様であるが、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 液相量を多くして、回収率を高めている。

ここでは、SBSE 法を尿中の覚醒剤 (メタンフェタミン及びその代謝物であるアンフェタミン) の抽出に応用し、GC/MS で分析した例を紹介する。覚醒剤は本来の役割を無視して乱用されると、その副作用によりさまざまな精神的または身体的な異常が発生する。現在、我が国で問題となっている覚醒剤のほとんどはメタンフェタミンであり、昭和 40 年代に始まった第 2 次覚醒剤乱用期の終息の兆しは依然として認められず、高い水準で推移して現在に至っている。メタンフェタミンの不法使用の実証は、尿中からメタンフェタミン及びその主代謝物であるアンフェタミンの検出により行われている。その分析法は、一般的には抽出操作を行い、その後薄層クロマトグラフ及び GC/MS による定性分析を行う。近年、覚醒剤犯罪の急増により多数の検体が一度に持ち込まれ、しかも限られた時間内で分析することが要求される。そのため、分析時間の短縮を行うため、特に前処理に工夫を必要とする。

2. SBSE 法

SBSE 法は、Stir Bar (攪拌子) に 100%ポリジメチルシロキサン (PDMS) をコーティングさせたもの (Twister) を試料溶液中で攪拌させて目的成分を抽出する技術で、液液分配の原理を応用した手法のことである。図 1 に Twister の模式図を示

した。

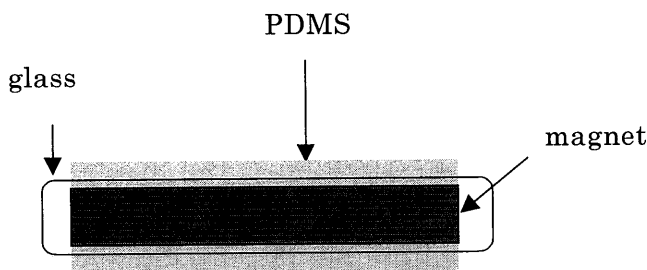


図 1 Twister

Twister を試料溶液に加え攪拌し抽出後、Twister を試料から取り出し、ガラスチューブに入れ、専用の熱脱着装置(Gerstel社 TDS)を用いて目的成分を熱脱着しGC/MSへ導入する。SBSE法の理論はSPMEと同様であり、PDMS/水間の分配係数($K_{PDMS/W}$)はオクタノール/水間の分配係数($K_{O/W}$)に近似できる。

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad (1)$$

- C_{PDMS} : PDMS 相中の目的成分濃度
- C_W : 水相中の目的成分濃度
- m_{PDMS} : PDMS 相中の目的成分の質量
- m_W : 水相中の目的成分の質量
- V_{PDMS} : PDMS 相の体積
- V_W : 水相の体積

相比 β (V_W/V_{PDMS}) を用いて、式 (1) は次式に書き換えられる。

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_0 - m_{PDMS}} \quad (2)$$

m_0 : 試料溶液中目的成分初期濃度

式 (2) より、回収率を導くと次式になる。

$$\frac{m_{\text{PDMS}}}{m_0} = \frac{\frac{K_{O/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{O/W}}{\beta}} \quad (3)$$

試料溶液からの目的成分の回収率は、分配係数と相比の比率 ($K_{O/W}/\beta$) から求めることができる。PDMS量はSPMEでは最大0.5 μl (100 μm 膜厚)であり、SBSEでは24、47、63及び126 μl である。試料溶液を10 mlとした場合のSPMEとSBSE (24 μl)の相比はそれぞれ20000と417である。図2にSBSEとSPMEによる試料溶液10 mlからの目的成分の理論回収率と分配係数の関係を示した。

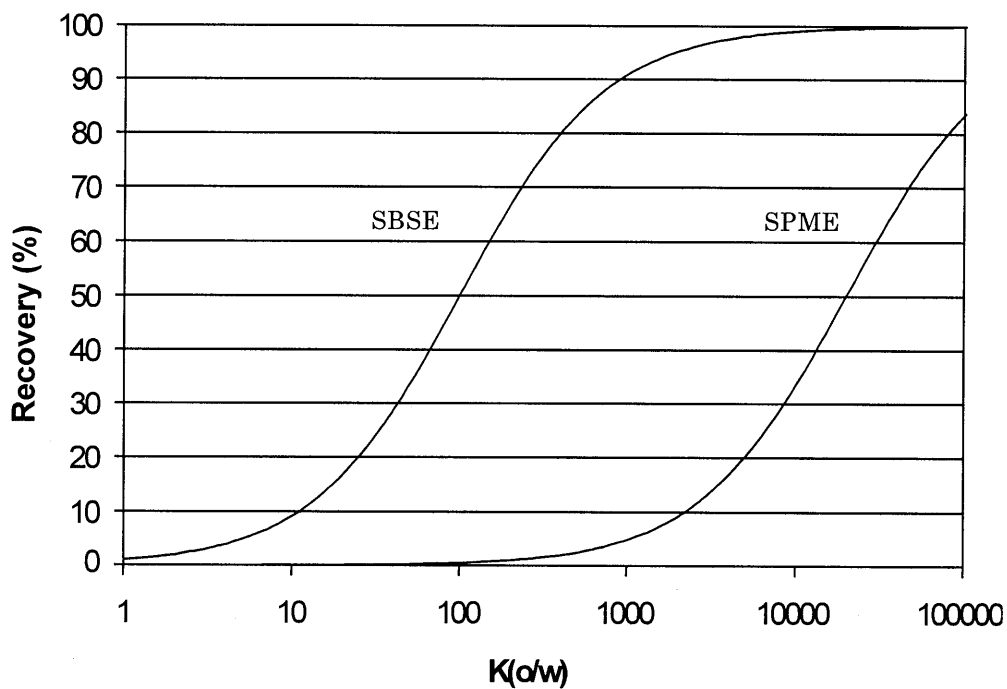
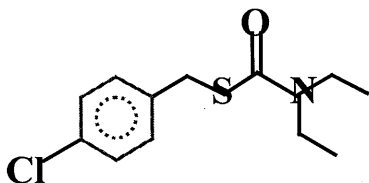


図2 SBSEとSPMEによる試料溶液10 mlからの目的成分の理論回収率と分配係数の関係 (PDMS液相量: SBSE、100 μl ; SPME、0.5 μl)

図 2 より、明らかなように SPME では化合物の $K_{O/W}$ 10000 以下では回収率が低く、50%の回収を得るためには 20000 以上の $K_{O/W}$ が必要である。

また、 $K_{O/W}$ から理論回収率の計算が可能であり、目的成分が SBSE 法に適用可能かどうかの判断が容易にできる。log $K_{O/W}$ 計算ソフトが市販されており、回収率を計算するときには有効である。図 3 にその計算ソフトで農薬 (Thiobencarb) を例に計算した結果を示した。



Thiobencarb
CAS # 28249-77-6

Type	NUM	Logkow fragment description	coeff	value
Frag	2	-CH3 (aliphatic carbon)	0.5473	1.0946
Frag	3	-CH2 (aliphatic carbon)	0.4911	1.4733
Frag	1	-N< (aliphatic attach)	-1.8323	-1.8323
Frag	6	Aromatic carbon	0.2940	1.7640
Frag	1	-CL (chlorine, aromatic attach)	0.6445	0.6445
Frag	1	-S-C(=O)-N- (Thiocarbamate)	0.5240	0.5240
Const		Equation constant		0.2290

Experimental Log P : 3.40

Log $K_{O/W}$ = 3.8971

図 3 log $K_{O/W}$ 計算ソフト

3. 実験

3.1 SBSE

尿 10 μ l と蒸留水 5 ml (あるいは尿 5 ml) を 10 ml ガラスバイアルに入れ、炭酸カリウム約 0.1 g、クロロギ酸プロピル 1 滴を添加し、Twister を入れセプタムでキャップした。室温、1000 rpm で Twister を 20 分間攪拌し、抽出を行った。抽出後、Twister を取り出し、蒸留水で洗浄後無塵紙で拭き、ガラスチューブに入れ熱脱着装置で目的成分の熱脱着を行った。

3.2 装置及び測定条件

3.2.1 熱脱着装置 : Gerstel TDS

TDS mode: splitless

Desorption temp: 20°C(1.5min)-60°C/min-230°C(3min)

Desorption flow rate: 50ml/min

CIS mode: solvent vent mode

CIS temp: -150°C(0.01min)-12°C/sec-300°C(5min)

CIS splitless: 2min

3.2.2 GC/MS : Agilent Technologies 6890/5973

Column: DB-5MS 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m

Oven temp: 50°C(2min)-20°C/min-180°C(0min)-10°C/min-280°C(3min)

Carrier gas: Helium 1.0 ml/min (constant flow mode)

Transfer line temp: 280°C

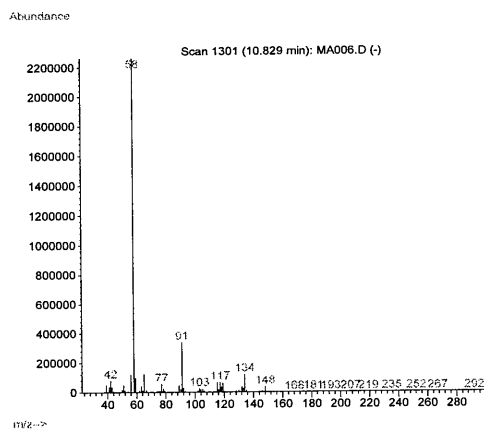
Ionization mode: EI, 70 eV

Mass range: 33-400

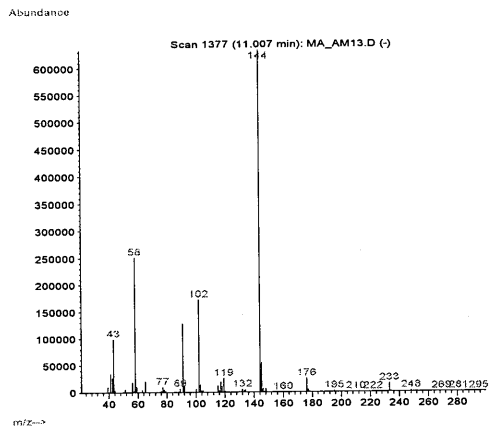
4. 結果及び考察

4.1 クロロギ酸プロピルによる誘導体化

覚醒剤は通常、分析に際して誘導体化が行われるが、今回は水中で迅速にアミンと反応するクロロギ酸プロピルを用いた。メタンフェタミン及びアンフェタミンはそのままでは特徴ないマススペクトルであるが、クロロギ酸プロピルで誘導体化することにより特徴あるマススペクトルとなった。図 3 にメタンフェタミン及びその誘導体のマススペクトルを示した。また、メタンフェタミン及びアンフェタミンは誘導体化により、 $K_{O/w}$ の値が増加し試料からの回収率の向上が期待できる。図 4 にメタンフェタミン及びアンフェタミンとそのプロピルギ酸誘導体の構造式及び $K_{O/w}$ を示した。試料 5 ml からの理論回収率を計算すると、メタンフェタミン及びアンフェタミンはそれぞれ 44、22%であり、そのプロピルギ酸誘導体はそれぞれ 98、94%となり理論上はかなりの回収率の向上となる。



Methamphetamine



Propyl formate derivative
of methamphetamine

図 3 メタンフェタミン及びその誘導体のマススペクトル

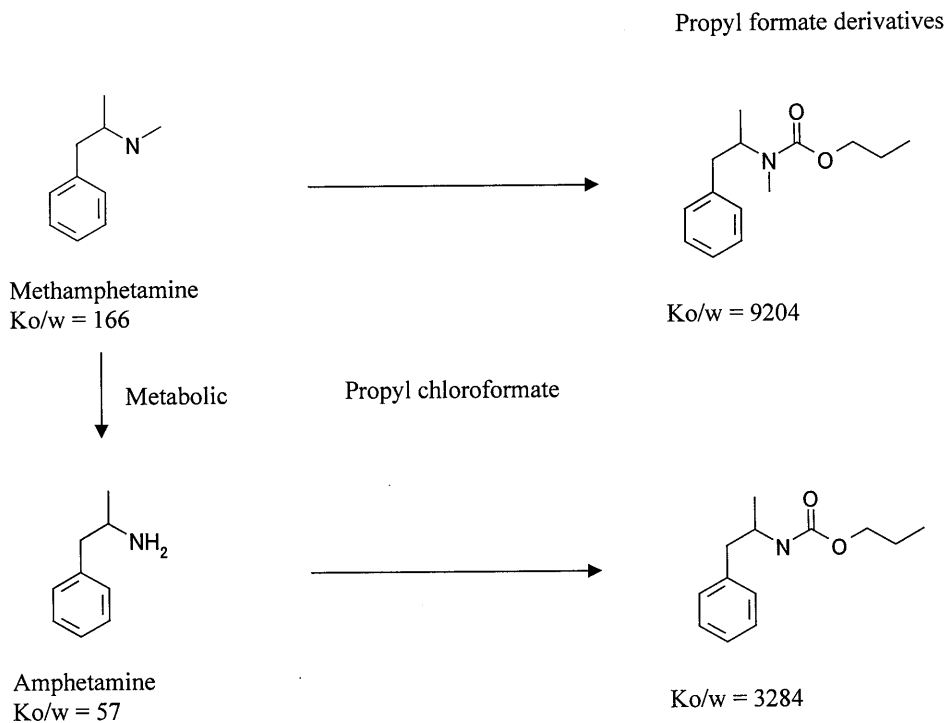


図 4 メタンフェタミン及びアンフェタミンとそのプロピルギ酸誘導体の構造式及び $K_{O/w}$

4.2 SBSE の抽出条件の検討

4.2.1 pH

メタンフェタミン塩酸塩及びアンフェタミン硫酸塩の $1 \mu\text{g}/5 \text{ ml}$ の水溶液を用い、炭酸カリウムで pH を 7.0、7.6、9.3、10.8 と調整し検討を行った。図 5 に pH のピーク面積に与える影響を示した。試料溶液をアルカリ性とすることで、抽出の効率が上がっており、pH 9.3 以上で抽出効率はほぼ平衡に達することが分かった。以上の検討の結果から、pH は 10.8 (炭酸カリウム 約 0.1g) として抽出を行うこととした。

4.2.2 抽出時間

メタンフェタミン塩酸塩及びアンフェタミン硫酸塩の $10 \text{ ng}/5 \text{ ml}$ の水溶液を用い、5、10、15、20、30、60 分の抽出時間で検討を行った。図 6 に抽出時間とピーク面積の関係を示した。ほぼ 30 分でピーク面積が平衡に達することが分かったが、分析時間の短縮を考慮し抽出時間は 20 分とした。

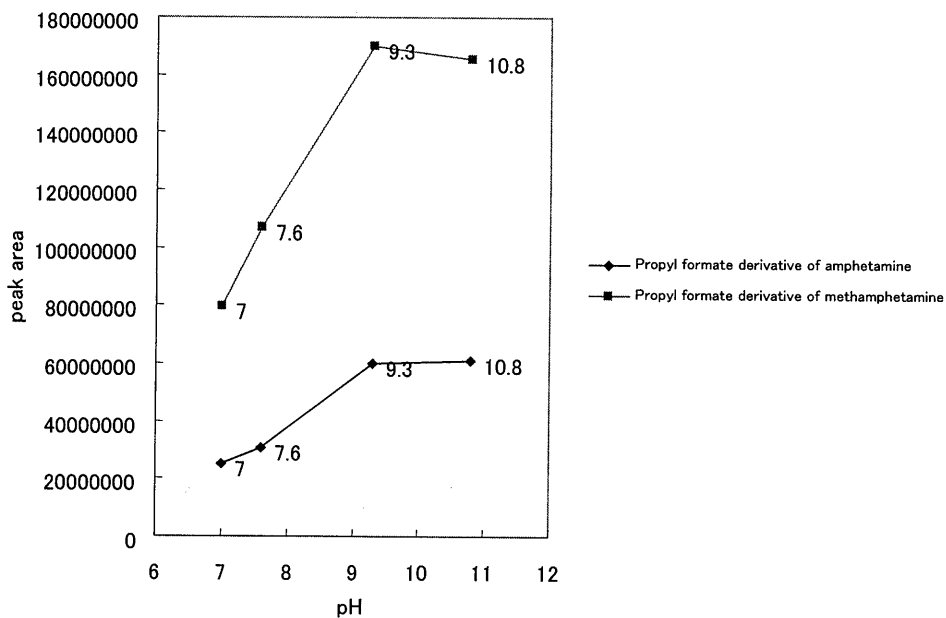


図 5 pH とピーク面積の関係

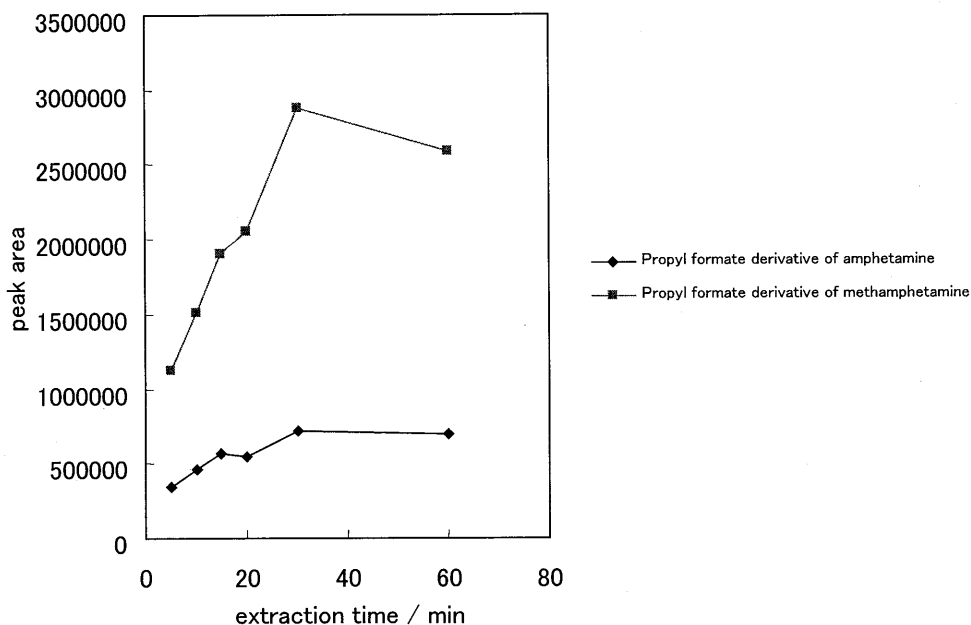


図 6 抽出時間とピーク面積の関係

4.3 定量

メタンフェタミン (MA) 及びアンフェタミン (AP) の確認はスキャンモードのマスペクトルで、MA 誘導体は m/z 144、58、102、91 の 4 種のイオンの検出、AP 誘導体では m/z 130、91、44 の 3 種のイオンの検出をもって行った。定量は MA は m/z 144、AP は m/z 130 のマスクロマトグラムにおけるピーク面積で行った。検量線は、0.1–10 ng/ml の範囲で MA 及び AP とも良好な直線性を示し、相関係数はそれぞれ 0.9987、0.9994 であった。図 7 にその検量線を示した。

尿 5 ml に MA、AP それぞれ 10 ng 添加した試料から Twister で抽出を行い、TDS-GC/MS で測定したピーク面積の繰り返し再現性 ($n=5$) は MA 13%、AP 12%であった。回収率は、濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液 1 μl を注入したピーク面積と比較して計算すると MA 42%、AP 23%であった。検出限界は、MA 0.1 ng/ml、AP 1 ng/ml であった。図 8 に尿 5 ml に MA、AP それぞれ 10 ng 添加した試料のトータルイオンクロマトグラム及び m/z 144、130 のマスクロマトグラムを示した。

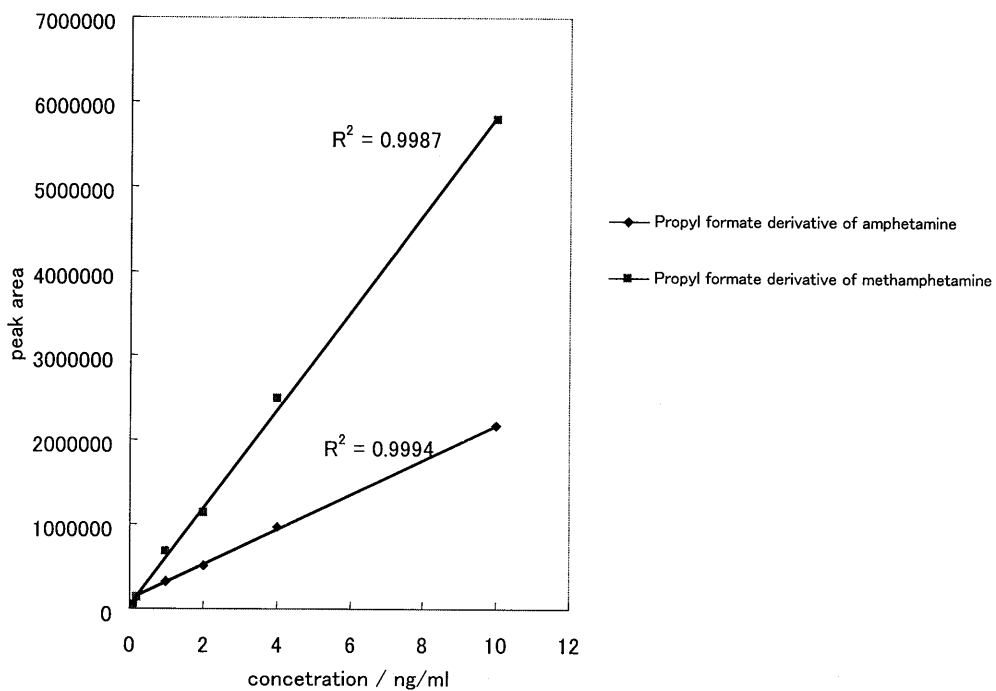


図 7 MA 誘導体及び AP 誘導体の検量線

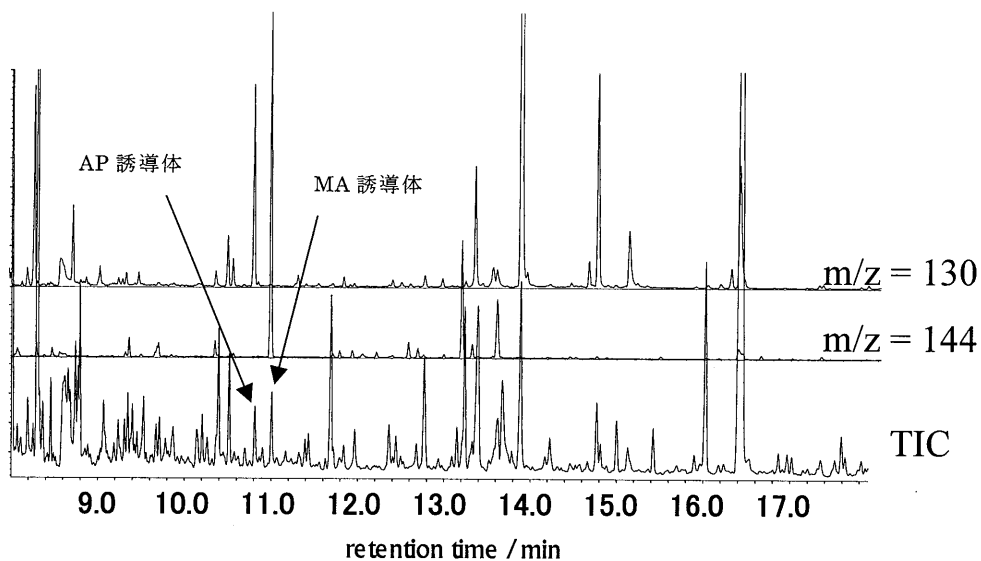


図 8 MA、AP 添加尿 (10 ng/5 ml) のトータルイオンクロマトグラム及び m/z 144、130 のマスクトマトグラム

4.4 実検体への適用

尿 10 μ l を蒸留水 5 ml で希釈し、本法で分析を行った。図 9 に、メタンフェタミン陽性の尿を分析した結果を示した。

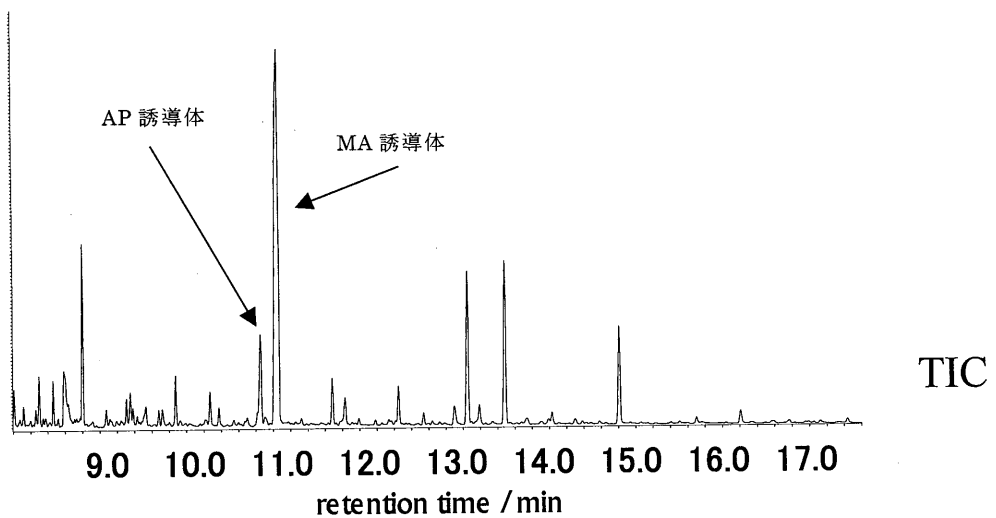


図 9 覚醒剤が検出された試料のトータルイオンクロマトグラム

5. 謝辞

覚醒剤のデータをご提供くださいました岩手県警察本部 及川肇氏に深く感謝致します。

ダイナミックヘッドスペース・GC/MS法による環境ホルモン調査項目の分析

東亜ディーケーケー商品開発部 前田

1、はじめに

近年、外因性内分泌かく乱作用を有する化学物質（環境ホルモン）の影響について研究が進められており、環境中の存在実態に関しても調査が行われている。調査対象成分となっている有機化学物質の中には発ガン性の疑いがある物質（有害化学物質:HAPs）と共通の物質がある。既に水中に微量存在する有害化学物質を測定するにはパージトラップGC/MS法やヘッドスペースGC/MS法などが用いられており、高感度な検出が可能となっている。環境大気中の揮発性の高い有害化学物質については容器採取GC/MS法による測定が行われている。この中には、非常に揮発性の高い物質（V VOC、25℃で蒸気圧380mmHG以上：EPA）も含まれている。しかし、わが国では水中の揮発性有機物のうちV VOCを測定するための条件は詳細に検討されていない。また、水質分析法記載の方法では標準試料の調整が困難であるとの指摘もあり、測定法以外にも問題があるようである。そこで、水中に微量存在する環境ホルモンと有害化学物質の同時測定を行う条件について検討し、人体への作用が異なる多くの化学物質を同時に検出・定量するために共通に用いることができる分析条件について調査した。既に有害化学物質の測定条件については、共通の成分に関して環境大気と水質の両面で利用可能であることを示している。従って、V VOCについても大気中の有害化学物質測定の方法で検討した内容を水質分析に移行し適用することができる。これらの成分間の対応について表1に示す。

水中に微量存在する環境ホルモンに関わる物質の調査が環境基準項目の測定や有害化学物質の調査と異なる点は、既存の方法でできる限り高感度な測定が要求されていることである。従って、同一の分離・検出系を用いた場合にはスタティックなヘッドスペース法よりパージトラップ法の法が試料導入量が多く有利である。一方、V VOCについては揮発性が高くまた水への溶解度が低いことから強制的なパージを行う必要性は少ない。このような場合には、気相の全量を導入するダイナミックヘッドスペース法を用いることでパージトラップ法に匹敵する試料導入量を得ることが可能である。そこで、V VOCについてダイナミックヘッドスペース法を用いて測定を行う条件を求め、この条件を他のVOCに適用した。また、V VOCの標準試料の導入方法についても検討を行った。

2、ダイナミックヘッドスペースGC/MS法

ダイナミックヘッドスペース法とパージトラップ法の違いを図1に示す。試料水をパージガスがバブリングしないような操作を行えば、ヘッドスペースの気相部分を導入するダイナミックヘッドスペースの状態になる。操作の手順は、パージトラップ装置と同様に濃縮管（トラップ）を用い、ヘッドスペース部分の気相を一旦濃縮管に捕集する。試料をパ

表1、揮発性有機物の対照表

No.	成分名	大気	水	環境ホルモン
V V O C	ジクロロジフルオロメタン (F-12)	○	1	
	ジクロロテトラフルオロエタン (F-114)	○		
	1 クロロメタン	○	2	H1
	2 ビニルクロライド	○	3	H2
	3 1,3-ブタジエン	○		H3
	4 プロモメタン	○	4	H4
5 クロロエタン	○	5	H5	
6 トリクロロフルオロメタン (F-11)	○	6		
V O C	7 1,1-ジクロロエチレン	○	◎7	
	8 トリクロロトリフルオエメタン (F-113)	○		
	9 3-クロロ-1-プロペン (塩化アリル)	○		H6
	10 ジクロロメタン (塩化メチレン)	○	◎8	
	11 アクリロニトリル	○		
	12 シクロペンタン			H7
	13 トランス-1,2-ジクロロエチレン		◎9	
	14 メチル-t-ブチルエーテル			H8
	15 n-ヘキサン			H9
	16 1-プロモプロパン			H10
	17 1,1-ジクロロエタン	○	10	H11
	18 cis-1,2-ジクロロエチレン	○	◎11	
	19 2,2-ジクロロプロパン		12	
	20 2-プロモプロパン			H12
	21 プロモクロロメタン		13	H13
	22 クロロホルム	○	◎14	
	23 1,1,1-トリクロロエタン	○	◎15	
	24 1,1-ジクロロプロペン		16	
	25 四塩化炭素	○	◎17	
	26 ベンゼン	○	◎18	
	27 1,2-ジクロロエタン	○	◎19	
	28 トリクロロエチレン	○	◎20	
	29 1,2-ジクロロプロパン	○	◎21	
	30 ジプロモメタン		22	
	31 プロモジクロロメタン		23	H14
	32 cis-1,3-ジクロロプロペン	○	◎24	
	33 トルエン	○	◎25	
	34 trans-1,3-ジクロロプロペン	○	◎26	
	35 1,1,2-トリクロロエタン	○	◎27	
	36 テトラクロロエチレン	○	◎28	
	37 1,3-ジクロロプロパン		29	
	38 ジプロモクロロメタン		◎30	H15
	39 1,2-ジプロモメタン	○	31	
	40 クロロベンゼン	○	32	H16
	41 1,1,1,2-テトラクロロエタン		33	H17
	42 エチルベンゼン	○	34	H18
	43 1,3-キシレン	○	◎35	
	44 1,4-キシレン	○	◎36	
	45 1,2-キシレン	○	◎37	
	46 スチレン	○	38	
	47 プロモホルム		◎39	
	48 イソプロピルベンゼン		40	
	49 1,1,2,2-テトラクロロエタン	○	41	H19
	50 プロモベンゼン		42	
	51 1,2,3-トリクロロプロパン		43	H20
	52 n-プロピルベンゼン		44	
	53 4-エチルトルエン	○		
54 2-クロロトルエン		45		
55 1,3,5-トリメチルベンゼン	○	46		
56 4-クロロトルエン		47		
57 ter-ブチルベンゼン		48		
58 1,2,4-トリメチルベンゼン	○	49		
59 sec-ブチルベンゼン		50		
60 1,3-ジクロロベンゼン	○	51		
61 4-イソプロピルトルエン		52		
62 1,4-ジクロロベンゼン	○	◎53		
63 ジシクロペンタジエン			H21	
64 1,2-ジクロロベンゼン	○	54		
65 n-ブチルベンゼン		55		
66 1,2-ジプロモ-3-クロロプロパン		◎56		
67 1,2,4-トリクロロベンゼン	○	57		
68 ヘキサクロロ-1,3-ブタジエン	○	58		
69 ナフタレン		59		
70 1,2,3-トリクロロベンゼン		60		

有害化学物質 (EPA:T014) 有害化学物質 ◎:水質基準項目

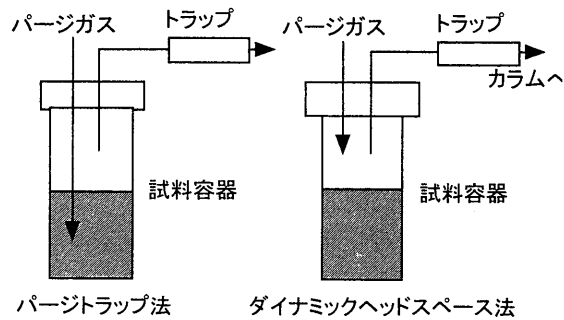


図1、パージトラップ法とダイナミックヘッドスペース法

ージした後、濃縮管内に残留する水分を系外に排出するためにヘリウムで濃縮管内をパージ（ドライパージ）する。ドライパージ後、捕集した試料の全量をキャリアガスで加熱回収してカラムに導入し分離・検出する、という順番になる。分離と検出の条件を共通として回収率を比較した一例を表2に示す。ダイナミックヘッドスペース法では試料溶液に塩を添加することで回収率の改善がみられるが、溶解度があまり変化しない1,4-ジクロロベンゼンなどは改善は期待できない。これはスタティックなヘッドスペース法についても同じである。

3、クライオフォーカスの条件

VVOCのように揮発性が高い成分をカラムに導入する際には、クライオフォーカスを用いて回収時に成分ピークのバンド幅を狭くすることが効果的な分離を行う上で有効である。濃縮管から回収する直前では、揮発性の高い成分は濃縮管の出口側まで移動しており、加熱回収時にキャリアガスの流量でカラムに導入するにはある程度の時間がかかる。従って、回収時に成分ピークが広がり、検出が困難となるのでカラム先端部分での再濃縮を行わなければならない。

今回の条件検討では、特にVVOC成分のピークをフォーカスするためのクライオフォーカスについて重点的に調べた。

クライオフォーカスの手法には、液体窒素を用いた低温凝縮による方法と液化炭酸を用いたカラム液相の保持を伸ばすクロマト的なフォーカスの二つの手法がある。低温凝縮によるクライオフォーカスでは、フォーカス部で水が凝縮しキャリアガスが流れなくなると

表2、ダイナミックヘッドスペース法による試料の導入

成分名	パージトラップ	ダイナミックヘッドスペース	塩添加
1 1,1-Dichloroethene	97.8	95.0	97.2
2 Dichloroethane	75.2	72.5	86.3
3 trans-1,2-Dichloroethene	105.0	62.5	81.1
4 cis-1,2-Dichloroethene	99.1	52.2	83.3
5 Chloroform	115.9	52.6	71.1
6 1,1,1-Trichloroethane	99.3	71.4	90.5
7 Carbon Tetrachloride	97.0	68.1	89.8
8 Benzene+1,2-Dichloroethane	96.8	52.0	84.8
9 Trichloroethene	101.7	55.5	80.9
10 1,2-Dichloropropane	95.9	47.1	85.1
11 Bromodichloromethane	93.8	41.7	84.3
12 cis-1,3-Dichloropropene	91.4	37.4	83.9
13 Toluene	99.4	50.2	80.8
14 trans-1,3-Dichloropropene	84.0	30.5	83.4
15 1,1,2-Trichloroethane	75.0	31.8	83.2
16 Tetrachloroethene	100.5	51.3	78.0
17 Dibromochloromethane	80.1	30.9	82.2
18 1,3-,1,4-Xylene	102.7	42.1	71.2
19 1,2-Xylene	107.5	40.2	67.2
20 Bromoform	62.6	22.4	82.3
21 1,4-Dichlorobenzene	94.1	26.0	59.9

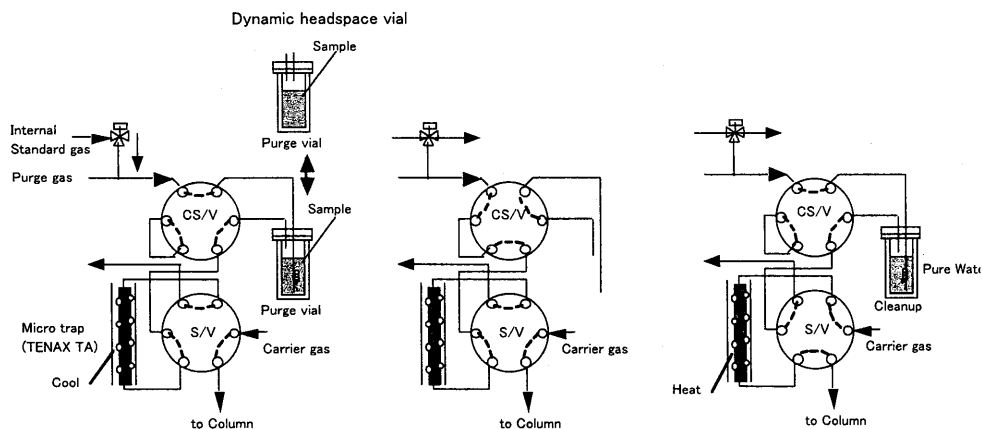
いう現象が起きる。一方クロマト的なフォーカスでは液相の保持を利用するので水による凝縮の恐れはないが、V VOCのような成分については十分な保持が期待できないという問題がある。この問題を解決するために固定相液相の膜厚を厚くして効果的なフォーカスを行えるようにした。この結果については実際の例で示す。

4、V VOCの標準試料について

水質分析で行われているようにV VOCの標準試料をメタノール溶液で調製することは困難である。また、注意して作成しても水に添加するときには揮散する懸念がある。表1に示したように有害大気汚染物質の測定用標準ガスにはV VOC成分が含まれており、簡単に入手が可能である。そこで、この標準ガスを一定量試料に添加することでV VOCの校正を行うことが可能である。

5、分析条件と使用装置

今回の検討では、パージトラップ/ダイナミックヘッドスペース装置 (VOC-100型：東亜ディーケーケー製) をGC/MS (HP 5971型：HP製) に取り付けて用いた。パージ部分のフローを図2に示す。内標準ガスを自動的に添加する装置を付加しており、この部分からV VOCの標準ガスを導入することができる。標準試料には、環境水質分析用54成分混合試料 (東京化成工業製、VOC-54) に、環境ホルモンの対象成分 (V VOCを除く) を添加し、各成分濃度を $10 \mu\text{g/mL}$ の混合試料とした。この試料を適宜パージ容器内の精製水に添加して測定を行った。パージ容器は10 mLで、これに試料水5 mLを入れ、 20°C に保温してパージを行った。V VOCの評価には環境大気分析で用いる41成分の混合標準ガス (高千穂化学製、HAPS) を用い、パージ時にパージ容器に一定量添加した。水質分析の条件に基づいてV VOCを含む試料の分析条件の検討を行



パージトラップ/ダイナミックヘッドスペース トライパージ 加熱回収とパージガススライシ洗浄

図2、パージトラップ/ダイナミックヘッドスペース装置の構成と動作 (内標準添加機構付き)

った結果から得た分析条件を表3に示す。基本的な操作条件は水質分析（揮発性成分）用と同じである。V VOCを測定する部分は大気中の有害化学物質を測定する条件に相当するが、試料導入部分が共通なので水質分析と同様の条件を用いることができた。本検討でのクライオフォーカスの部分にはメチルシリコンカラム（膜厚 8 μ m、内径 0.53mm）を用いた。

表3、分析条件

カラム：SPB624（スペルコ製）、内径 0.25mm、長さ 60m、膜厚 1.4 μ m

キャリアーガス：He、1.5ml/min.

カラム温度：40℃、6.5min.保持、4℃/min.で 200℃まで昇温

検出法：SIM

6、測定例

V VOC成分を含む標準ガスの測定例を図3に示す。図中の番号は環境ホルモン調査項目と水質項目（EPAの分析法 502 に記載の成分）と有害大気汚染物質を保持時間の順に並べた番号である。標準試料の VOC54 は EPA の 60 成分から V VOC に相当する 6 成分を除いたものである。H のついた成分は環境ホルモン調査項目の対象成分である。図中で番号が一部抜けている部分があるが、これは H A P S 標準ガスに含まれていない成分があるためである。このように V VOC をガスとして添加することで定量が可能となる。また、ダイナミックヘッドスペース法による試料導入ではその他の環境ホルモン調査項目の導入・測定も十分に行えるので、一斉分析が可能である。

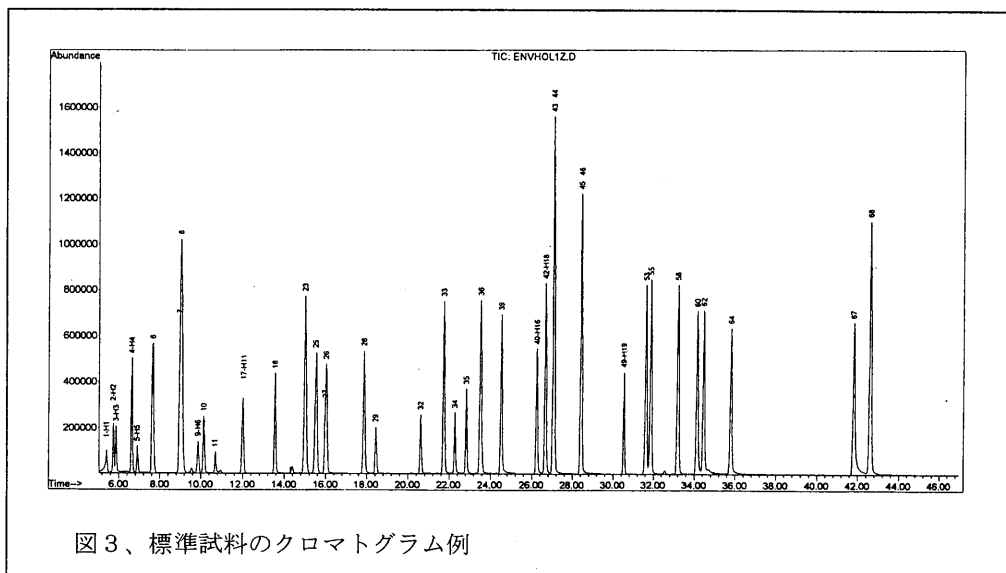


図3、標準試料のクロマトグラム例

機器分析による口臭測定

島津製作所分析機器事業部

喜多純一、赤丸久光、青山佳弘

大阪大学大学院歯学研究科

雫石聡、田中宗雄、安栗秀肇

要旨

従来の口臭測定は、主に機器分析による VSC (volatile sulfur compounds) の測定と、6 段階を与える官能検査が行われてきた。機器分析による VSC の測定では定量的なデータが得られるものの、口臭中の VSC 以外のおいが無視されることになり、官能検査ではパネルの認識の違いや、鼻が同一種のおいを常時嗅いでいると、そのにおいに対して鈍感になるという所謂順応の問題があり、再現性と信頼性に疑問があった。今回我々は、食品方面で使用され始めているにおい識別装置のうち、高感度化された装置を用いて口臭測定を行った。

測定は、何らかの理由により口臭を自覚し、治療に訪れた 41 名を対象とした。サンプリングには、ポリエチレンテレフタレート製の容量 3L のバッグを用いて行なった。測定に際しては、ガスクロマトグラフィーによる、VSC 3 成分 (硫化水素、メチルメルカプタン、硫化ジメチル) の測定と官能検査を同時に行なった。におい識別装置には、捕集管と 6 個の金属酸化物半導体を組み合わせた島津製作所製「FF-1」を用いた。

このシステムは、捕集管でのおいの濃縮が可能で、さらに動作方法によってはサンプル中の水分の影響を除くことができる。また、得られた信号を主成分分析することにより、においの強度と質に分けて表現することができるとともに、重回帰分析を用いれば、官能と同じレベルでの定量が可能となる。GC で得られた VSC のトータル値と官能測定の結果の相関を重回帰分析により求めてみるとそれほど高くなかったが ($r=0.401$, $p<0.009$)、におい識別装置による各センサのピーク値と官能測定の結果の相関を重回帰分析で求めると ($r=0.718$, $p<0.000$) と比較的高い値となった。これらの結果は、におい識別装置が VSC 以外の成分をも取り込んで測定しているため官能との対応が可能となったものと考えられる。

はじめに

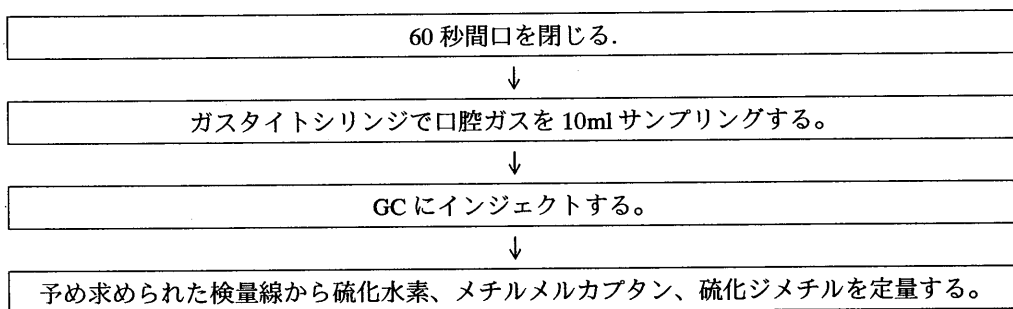
口臭の測定は、6 段階の官能測定が基準となっているが、その測定には個人差によるばらつき、体調や嗅覚独特の順応という効果により、再現性に問題があるのではないかと指摘されている。一方、機器による口臭の測定としては、ガスクロマトグラフィー (GC) に

よる VSC 3 成分の測定があり、再現性のあるデータが得られるが VSC 以外の成分については測定していないため、場合によっては官能との対応について疑問を呈される場合がある。また、VSC の GC 以外の測定手段としては、硫化水素にターゲットを合わせた電気化学センサを内蔵したハリメータ法があるが、これも GC と同様の問題が指摘されている。さらに、歯周病菌に絞った測定として、尿素が歯周病菌の作用よりアンモニアと炭酸ガスに分解される現象を利用した歯周病を原因とする口臭装置もあるが、口臭の原因によっては官能と合わないことが予想されている。

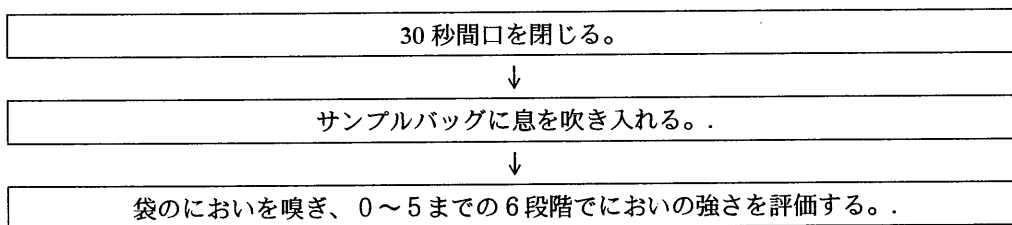
実験方法

非験者は、大阪大学予防歯科に来院された 63 人のうち、VSC 測定で 0 となった 10 人と、官能測定で 1.5 以下となった 7 人を除いて行った。

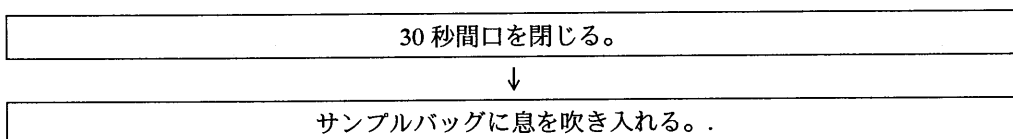
GC での測定方法



官能測定の方法



におい識別装置





におい識別装置での測定を行う。

におい識別装置 FF-1 (Fig. 1) の構成は、Fig.2 のようになっており、サンプルバッグからのサンプルガスは、一旦捕集管に集められたあと、センサに導かれる。センサは、金属酸化物半導体を用いており、各センサは特定のにおい分子に反応するのではなく、広くにおい物質を感じるが、特性がセンサごとに異なっている。
今回、この装置を用いて、次の 3 種類の測定を試みた。(1)

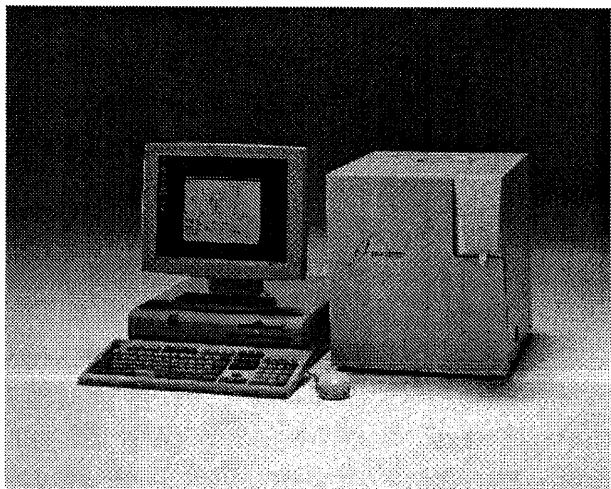


Fig.1 におい識別装置「FF-1」

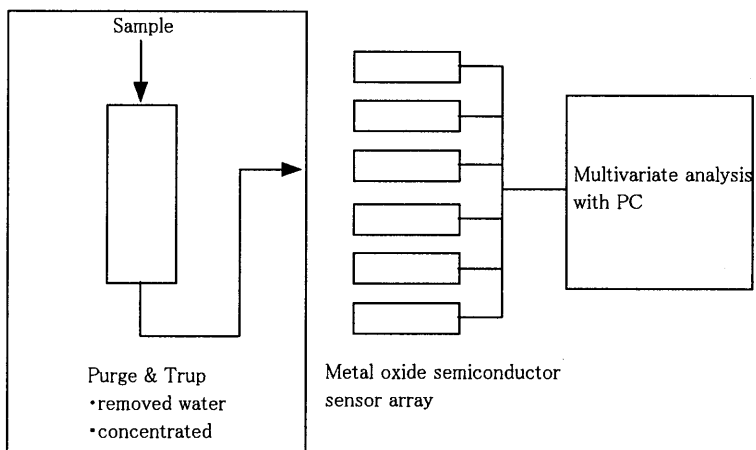


Fig. 2 におい識別装置「FF-1」の構成

FF-1 での測定モード

通常モード (All-note measurement mode)

これは、全臭気成分を一度にセンサに導き測定するモードで基準となるモードとなる。具体的な動作方法は、図に示すように、まず、サンプルバッグからのサンプルガスをポンプで捕集管に導く。このときの流量は 165cc/min で今回は 60 秒サンプリングした。このと

きの捕集管温度は 40℃とした。

その後、捕集管に純窒素を 90 秒間導入し、捕集管に貯まった不要の水分を捕集管から追い出す。その後さらに、捕集管の温度を 220℃まで加熱し、臭気成分を追い出し、センサ室に導く。センサ室には 6 個の特性の異なる金属酸化物半導体においてセンサ素子が配置されており、それらセンサにはほぼ同時に臭気ガスが供給される。

このときにセンサの抵抗が変化し、Fig.3 のような信号が得られる。今回は、それぞれのセンサの信号として、ピーク強度をその後の解析に用いた。

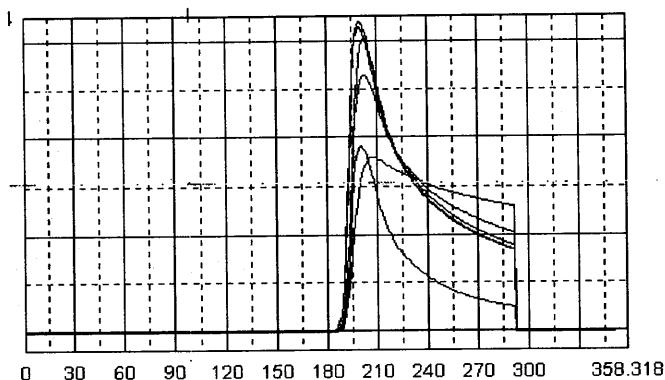


Fig. 3 におい識別装置「FF-1」の生信号

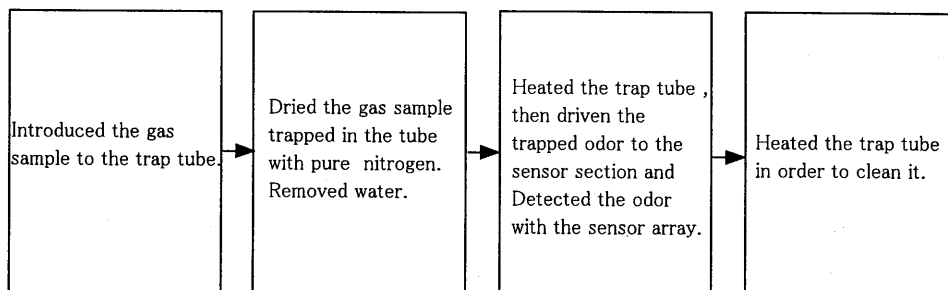
トップノートモード (Top-note measurement mode)

このモードは、臭気成分のうち、比較的揮発性の高い（沸点の低い）成分のみを測定するモードで、図に示すように、サンプルガスを 30 秒間捕集管に貯めた後、窒素ガスによるドライパージを行わず、また、捕集管の温度もあげず、窒素ガスを導入し、出てくるガスをそのままセンサ部に供給する方法である。

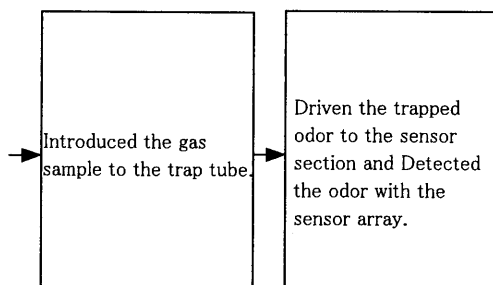
ディープノート (ラストノート) モード (Deep-note measurement mode)

通常モードのドライパージ時に、捕集管の温度を上げておいて、系外に臭気中の低沸点成分を追い出した後、さらに捕集管の温度を上げて、比較的高沸点成分のみを測定するモードである。今回は、120℃までドライパージ時に捕集管の温度を上げたあと、さらに 220℃まで加熱したときのデータを用いた。

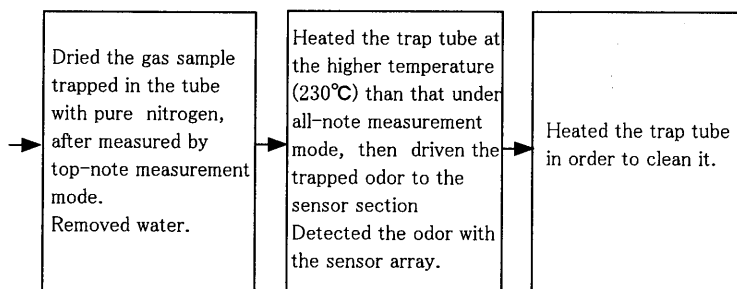
All-note measurement mode



Top-note measurement mode



Deep-note measurement mode



実験結果

GC の測定結果

検出器に FPD を用い、硫化水素、メチルメルカプタン、硫化ジメチルを測定した。⁽²⁾ 臭気は、それらの濃度の対数に比例すると考えられることから、求められた各成分の濃度の対数を用いて解析した。Fig.4 は、測定値間の相関関係を表しており、例えば升目 A については、縦軸が硫化水素濃度の対数、横軸がメチルメルカプタン濃度の対数ということになる。この図より、求めた 3 成分間での相関が高いが、官能検査との相関はあまりないことが分かる。また、それら VSC 3 成分の合計であるトータル VSC も官能との相関が低いことが分かる。

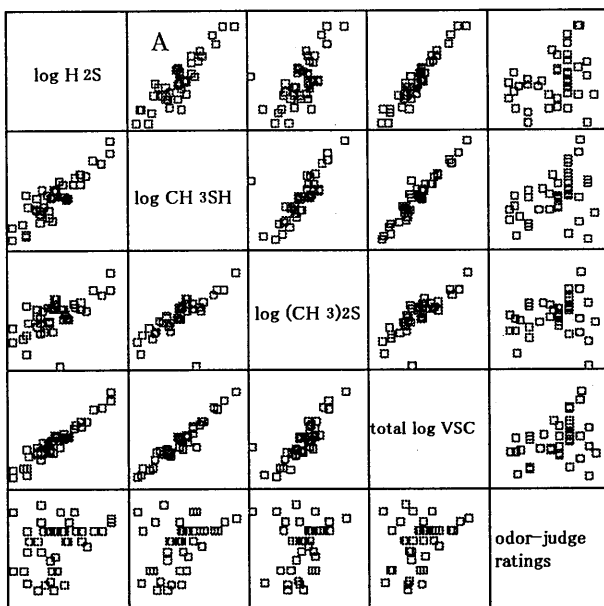


Fig. 4. GC 測定値（濃度の自然対数）と官能値の相関.

GCによるトータルVSC濃度の対数と、官能検査の結果の相関を拡大したのが図5である。これによると、相関係数は0.4程度と低い、測定データを見ると相関係数ほど悪くないように見えるが、官能試験では臭気が高い割に、VSC濃度ではあまり高くない部分にデータが飛んでいることが分かる。

このことから、VSC以外の臭気ガスにより、口臭を放つ場合があることが推測される。

ちなみに、今回の非験者は、測定日の朝は、食事と歯磨きを行わないようお願いしているので、歯磨きの香料が問題となっているとは考えられない。

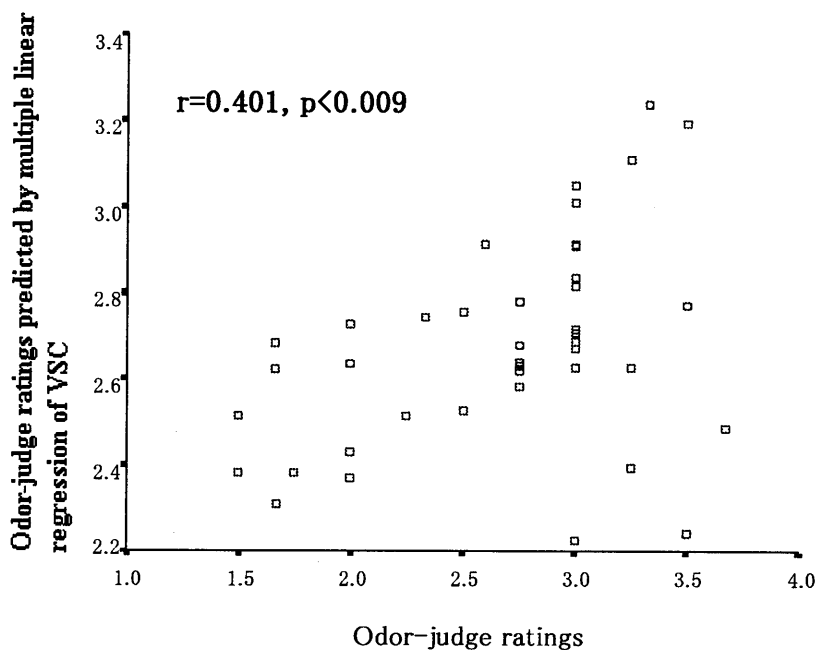


Fig. 5. GC 測定によるトータル VSC と官能評価との相関 (重回帰分析)

におい識別装置の測定結果

1. 通常モードの測定結果

通常モードでのセンサ出力（6チャンネル分）と、官能検査との相関を求めた。（Fig.6）
これによると、相関係数が0.31とGCのトータルVSCよりも悪い結果となり、データもみても、ある程度の相関はみられるものの、非常にばらつきが大きい結果となり、またばらつきに一定の傾向がみられなかった。

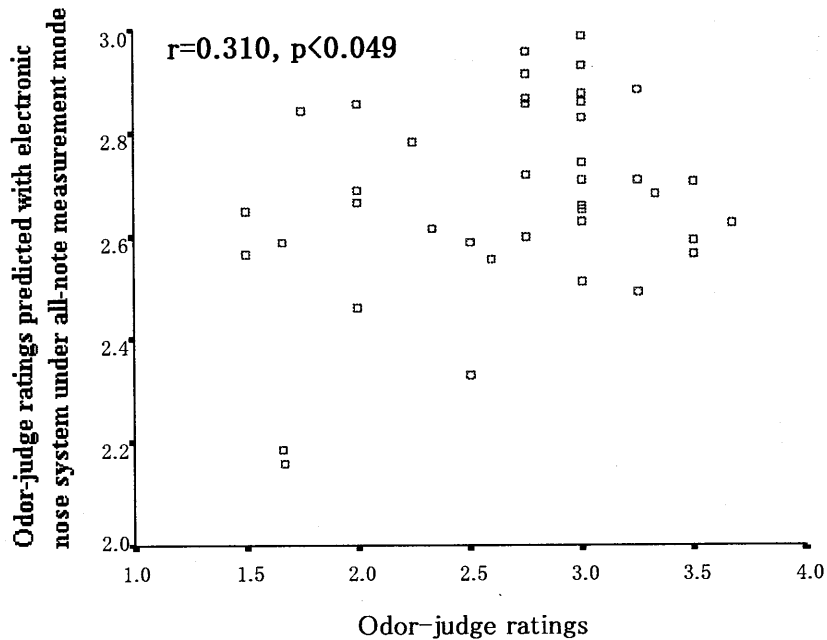


Fig. 6. 官能検査とにおい識別装置での通常モードの測定結果との相関

2. におい識別装置によるトップノートモード測定結果

口臭に関与している臭気物質は、硫化水素のように軽い成分ではないかという予測から、におい識別装置においても低沸点成分のみを測定できるように、トップノートモードでの測定を試みた。その結果、図7に示すように、相関が0.718まで向上した。

このことから、口臭では比較的軽い成分が官能的には支配的していることが分かる。

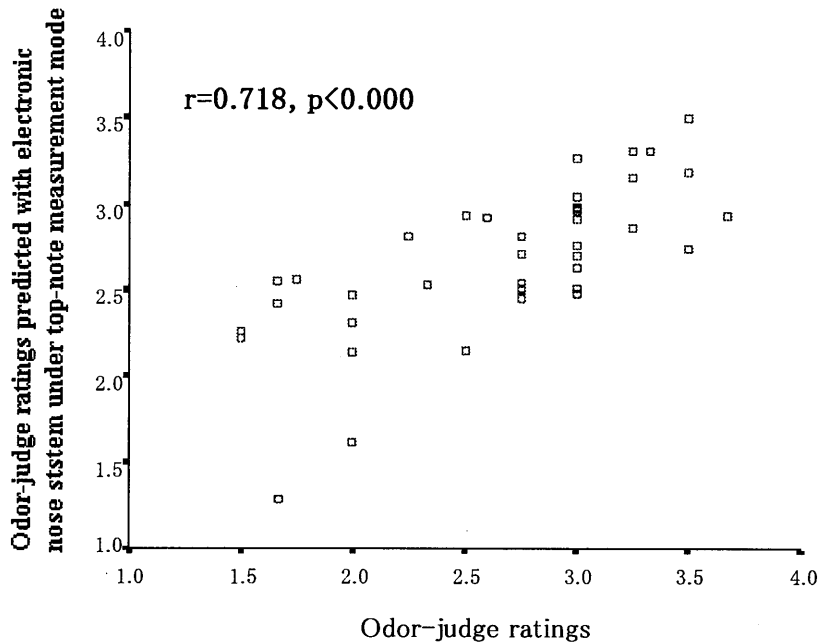


Fig. 7. 官能検査とにおい識別装置でのトップノートモードの測定結果との相関

3. におい識別装置によるディーブ（ラスト）ノートモード測定結果

2とは逆に、今度は、比較的沸点の高い、ディーブノート成分のみを用いて、測定を試みた。その結果、図8に示すように、相関係数0.32と低く、データを見てもらつきが大きく、全く相関が得られていないという結果となった。

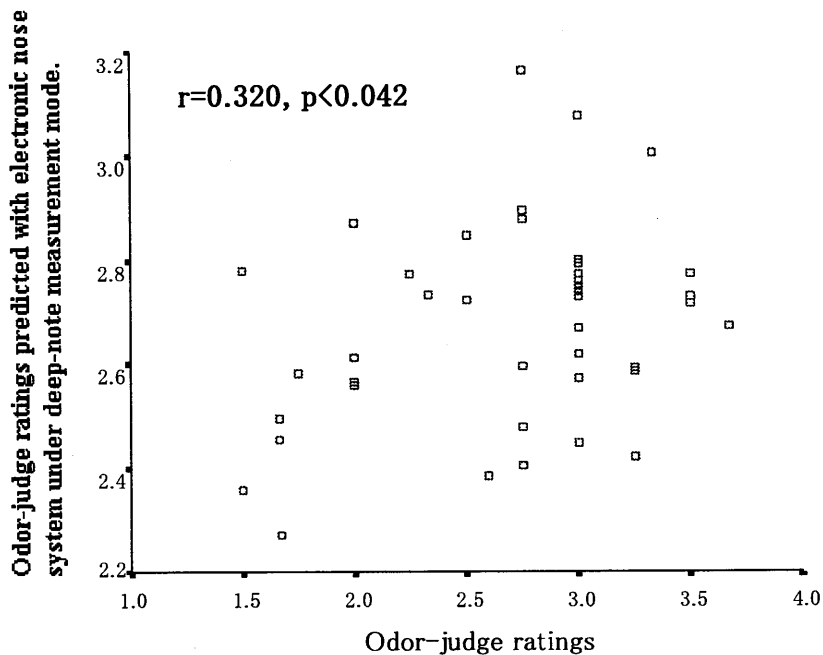


Fig. 8. 官能検査とにおい識別装置でのディープノートモードの測定結果との相関

考察

GC による VSC の測定と、官能検査では、弱い相関があるものの、官能検査で臭気が高く出ても、VSC 値が低くでてしまう、すなわち VSC に関係しない臭気が存在することが推察された。

そのような場合、におい識別装置を用いれば、成分の測定漏れが少ないので、官能との相関が得られやすく、さらにトップノートモードを用いて、低沸点成分にだけ焦点を当てることにより、相関係数を増加させられることが分かった。

今後は、これらの原因物質の特定や歯周病との関連などを調べていく予定である。

参考文献

- (1) J.kita etal: Technical Digest of the 17th Sensor Symposium 301-305 (2000)
- (2) 林裕之ら：フレグランスジャーナル 臨時増刊 (5) 436-439 (1981)

SPME を用いたカビ臭の分析及びその他の分析例紹介

(株)日立ハイテクノロジーズ

本田俊哉

(1)試料前処理法としてのSPME(固相マイクロ抽出)について

HPLCおよびGCの試料の前処理として、(1)抽出・(2)濃縮・(3)精製などの過程が必要になりますが、これに要する時間や手間は分析装置の進歩に比べるとはるかに遅れているのが現状です。

特に(1)抽出の場合に多量の溶媒を利用する、(2)濃縮の際、有害な溶媒に大気に希散する、(3)複雑な操作が必要であるなどの問題点を抱えています。特に(1)及び(2)は有機溶媒による環境汚染などの問題を引き起こす可能性があります。

このような前処理操作が抱える問題点を解決する方法の一つとして、SPMEを用いる前処理方法が挙げられます。ここでは、SPMEを利用して前処理を行った実際の応

用についてご紹介します。

SPME法はJ.Pawliszym教授(カナダ)が開発した方法で、スベルコによって製品化されたものです。日立ではこのSPMEをガスクロマトグラフ用オートインジェクタAI-7100に組み込み、その操作を自動化しました。以下に、SPMEの原理及び自動化の内容等の紹介を行います。

固相マイクロ抽出(SPME)

●従来前処理

ろ過 → 溶媒抽出 → 濃縮 定容 GC/MS
固相抽出

問題点：工程煩雑、溶媒消費量が多い

●簡易前処理

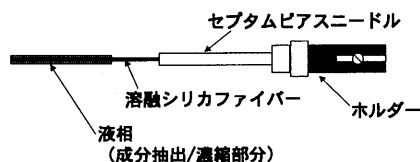
ろ過 → 自動化固相マイクロ抽出(SPME)/GC/MS

特徴：工程が単純、抽出に溶媒使用せず

【SPMEの外観】

固相マイクロ抽出(SPME)

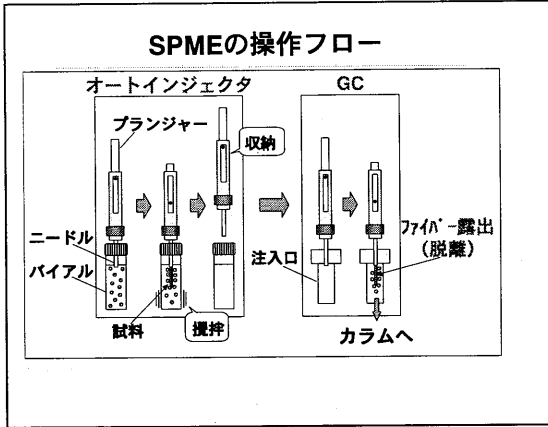
SPMEファイバーの外観



左にSPMEファイバーの外観図を示します。ホルダーにはプランジャーが挿入されており、ファイバーを出し入れする際の使用します。また、セプタムピアスニードルは、GCにインジェクションする際にシリカファイバーが保護するために用いられます。溶融シリカファイバーの先端には、抽出相(液相)がありますが、ここで成分の抽出や濃縮を行います。

【SPMEの操作フロー】

SPMEの操作フローについて簡単に説明します。左図を参照ください。これは、GC



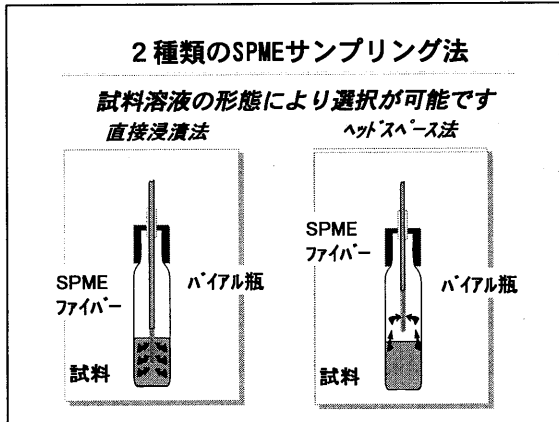
に組み込まれたオートインジェクタの例を示しています。

- (1) ファイバーを格納したニードルをバイアルに挿入します。
- (2) プランジャーを押す事により、ファイバーが試料中に浸漬します。必要であれば、機械的な振動で拡販します。
- (3) ファイバーをニードル内に格納し、バイアルから抜き去ります。
- (4) ホルダーをGCのインジェクタ

ーへ移動し、ニードルを注入口に挿入します。

- (5) プランジャーを押す事により、注入口内にファイバーを露出させます。
 - (6) 吸着された成分は注入口内で脱離(熱による脱離)し、カラムへ入ります。
- これらの操作では、抽出用の溶媒は一切使用しません。

【2種類のSPMEサンプリング法】



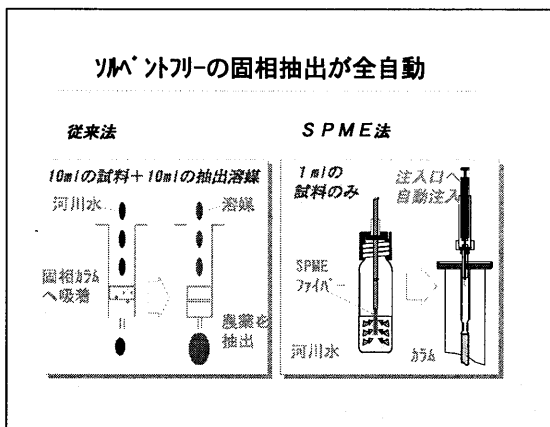
SPMEによる抽出・濃縮には2種類の方法があります。一つが「直接浸漬法」、もう一つが「ヘッドスペース法」です。

○ 直接浸漬法：これは、ファイバー(液相)を直接試料液に浸漬し、目的成分を吸着させる方法です。目的成分はファイバー(液相)と試料溶液の分配係数が一定になるまで、液相に吸着していきます。

○ ヘッドスペース法：蒸気圧を持つ物質即ち、バイアル内で気化

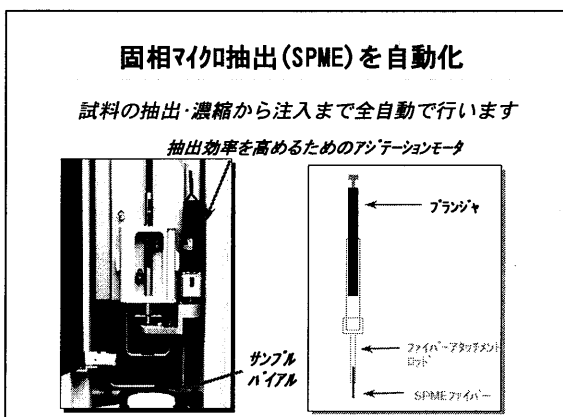
した物質は、気相にあるファイバー(液相)に吸着されますが、気相/液相で平衡を保つため、物質はさらに気化し、ファイバーにさらに吸着されます。このようにして、目的成分をファイバー(液相)に大量に吸着させることができます。

【従来法との比較】



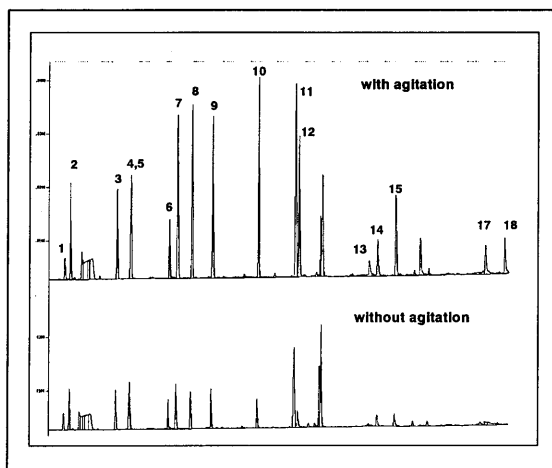
左図に従来の固相抽出法とSPME法の違いを示します。従来法では吸着させた成分を抽出させるため、大量の溶媒が必要になりますが、SPME法では、熱による脱着のため、有機溶媒は一切必要ありません。また、必要な試料も従来の1/10で済むなど、効率的です。

【AI-7100オートインジェクタ】



日立ではこれらのSPMEの処理を自動化したGC用オートインジェクタAI-7100を提供いたします。試料の抽出・濃縮から注入まで全自動で行います。左の写真はAI-7100オートインジェクタのSPME部分を拡大したものです。SPMEの横には抽出効率を高めるためのアジテーション(外部振動による拡販)モーターが付いており、抽出の効率をあげることができます。

下の2つのクロマトはこのアジテーション有・無しによるデータの違いを示しています。



【フェノール 50ppb 混合溶液】

上；アジテーションあり

下；アジテーションなし

【条件】 G-7000(FID)

30 m x 0.25 mm 0.25- μ m DB-5TM,
40°C(4 min)-12°C/min-260°C(1.67 min). キャリヤガス: He, 37 cm/s at 60°C.

【考察】

ピーク13～18の難揮発性フェノールにアジテーションの効果が顕著に見られる。

【分析例の紹介】

(2)固相マイクロ抽出-GC/MS法によるかび臭の分析

1.はじめに

上水水質基準の快適水質項目として、かび臭物質である2-メチルイソボルネオール（以下2-MIBと記す）とジェオスミンの目標値が設定されています。この目標値は、0.00001 mg/L と低い濃度となっており、これまで種々の濃縮方法が試みられてきました。

上水試験方法には、これらの物質の分析方法として、パージ・トラップ法と固相抽出法が採用されています。しかしパージ・トラップ法では、かび臭成分の吸着管と流路への吸着や2-MIBの分解などから、目標値の1/10である1 ng/Lを検出することは非常に困難でした。また、固相抽出法では操作が煩雑なため精度を確保するのに熟練を要します。そこで、簡便で迅速な濃縮方法として近年注目されている固相マイクロ抽出法（SPME：SolidPhase Micro Extraction）を用い、抽出から定量まで自動で測定する手法を紹介します。

2.試薬

水質試験用、2-MIB およびジェオスミン混合標準液（各0.1 g/L メタノール溶液）をメタノール（残留農薬・PCB試験用）で希釈して、0.01～1 mg/Lの希釈標準試料を調製しました。塩化ナトリウムは特級試薬を、精製水としてナチュラルミネラルウォーターを使用しました。

3.前処理

検量線作成試料は、10 mL用バイアルにナチュラルミネラルウォーター10 mLを採り、塩化ナトリウムが室温で過飽和状態になるように（NaCl 3.5～4 g程度）加えます。これに0.01～1 mg/Lの希釈標準試料を各1 L添加し、直ちにセプタムをアルミキャップで固定します。検水も同様に10 mL採り、塩化ナトリウムを加え、さらにメタノールを1 L添加します。試料はよく攪拌します。

4.測定条件

— SPME —

ファイバー：50/30 m DVB/Carboxen/PDMS

抽出条件：30 min（室温、ヘッドスペース、攪拌あり）

脱着条件：200℃、5 min

— GC —

カラム：DB-5、30 m、0.25 mmID、0.25 m

カラム温度：40℃（5 min）—8℃/min—100℃—20℃/min—250℃（5 min）

注入口：200℃、スプリットレス5 min

キャリアガス：He、1.5 mL/min

トランスファーライン：250℃

— MS —

イオン化法：EI

スキャン範囲：m/z = 50 ~ 180

表1 2-MIBおよびジェオスミンの再現性（1~100 ng/L）
Reproducibilities of 2-MIB and Geosmin

濃度 (ng/L)	変動係数 (CV%)	
	2-MIB	Geosmin
1	4.1	8.8
10	6.9	8.4
20	4.3	6.8
50	8.8	9.3
100	7.8	9.4

5.結果

(1)検量線作成試料の再現性

表1に異なる濃度における変動係数を示します。1~100 ng/Lにおいて、2-MIBおよびジェオスミンともに変動係数(CV%)は10%(n=5)以下となり、良好な結果が得られました。

(2)検出限界

かび臭2成分の検出限界(標準偏差×3に相当する濃度)は、10 ng/Lの標準偏差(n=5)より、2-MIBが0.693 ng/L、ジェオスミンが0.695 ng/Lとなりました。

図1に標準試料10 ng/Lのマスクロマトグラムを示します。これより1 ng/Lを十分検出可能であることがわかります。また、3DQMSは常にフルスキャン測定していますので、マススペクトルによる定性が行えます。

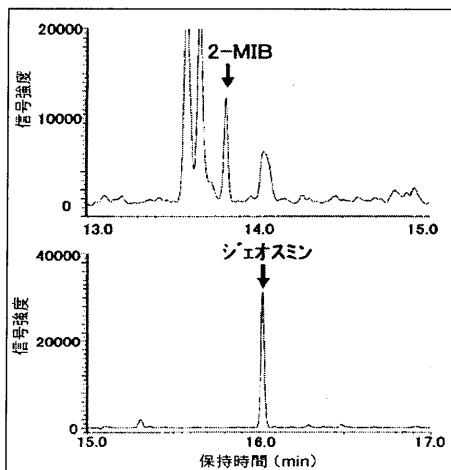


図1 2-MIBおよびジェオスミンのマスクロマトグラム

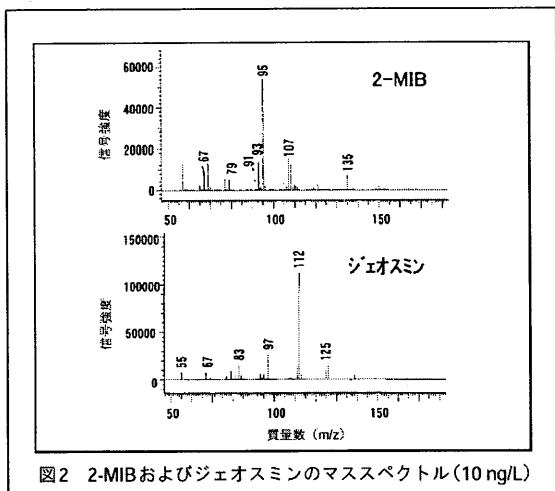


図2 2-MIBおよびジェオスミンのマススペクトル(10 ng/L)

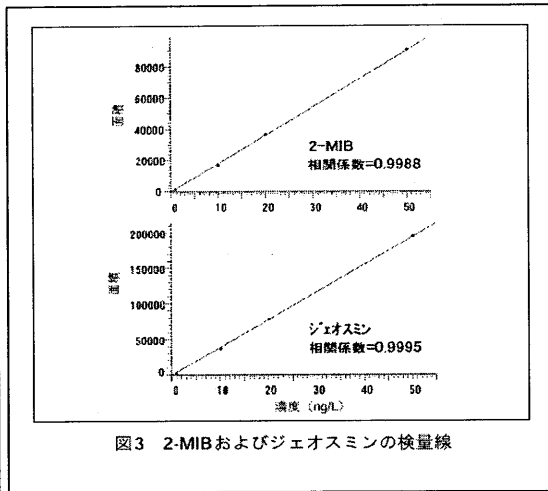


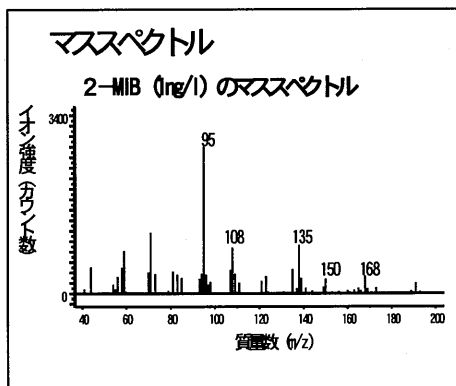
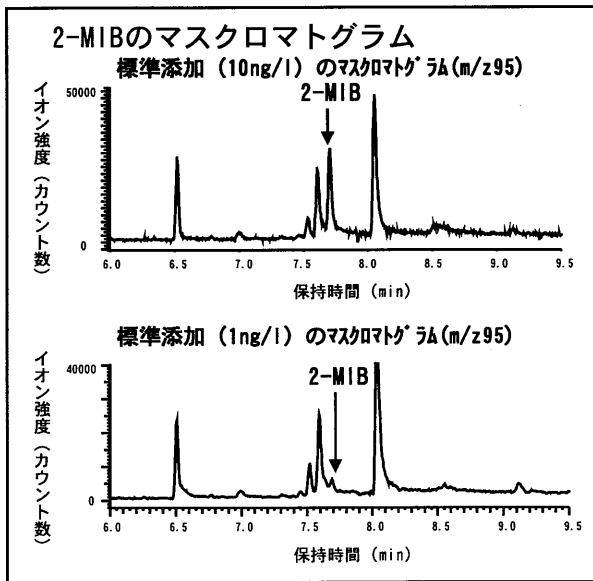
図3 2-MIBおよびジェオスミンの検量線

図2 にマススペクトル例を示します。

(3)検量線

かび臭2 成分、各0 ~100 ng/L の検量線を図3 に示します。相関係数は、2- MIB 0.9988 、ジェオスミン0.9995 と、いずれの成分も良好な直線性を示しました。

【参考データ】 P&Tを用いたかび臭分析例



**自動化 SPME (固相マイクロ抽出) と P-FPD 検出器
によるビール中の揮発性硫黄化合物の検出
— G-7000 形 GC+AI-7100 形 SPME オートインジェクター**

特長

○SPME (固相マイクロ抽出) と P-FPD を組み合わせることにより、ビール中の揮発性硫黄化合物を効率よく抽出し微妙な香りの違いを検出

測定条件

Instruments:	G-7000 形 GC, AI-7100 形 SPME オートインジェクター
Column:	30 m x 0.25 mm coated with 0.50- μ m Supelcowax 10 TM , 50°C(1 min)- 5°C/min-200°C(8 min.),キャリアガス: He, 41 cm/s at 60°C.
Injector:	UCI (isothermal splitless mode) with SPME insert, 220°C リリースプログラム: closet 0.01 minutes, open: 2 minutes.
P-FPD:	Sulfur mode, temperature 200°C.
SPME Conditions:	75 μ m Carboxen-PDMS fiber ヘッドスペース-サンプリング 2-mL バイアル中に 0.8 mL, 15 min 吸着, 3 min 脱着, 1 サンプルバイアル

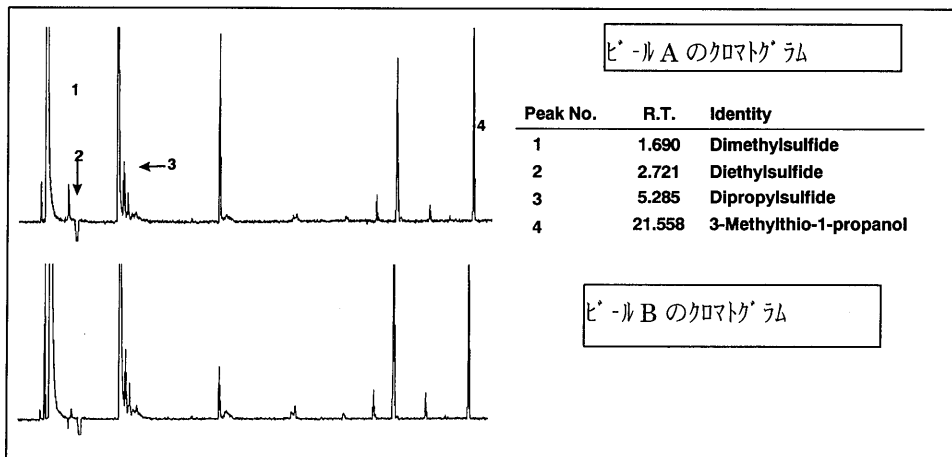


図 1 2 種類のビール試料中の硫黄化合物のクロマトグラム

アジテーション(攪拌)機能付き自動 SPME (固相マイクロ抽出) による水中のフェノール類の検出 —G-7000 形 GC+AI-7100 形 SPME インジェクター—

特長

- 自動化された SPME により低 ppb レベルのフェノール類も再現性良く検出されます。
- アジテーション機能により低揮発性フェノール類をより高感度に検出できます。

測定条件

Instruments:	G-7000 形 GC , UCI split/splitless injector, FID, AI-7100SPME Autoinjector
Column:	30 m x 0.25 mm 0.25- μ m DB-5 TM , 40°C(4 min)-12°C/min-260°C(1.67 min) キャリガス: He, 37 cm/s at 60°C.
Injector:	UCI (SPME insert) 280°C, Splitless mode: スプリットリ-: close 0.01 min. , open 3 min. splitter: 94 mL/minute.
Detector:	FID, 300°C
AI-7000 SPME Injector:	Fibers (Supelco, Inc.) 85- μ m polyacrylate 吸着時間: 5-60 min, 脱着時間: 3 min, 2.0 mL vial 中 1mL 試料.
Sample:	17°ピ°ル中 18 種フェノール (各 2 mg/mL), HPLC grade H ₂ O で希釈 10, 50, 100, 200ppb. pH 2 に調製 (HCl, 飽和 Na ₂ SO ₄ .)

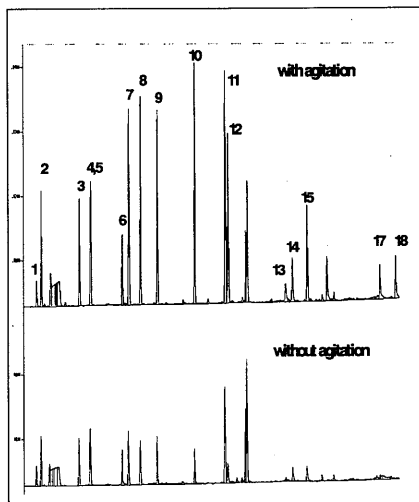


図 1 フェノール 50ppb 混合溶液の
クロマトグラム
上 ; アジテーションあり
下 ; アジテーションなし

ピ°ク 13~18 の難揮発性フェノールにアジテーションの効果が顕著に見られました。

表 1 検出限界(S/N=4)と面積値の R.S.D.(100ppb)
(SPME サンプルング とファイバ-のアジテーションによる水中
のフェノールの分析結果)

Compound	mdq (ppb)	%rsd n=6
1 phenol	1.40	1.52
2 2-chlorophenol	0.32	2.69
3 2-methylphenol,	0.34	2.16
4 3-methylphenol,	0.62	2.32
5 4-methylphenol		
6 2-nitrophenol	0.56	5.26
7 2,4-dimethylphenol	0.20	3.61
8 2,4-dichlorophenol	0.17	6.11
9 2,6-dichlorophenol	0.19	5.38
10 4-chloro-3-methylphenol	0.15	6.17
11 2,4,5-trichlorophenol	0.21	5.55
12 2,4,6-trichlorophenol	0.20	6.80
13 2,4-dinitrophenol	1.28	4.88
14 4-nitrophenol	1.15	4.42
15 2,3,4,6-tetrachlorophenol	0.35	7.66
16 2-methyl-4,6-dinitrophenol	0.49	2.67
17 pentachlorophenol	0.95	10.02
18 dinoseb	0.65	8.01

自動化 SPME (固相マイクロ抽出) による VOC の迅速分析 -G-7000 形 GC+AI-7100 形 SPME インジェクター-

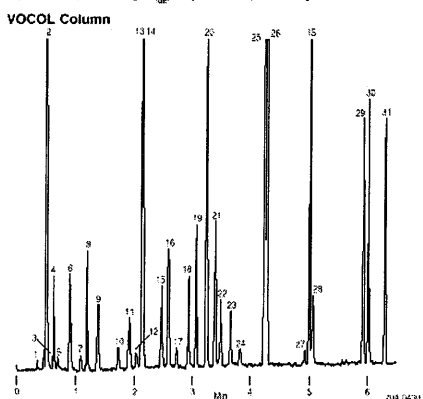
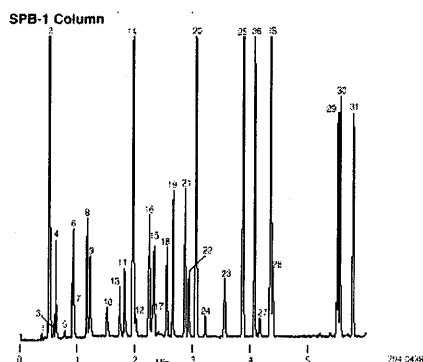
特長

- 有機溶媒を使用しないので安全でかつ簡単です。
- 液体試料またはヘッドスペース中の揮発性化合物を迅速に測定します。

測定条件

SPME	100 μ m PDMS phase fiber immersed in 1.8mL saturated salt water (5 min, rapid stirring)
Columns	10m x 0.20mm ID, 1.2 μ m film (SPB-1), (VOCOL)
Oven Temp.	40°C (0.75 min) to 160°C at 20°C/min
Carrier	helium, 40cm/sec (set at 40°C)
Det.:	FID, 260°C
Inj.:	230°C, splitless (closed 3 min)

表 1 US EPA Method 624 揮発性化合物のレスポンスファクターの直線性



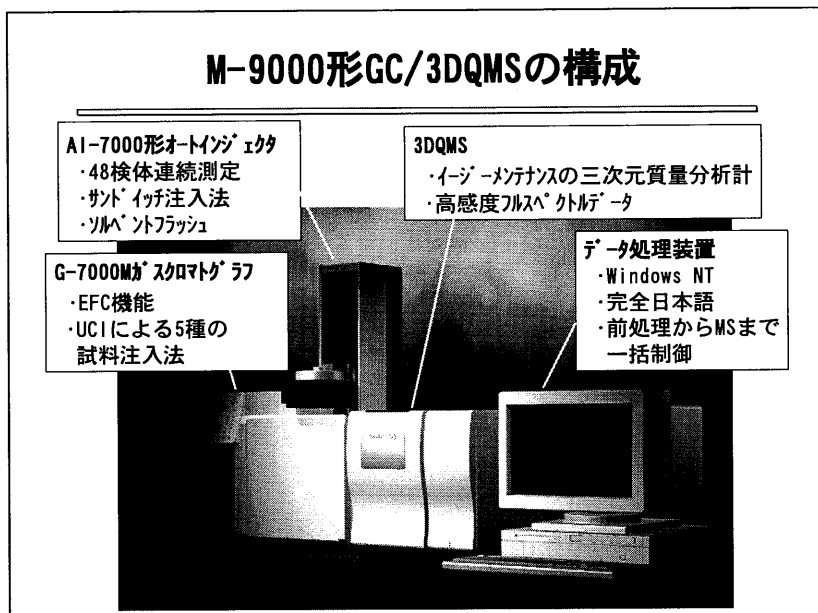
No. Compound	Column [▲]	Response Factors	
		Mean	% RSD
1. Chloromethane	SPB-1	0.022	17.0
2. Vinyl chloride	SPB-1	0.663	23.0
3. Bromomethane	SPB-1	0.025	11.4
4. Chloroethane	SPB-1	0.229	14.7
5. Trichlorofluoromethane	SPB-1	0.022	8.3
6. 1,1-Dichloroethene	VOCOL	0.341	13.3
7. Methylene chloride	VOCOL	0.040	14.7
8. trans-1,2-Dichloroethene	VOCOL	0.354	15.3
9. 1,1-Dichloroethane	VOCOL	0.272	9.1
10. Chloroform	VOCOL	0.106	12.1
11. 1,1,1-Trichloroethane	SPB-1	0.374	5.1
12. Carbon tetrachloride	VOCOL	0.080	11.9
13. 1,2-Dichloroethane	SPB-1	0.183	7.8
14. Benzene	SPB-1	1.951	5.1
15. Trichloroethene	VOCOL	0.336	3.9
16. 1,2-Dichloropropane	VOCOL	0.529	3.4
17. Bromodichloromethane	VOCOL	0.072	9.9
18. 2-Chloroethylvinyl ether	VOCOL	0.324	6.0
19. cis-1,3-Dichloropropene	VOCOL	0.551	3.6
20. Toluene	VOCOL	2.091	5.2
21. trans-1,3-Dichloropropene	VOCOL	0.501	4.3
22. 1,1,2-Trichloroethane	VOCOL	0.247	3.4
23. Tetrachloroethene	VOCOL	0.251	13.0
24. Dibromochloromethane	VOCOL	0.060	6.1
25. Chlorobenzene	SPB-1	1.543	6.5
26. Ethylbenzene	SPB-1	1.892	14.0
27. Bromoform	SPB-1	0.086	6.4
IS 1,4-Dichlorobutane (int. std.)			
28. 1,1,2,2-Tetrachloroethane	VOCOL	0.274	4.9
29. 1,3-Dichlorobenzene	VOCOL	1.021	16.9
30. 1,4-Dichlorobenzene	VOCOL	1.078	16.3
31. 1,2-Dichlorobenzene	VOCOL	1.032	17.4

[▲]Column used to quantify the analyte

Sample: US EPA 624 VOCs in 1.8mL saturated salt water
 (2mL vial) 25ppb-1ppm, 7 concentration points
 Fiber Type: 100 μ m polydimethylsiloxane (PDMS)
 Extraction: direct immersion of fiber in sample (5 min, rapid stirring)

図 1 SPME/Dual Column GC を使った
 VOC 測定(50ppb)

【M-9000 形 GC/MS の概観】



【参考文献】

(1) 日立テクニカルデータ、MS.85

「固相マイクロ抽出-GC/MS法によるかび臭物質の分析」

(2) 日立 G-7000 形ガスクロマトグラフデータ集(第1集)

(3) 日立 M-9000 形 GC/MS によるかび集分析データシート

(4) SPME ガイド(第2版)；シグマアルドリッチジャパン(株)スバルコ事業部

室内環境における 建材からの発生ガス測定手法の紹介

ジーエルサイエンス株式会社

室内大気プロジェクト

URL:<http://www.gls.co.jp>



建材からの発生ガス測定について

室内空気汚染源の一つである建材から発生するガスを正確に測定することは室内空気汚染のメカニズムを解明するために重要なポイントである。

建材からの化学物質放散量を測定することにより、室内空気中の濃度の推定、建材のラベリング化等が可能になってくる。このことは、最終的に室内中化学物質汚染の低減に反映されてくる。

海外ではデンマーク、ノルウェーで建材のラベリング化が行われている。国内ではJISおよびJASでデシケーター法によるホルムアルデヒド放散量の測定とラベリングが規格化されているが、厚生労働省で指針値が示された物質については、ホルムアルデヒド、VOC、TVOCに関して放散試験チャンバー法のJIS化が検討されているところである。



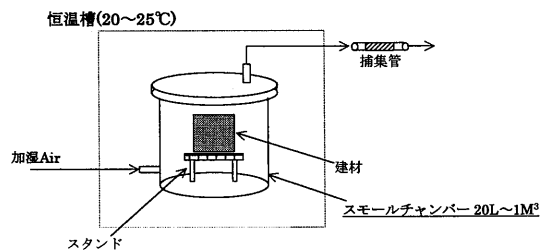
建材からの発生ガス測定手法について

- エンジニアリング法(室内環境条件下試験)
- スクリーニング法(加速試験)
- 現場測定法

GL Sciences Inc.

エンジニアリング法(室内環境条件下試験)

- 室内空気環境を考慮した条件下での発生ガス試験法。室内空間での放散シュミレーション、濃度推定などに用いられる。 → 放散試験チャンバー法
- 主にスモールチャンバー(20L~1M³)を使用。



GL Sciences Inc.

建材からの発生ガス測定に関するJIS化の動向

- 放散試験チャンバー法による建材から放散される揮発性有機化合物（VOC）およびアルデヒド類の測定。
- 2002年3月末JIS化を目標



放散試験チャンバー法における対象と測定成分

◆対象

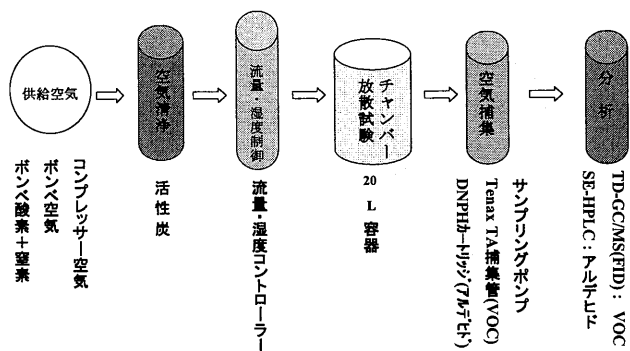
- ・合板、木質繊維板
- ・畳
- ・断熱材
- ・カーテン
- ・カーペット
- ・壁紙
- ・木製建具
- ・木製家具
- ・接着剤
- ・塗料

◆測定物質

- ・ホルムアルデヒド
- ・トルエン
- ・キシレン
- ・パラジクロロベンゼン
- ・トータルVOC

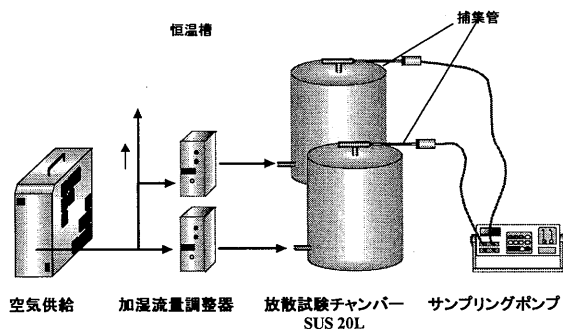


放散試験チャンバー法測定フロー



GL Sciences Inc.

放散試験チャンバーシステム例



GL Sciences Inc.

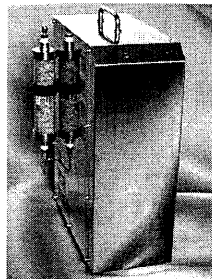
清浄空気供給ユニット (放散試験チャンバー法)

NEW!

エンジニアリング法においては、長期間の清浄空気の供給が必要で、ポンペを使用するとランニングコストが問題となります。エンジニアリング法においては清浄空気供給ユニットが必需品です。

特長

- 清浄空気供給(1L/min)の実現!
- コンパクトボディで大容量!
- ポンペからの供給に比べランニングコストの大幅な低減!
- ポータブルタイプ
- 触媒法による有機物除去システム採用

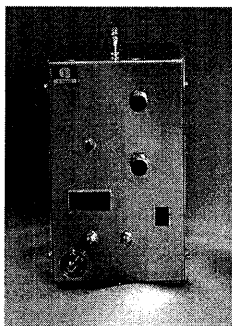


※商品デザインは予告なく変更する場合がございますのでご了承ください。

 GL Sciences Inc.

加湿エア—流量調整器 (放散試験チャンバー法)

NEW!



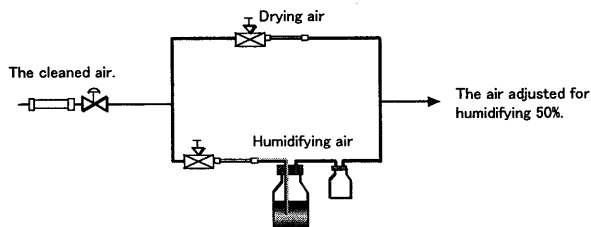
- 正確な流量と湿度制御が可能。
- 瞬時流量および流量積算値が一目で判るデジタル表示採用。
- コンパクト設計(ポータブル対応)
150(w) x 240(D) x 290(H) (mm)
→ 恒温槽内に入れて使用することが可能。
- 有機物除去フィルター採用

 GL Sciences Inc.

加湿エアーク流量調整器について

(放散試験チャンバー法)

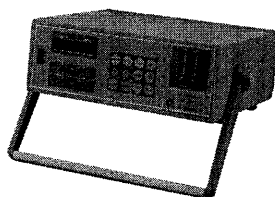
- 換気回数を求める為の積算値表示が可能。
- 恒温槽内への設置が必要。
→ 温度湿度を制御を正確に行う為、流量調整システムをチャンパーと同一恒温槽に入れる必要がある。
- 現場における放散量の測定に使用
→ ポータブル性が必要



GL Sciences Inc.

サンプリングポンプ SP208-1000Dual

(放散試験チャンパー法)



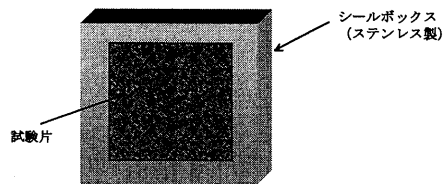
- サーマルマスフロー制御による安定した吸引流量
- 積算停止機能, ファイル機能, ログ機能による操作性の向上
- 設定時間スタート機能
- 2流路機能による複数チャンパー測定およびVOC, ホルムアルデヒド放散ガスの同時サンプリングが可能

GL Sciences Inc.

放散試験チャンバー法による建材表面の測定

◆ シールボックスの使用

シールボックスで裏面および切断面を覆ってしまうことにより建材表面のみからの発生ガスの測定を行う。



壁装材料協会
放散試験チャンバー法参照

 GL Sciences Inc.

放散試験チャンバー法試験条件 〈20Lチャンバー例〉

- チャンバー : 容量 20L
- 試料負荷率 : $2.2\text{m}^2/\text{m}^3$
- 温度 : $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- 相対湿度 : $50 \pm 4\%$
- 換気回数 : 0.5回/h
- 捕集間隔 : 試験開始後24hr, 72hr, $14 \pm 1\text{day}$, $28 \pm 2\text{day}$
(追加捕集も可能)

 GL Sciences Inc.

放散試験チャンバー法 サンプリング条件および分析方法

■ ホルムアルデヒド

捕集管	: DNPHカートリッジ
捕集流量	: 0.167 L/min
吸引量	: 10 L
分析方法	: 溶媒抽出-HPLC

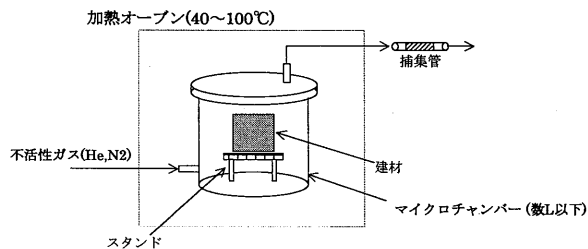
■ VOC

捕集管	: Tenax TA
捕集流量	: 0.100 L/min
吸引量	: 3.2 L
分析方法	: 加熱脱着-GC/MS(FID)

 GL Sciences Inc.

スクリーニング法(加速試験)

- 建材を加熱して加速的に発生ガスの測定を行う試験法。建材間の発生ガス放散速度の比較, 選定に用いられる。
- 容量数L以下のマイクロチャンバーの使用が可能。



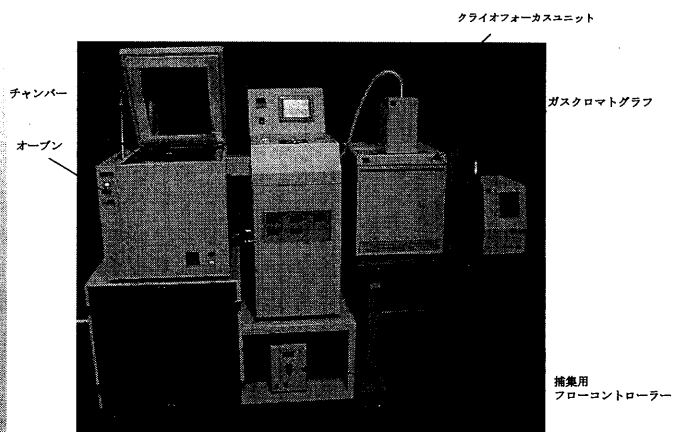
 GL Sciences Inc.

スクリーニング法の特長

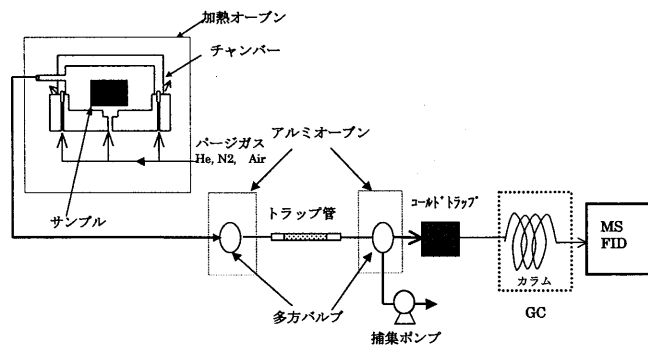
- 小型チャンバーより小さなマイクロチャンバーを使用することが可能。
- 短時間での測定(数時間)が可能。
- 測定後、チャンバーの洗浄(200°C以上の加熱)が容易に行える。
- 有機リン化合物、フタル酸エステルなどのSVOCの測定が可能。
- 放散試験チャンバー法を行う前の予備実験として有効。
- 建材間の発生ガス放散速度を比較する測定法として有効な手法。

 GL Sciences Inc.

建材発生ガススクリーニング試験装置 MSTD-258(オンラインシステム)



MSTD-258 フロー図



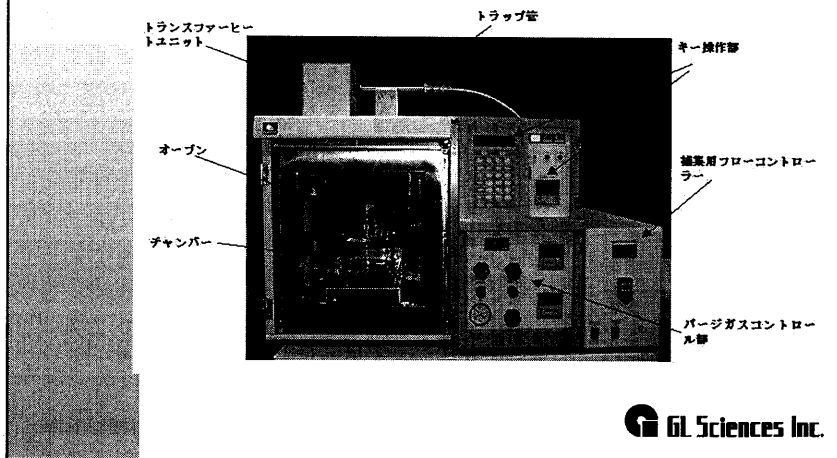
GL Sciences Inc.

MSTD-258 特長

- チャンバー内に収まるサンプルであればどのような形状のサンプルでも測定が可能。
- サンプルラインには、有機物の吸着や分解が起こりにくい石英コーティングされたラインを使用。
- 発生ガスの捕集からガスクロマトグラフまでの導入をオンラインで行うシステムのため、再現性の良いデータを簡単に得ることが可能。
- 加熱オープンは空気恒温槽を使用しているため、精度の良い温度雰囲気での測定が可能。

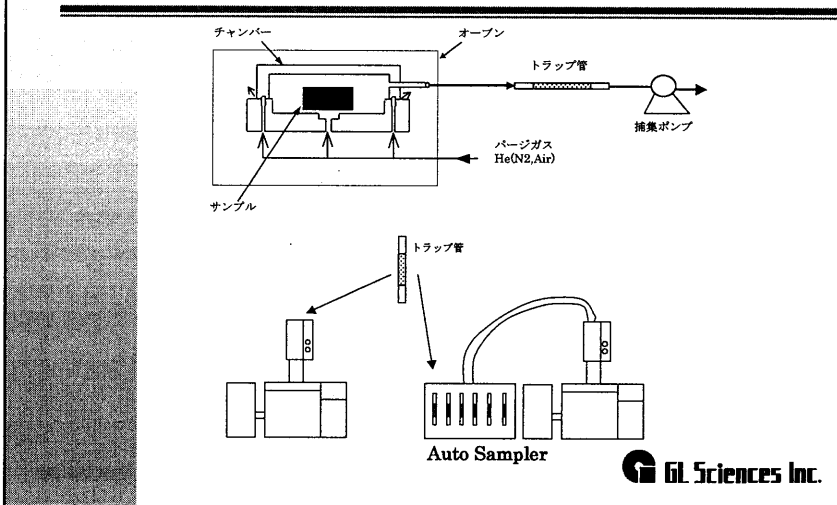
GL Sciences Inc.

建材発生ガススクリーニング試験装置 MSTD-258M(オフラインシステム)



GL Sciences Inc.

MSTD-258M フロー図および操作説明

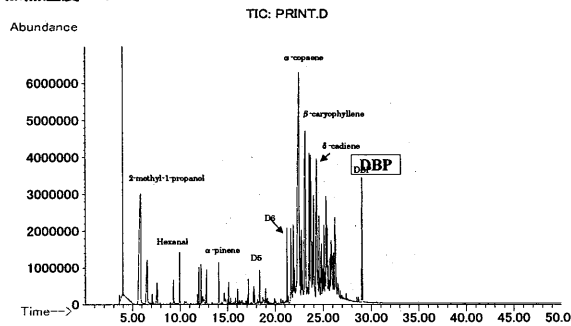


GL Sciences Inc.

スクリーニング法による発生ガス測定例

プリント合板(Brown)

加熱温度: 40°C



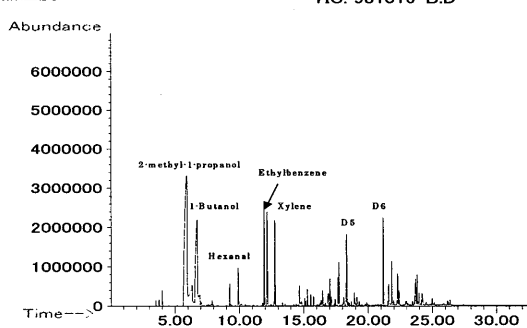
室内化学物質空気汚染調査研究委員会(LAPOC)委員
お茶の水女子大学 生活科学部 久保田 先生提供

GL Sciences Inc.

スクリーニング法による発生ガス測定例

プリント合板(White)

加熱温度: 40°C



室内化学物質空気汚染調査研究委員会(LAPOC)委員
お茶の水女子大学 生活科学部 久保田 先生提供

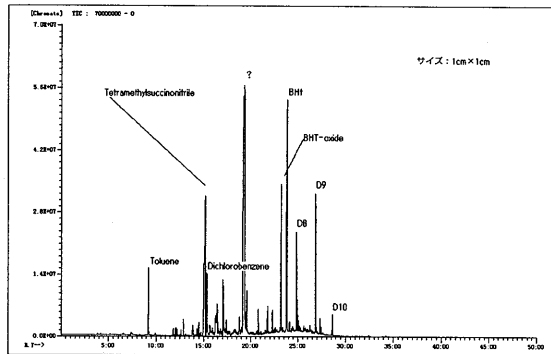
GL Sciences Inc.

スクリーニング法による発生ガス測定例

(自動車内装材料)

シート(表皮+スポンジ)

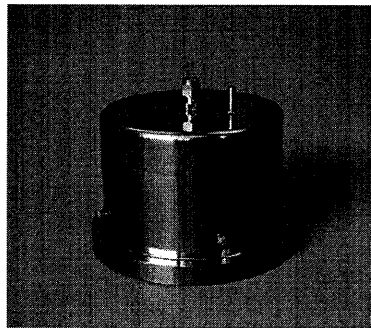
加熱温度: 60°C



GL Sciences Inc.

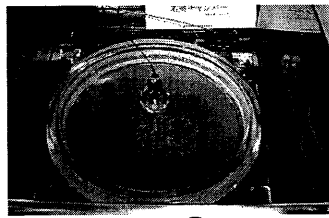
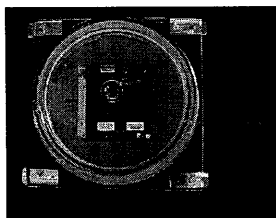
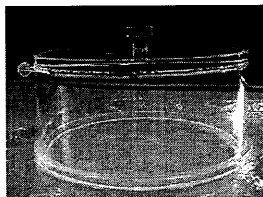
スクリーニング法チャンバー例

(二重管式チャンバー)



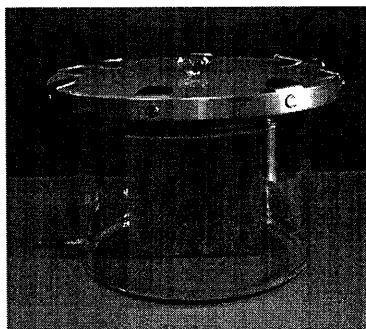
GL Sciences Inc.

スクリーニング法チャンバー例 (部材用石英チャンバー)



 GL Sciences Inc.

スクリーニング法チャンバー例 (デシケーター方式チャンバー)



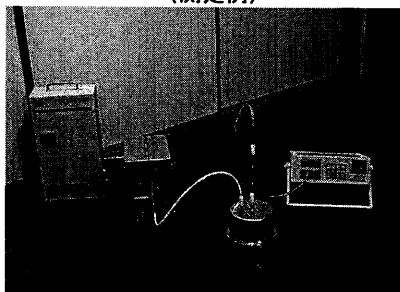
パイレックス製チャンバー

 GL Sciences Inc.

現場測定法

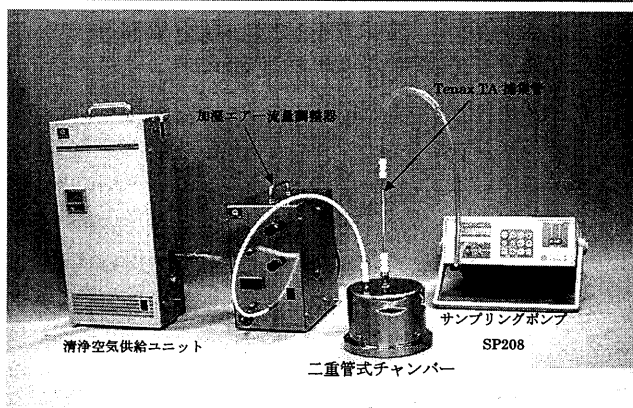
住宅施工後の建材からの部位別発生ガス測定を行う場合に用いられる。専用のチャンバーが必要。

〈測定例〉



 GL Sciences Inc.

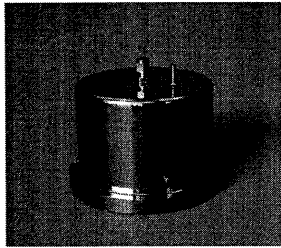
建材表面部位別サンプリングシステム (現場測定用)



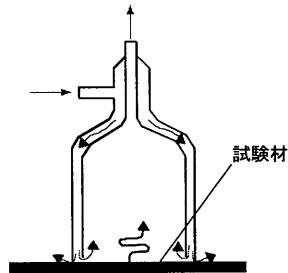
 GL Sciences Inc.

建材等の表面測定用チャンバー

◆実用型二重管式チャンバー(試作)



内筒部と外筒部の組合せ後



二重管式チャンバー構造図

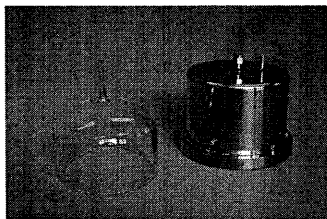
東京工業大学 藤井先生考案

2重管式チャンバー

 GL Sciences Inc.

二重管式チャンバーの特長

現場測定、部材管理測定、品質管理測定など全てのフィールドでの放散ガスが測定が可能。

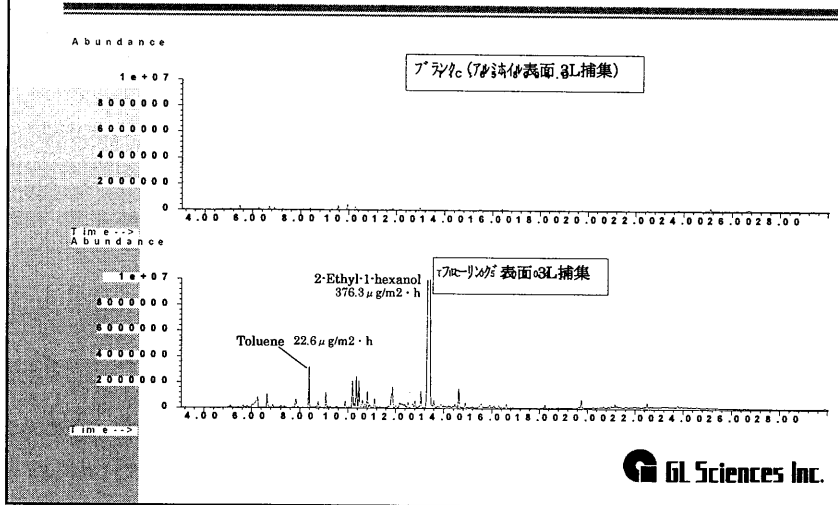


内筒部(パイレックス製)および外筒部(ステンレス製)

- 放散ガス接触面の内筒部に不活性なパイレックスを採用
- シールボックスが不要
- 部材表面ガスのみ採取可能
- 材料を損わずに測定が可能
- 洗浄が容易
- 内筒部の交換が可能

 GL Sciences Inc.

フローリングからの発生ガス測定結果



建材からの発生ガス測定手法の比較

	エンジニアリング法	スクリーニング法	現場測定法
目的	放散シミュレーション	材料選定	住宅施工後の建材部位別放散量の測定・評価
特長	実際の室内空気環境下での放散量が特定できる。	簡便に材料発生ガス測定と材料選定が行える。	施工後住宅の内装材表面からの放散量評価が行える。
測定期間	1~12ヶ月	1~2時間	サンプリング時間: 30分~1時間
チャンバー	スモールチャンバー (20L以上)	マイクロチャンバー (数L以下)	二重管式チャンバー
チャンバー材質	SUSが主流	パイレックス、石英など	外側: SUS、内面: パイレックス
操作性	熟練を要す	容易	経験が必要
ブランク対策 (チャンバーの洗浄)	難	容易	容易
条件	25℃、50%	加熱加速試験	室内環境
供給ガス	Air, 窒素	不活性ガス(He, N2)	Air
SVOCの測定	不可 (チャンバー内壁に吸着)	可 (チャンバー材質の選定が必要)	濃度が高い場合は可 (チャンバー内壁に吸着)

GL Sciences Inc.

室内空気汚染物質の測定 固相吸着－加熱脱着－GC/MS法（チューブ法）

パーキンエルマー・ジャパン 応用研究部

1. はじめに

シックハウス問題、化学物質過敏症など室内に存在する揮発性有機化合物（VOCs）による人体への影響が懸念されていることから、関係機関の動きが活発化している。厚生労働省は、「シックハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会」から、現在対象とするホルムアルデヒド、トルエンなど12成分を指針値とともに示している。また、汚染原因物質の発生源である建築材料からの放散成分の測定が、国土交通省の「住宅の品質確保促進等に関する法律」の施行（2001年4月1日）により実施される。更には、経済産業省でのJIS農林水産省でのJAS化などが進行している。厚生労働省から示されたVOCs測定法のマニュアル^{1) 2)}では、サンプリング方法および分析法の組み合わせから、固相吸着－溶媒抽出－GC/MS法（溶媒抽出法）、固相吸着－加熱脱着－GC/MS法（チューブ法）および容器採取－GC/MS法（キャニスター法）が測定法として挙げられている。このうちチューブ法は、サンプリングが簡単で、沸点範囲の広い成分に適應できることから、最も有力な分析法と言える。特に、液体窒素を使用しないパーキンエルマーの熱脱着－GC/MSシステムは、環境大気中の有害揮発性物質、排出ガス、土壌汚染物質、作業環境・有機溶剤などの分析^{3) 4)}に多くの実績を持ち、室内空気汚染物質の分析にも多くの報告^{5) 14)}がされている。なお、クロロピリホスなど化学的に活性で指針値の低い成分の分析には、溶媒抽出法が有効である。ここでは、現在指針値の示されたトルエンなどのVOCおよび難揮発性成分のフタル酸エステルの一斉分析を目的とした測定法を紹介する。また、将来追加される可能性のある、極性の低沸点成分（アルコール、ケトンなど）あるいは有害性の高い塩素系溶剤などを含む測定例を紹介する。

2. 対象成分と指針値

新築住宅および居住住宅内空気について、すでに指針値の示された物質¹⁾を表1に示す。また、将来追加されるであろう物質あるいは総揮発性物質（TVOC）の対象に挙げられている物質のリストを表2に示す。アルコールなど低沸点の極性成分からDEHPなどの高沸点成分までと沸点範囲が広いことと、他の環境分析に比べ、比較的高濃度であることは、分析法を確立する上

表1

成分	指針値	
	μg/m ³	ppm
トルエン	260	0.07
エチルベンゼン	3800	0.88
o,m,p-キシレン	870	0.2
スチレン	225	0.05
p-ジクロロベンゼン	240	0.04
クロロピリホス	1	0.07
フタル酸ジ-n-ブチル	220	0.02
テトラデカン	330	0.04
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	120	0.0076
ダイアジノン	0.29	0.00002
TVOC*	400	
ホルムアルデヒド**	100	0.08

*暫定目標値

**液体クロマトグラフで分析

で重要なポイントとなる。

表2 総揮発性有機化合物(TVOC)対象成分

芳香族炭化水素	トルエン、エチルベンゼン、キシレン、スチレンなど
脂肪族炭化水素	ノナン、デカン、トリデカン、テトラデカン など
オキシ化炭化水素	1-ブタノール、ノナナール、メチルエチルケトンなど
ハロゲン化炭化水素	トリクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタンなど
その他	酢酸エチル、酢酸ブチルなど

3. 試料採取と分析装置

3. 1 試料採取

試料採取は、CarbopackB/Carboxen1000、TenaxTAなどの吸着剤が充填された捕集チューブに、定流量ポンプを用いて、試料ガスの一定量を現場で濃縮・捕集する。その模式図(図1)と実際に使用するポンプの一例を図2に示す。チューブには、それぞれ固有の番号が記してある。

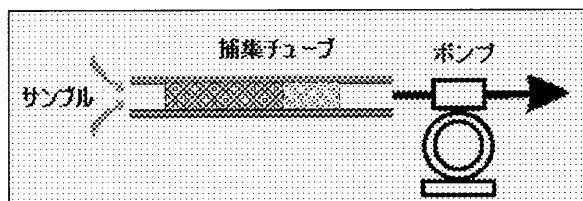


図1 サンプルング模式図

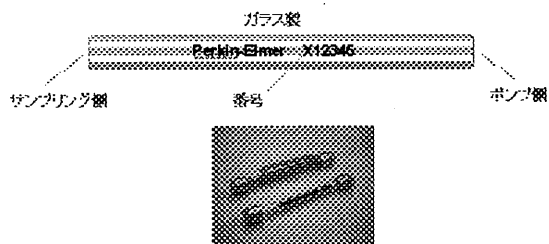


図2 サンプルング(チューブ、ポンプ)例

(1) 室内空気の採取

対象空気(新築住宅と居住住宅)の採取目的と条件を表3に示す。すなわち居間、寝室および外気の3箇所を2本ずつサンプルングし、その行程で持ち運んだチューブ(トラベルブランク)の合計7本を分析の対象とする。指針値濃度、分析計の定量範囲およびポンプ能力から、採取量を調整する。

表3 分析目的と採取条件

	新築住宅	居住住宅
目的	揮発性有機化合物の最大濃度を推定する	居住、平常の生活条件下における揮発性有機化合物の存在量や暴露量を推定する
採取場所	居間、寝室、外気	居間、寝室、外気
採取条件	二重平行採取 30分換気後、5時間以上密閉し、その後30分間を採取 日変動で最大となる2時～3時	二重平行採取 24時間採取
採取量	1.5～3L(50～100mL/分)程度	10～20L(6.9～13.9mL/分)程度

(2) 試料採取の要点

試料採取に当たっての要点は、捕集剤の選択と破過容量の確認、捕集剤のプランク量の確認、サンプリング量の正確さなどである。

① 捕集剤の選択と破過容量

破過容量は成分が捕集剤内を通過するのに要したキャリアー空気量のこと、捕集剤の吸着能力を示す。したがってサンプリング量は破過容量以下にとどめなければならない。同時に水など多量に存在する分析対象外の成分は、サンプリング中にチューブからできる限り多く除去（破過）することが望ましく、サンプリング条件の重要なポイントとなる。室内汚染分析に使用される捕集剤に対する各種成分のGC法で求めた破過容量を表4に示します。室内空気汚染分析によく用いられてきた⁶⁾ Tenax TAでは極性の低沸点成分は破過容量が少なく、サンプリング量に限界があることがわかる。つまり吸着剤は、目的成分の破過容量および分析計の検出感度などを考慮して選択することとなる。低沸点極性成分を含む分析には、Air Toxicsが有効で多くの実測例⁶⁾がある。なお、破過容量は、サンプリング温度により変わり、高温ほど小さくなる。したがって、サンプリング時のチューブに直射日光が当たらないよう注意しなければならない。また、高湿度でのサンプリングでは、水分の影響を受け測定成分が破過しやすくなる⁷⁾。無極性の成分を対象とした高湿度試料には、乾燥剤の使用が有効で、回収率に影響が少ない。一方、極性成分は水分を吸収した乾燥剤に吸着され、回収率が低下する。湿度に応じて加熱前のドライパージ時間を変えることで良好な結果を得ることが出来る。

表4 捕集剤と破過容量

	Tenax TA (200mg)	TenaxTA/C-1000 (100/70mg)	Air Toxics (160/70mg)
水			0.02
エタノール	0.18	19	30
塩化メチレン	0.3	95	40
アセトン	0.54	220	20
酢酸メチル	6.4	450	40
ヘキサン	3.2	500000	
ペンゼン	6.2	400000	50

② ブランク対策

捕集剤は管理が不十分であると吸着作用により汚染される。汚染された捕集剤（新しい捕集剤を含む）は、分析値に対して無視できる量より低くなるまでコンディショニング（エージング）した後、金属製キャップで汚染防止する。また、サンプリング時以外は、金属製キャップをしておくことが実務上重要なポイントである。その他、吸着剤がチューブ内に均一に充填されていなかったり、空隙があるとチャンネリング現象を招く恐れがあるので、充填状態をチェックしておく必要がある。

③ サンプリング量

サンプリング量は流速と時間の積となるが、精度の高い定流量ポンプが必要である。マニュアルでは、積算流量計をポンプの下流につけサンプリング量としている。

④ 採取条件の記録

サンプリングに際しては採取場所、採集量などと共に、個別に記されたチューブ番号などの採取条件を記録する。また、サンプリングの工程で持ち歩いたチューブをトラベルブランクとする。

4. 2 分析

4.2.1 分析装置

採取した試料チューブは、図3の加熱脱着-GC/MSシステム TurboMatrixATD-TurboMassにより自動分析する。

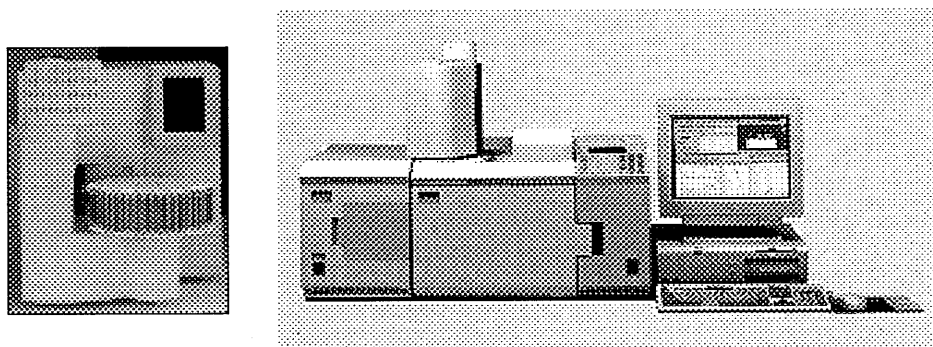


図3 加熱脱着-GC/MSシステム TurboMatrixATD-TurboMass

4.2.2 加熱脱着の原理

加熱脱着の原理図を図4に示す。TurboMatrixATDは2段階の熱脱着を行う。まず、濃縮・捕集したサンプルチューブと、吸着剤の充填されたトラップチューブをシリ

ーズに接続してキャリアーが流れる。つづいてサンプルチューブを加熱（1次脱着）する。このとき、トラップチューブをあらかじめ冷却しておくことにより、サンプルチューブより脱着した揮発成分は、トラップチューブに再濃縮される。目的成分がサンプルチューブからトラップチューブに移行した時点で、トラップチューブ分析カラムラインに流路を切り替える。引き続き、トラップチューブを加熱（2次脱着）することにより、目的成分は再脱着され分析カラムに導入される。

TurboMatrixA TDでは、これらのプロセスを自動で行うと共に、リークチェック、残存酸素、水、炭酸ガスなど分析対象としない不要の成分あるいは妨害となる成分を除去するプロセスが標準装備されている。また、サンプルチューブとトラップチューブの間に設けられたインレットスプリットおよびトラップチューブと分析カラムの間に設けられたアウトレットスプリット機構により広い濃度範囲に対応可能である。

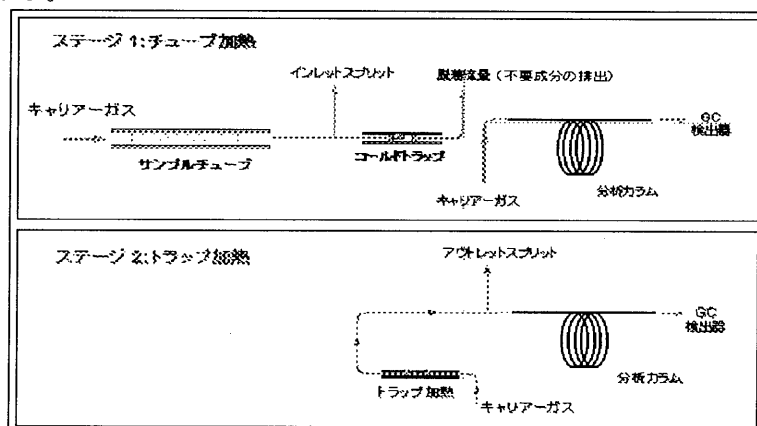


図4 加熱脱着の原理図

4.2.3 分析条件

最適化された加熱脱着条件およびGC-MS条件の一例を表5に示す。

また実装置での設定はタッチパネル式ディスプレイ上で行う。その一例を図5に示す。温度、時間などのパラメーターを入力するとともに状態(コンディション)の確認が可能である。

表4 分析条件	
TurboMatrixA TD	
捕集チューブの条件	
吸着剤	: Air Toxics
脱着温度	: 300°C
脱着流量	: 30mL/分
脱着時間	: 10分
入口スプリット	: 30mL/分
トラップチューブの条件	
吸着剤	: Air Monitoring
トラップ温度	: 20°C
脱着温度	: 320°C
脱着時間	: 10分
出口スプリット	: 20mL/分
TurboMass	
カラム	: 5%PhenylMethylPolysiloxane : 0.25mmx 60m x 0.25um
温度	: 40°C(4分)-(10°C/分)-130-(20°C/分)-320°C
キャリアーガス	: 15psi
モード	: SCAN-SIM
マスレンジ	: 25-400amu

4.2.4 試料の調製

① 標準試料

標準試料調製の模式図を図6に示す。一定流量（約30mL/分）でコントロールされた清浄なガスをサンプリングチューブに接続する。つづいて、マイクロシリンジで標準液の一定量（1μL程度）を採取し、ウール部に添加することにより目的とする成分を捕集剤に吸着（1分程度）させる。標準液は、対象成分の濃度が段階的になるようメタノールで希釈・調製する。また、それぞれの標準液に内標準物質トルエン-d 8の一定量を添加する。

② 未知試料

サンプリングした試料チューブに、内標準液を上記と同様の要領で添加する。内標準液は、トルエン-d 8のみを標準液で調製したものと同濃度となるよう、メタノール液で希釈・調製する。

これらの標準、内標準は気体（ボンベ入りなど）で取り扱うことも可能である。その場合の試料採取はガスタイトシリンジを用いる。また、TurboMatrixATDには、自動で内標準ガスを添加することのできる“内標準添加装置”がオプションとして用意されている。

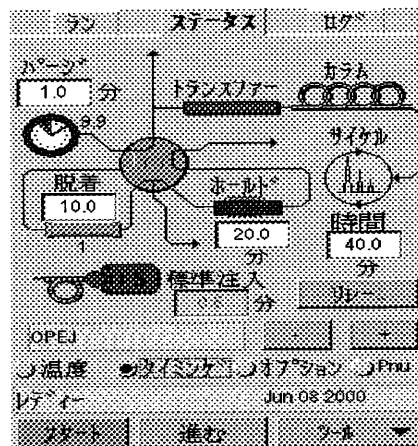


図5 ATDのディスプレイ

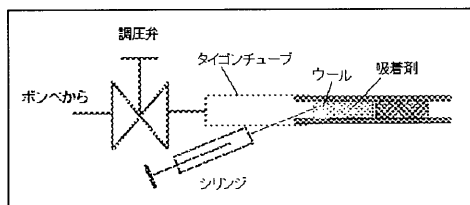


図6 標準試料の調製

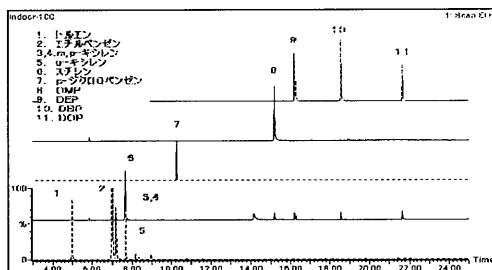


図7 標準7成分のマスキロマトグラム

4.2.5 標準試料のクロマトグラム

対象7成分の標準のクロマトグラムを図7に示す。また、そのときの2～500 ngの検量線を図8に示す。

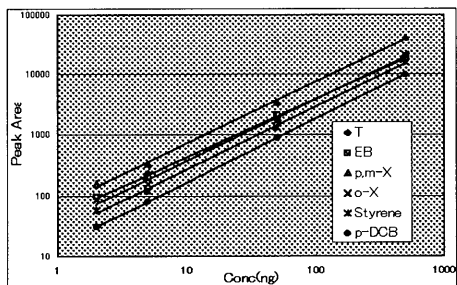
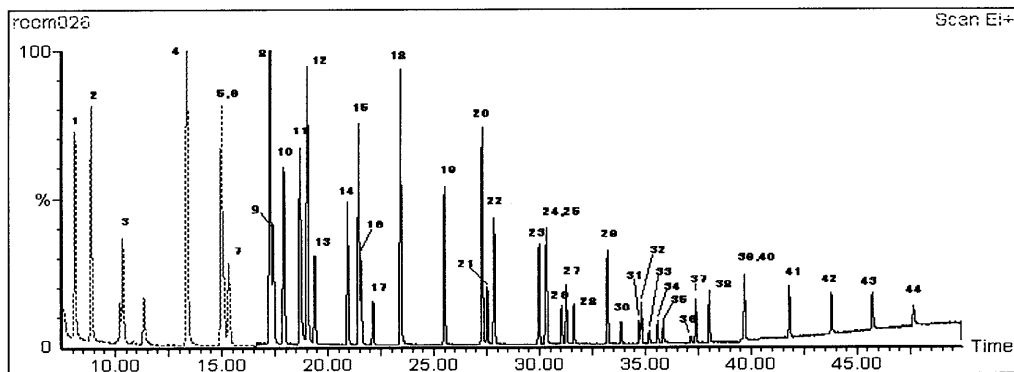


図 8 検量線



- 1..Ethanol 2.Acetone 3.Dichloromethane 4.MEK 5.Ethylacetate 6.n-Hexane 7.Chloroform
 8.1,2-Dichloroethane 9.2,4-Dimethylpentane 10.1,1,1-Trichloroethane 11.1-Butanol 12.Benzene
 13.CarbonTetrachloride 14.1,2-Dichloropropane 15.Trichloroethylene 16.2,2,4-Trimethylpentane
 17.n-Heptane 18.MIBK 19.Toluene 20.n-Butylacetate 21.n-Octane 22.Tetrachloroecihlene
 23.Ethylbenzene 24,25.p+m-Xylene 26.Styrene 27.o-Xylene 28.n-Nonane 29.a-Pinene
 30.1,3,5-TMB 31.1,2,4-TMB 32.n-Decane 33.p-Dichlorobenzene 34.1,2,3-TMB 35.D-Limonene
 36.Nonylaldehyde 37.n-Undecane 38.Durene 39.Decylaldehyde 40.n-Dodecane 41.Tridecane
 42.Tetradecane 43.Pentadecane 44.Hexadecane

図 9 VOC44 成分のトータルイオンクロマトグラム (表 4 の条件とは異なる)

低沸点の極性成分 (エタノールなど) を含む VOC 44 成分のクロマトグラム (分離条件が異なる) を図 9 に示す。

4.2.6 測定例

(1) 新築住宅

木造およびコンクリート造りの新築住宅についての実測例を図10, 11および表5に示す。

木造の新築住宅では、木材から発散する α -ピネンをはじめ、クロス張り材料に起因する溶剤などが検出された。コンクリート造りの新築住宅からは、トルエンが際立って多く、その他の芳香族、エタノール、アセトンなどの溶剤が多種検出された。

成分	表5 分析結果(1) $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	木造住宅	コンクリート造り
1 エタノール	52.6	84.4
2 アセトン	1.5	111.9
4 メチルエチルケトン	1.2	36.4
5 酢酸エチル	1.5	16.1
11 ブタノール	1.8	87.3
12 ベンゼン	0.0	15.3
18 メチルイソブチルケトン	1.6	24.2
19 トルエン	9.1	2908.0
20 酢酸ブチル	2.4	25.5
23 エチルベンゼン	19.7	220.7
24,25 キシレン	6.1	71.0
26 スチレン	5.1	0.0
27 キシレン	5.9	43.9
29 α ピネン	172.8	0.0
31 トリメチルベンゼン	0.0	292.4

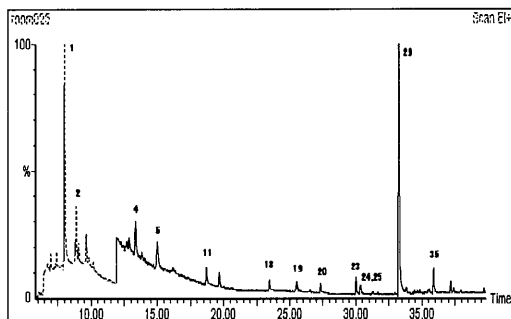


図10 新築木造住宅

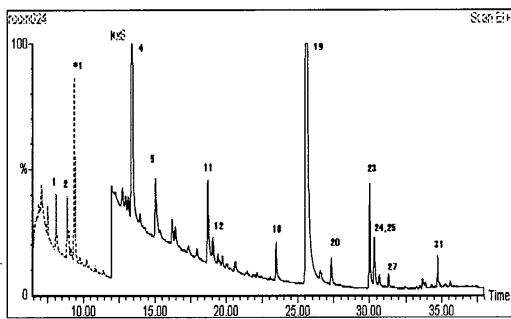


図11 新築コンクリート造り施設

(2) 居住住宅

居住住宅の分析例を図11および表6に示す。対象成分であるトルエン、キシレン、スチレン、p-ジクロロベンゼンなどを含め多種多量の溶剤が検出された。その他、注目される物質として、大気汚染防止法で取り上げられているベンゼン、ジクロロメタンなどの塩素系溶剤が、物質によっては基準値を超え検出された。

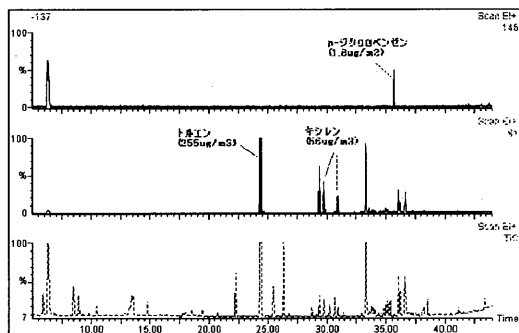


図12 居住住宅

表6 定量結果(2)

#	成分	濃度(ug/m ³)	#	成分	濃度(ug/m ³)	#	成分	濃度(ug/m ³)
2	アセトン	55.1	18	メチルイソブチルケトン	41.0	32	デカン	6.1
3	ジクロロメタン	8.6	19	トルエン	255.2	33	p-ジクロロベンゼン	1.8
4	メチルエチルケトン	38.4	20	酢酸ブチル	140.0	34	1,2,3-トリメチルベンゼン	2.5
5	酢酸エチル	37.2	21	オクタン	1.1	35	リネン	20.5
6	ヘキサン	13.7	22	テトラクロロエチレン	1.0	36	ノニルアルデヒド	7.7
7	クロロホルム	1.0	23	エチルベンゼン	69.3	37	ウンデカン	6.1
8	1,2-ジクロロエタン	0.1	24,25	p,m-キシレン	34.1	39	デシルアルデヒド	3.0
10	1,1,1-トリクロロエタン	0.7	26	スチレン	11.2	40	ドデカン	3.3
11	ブタノール	27.9	27	o-キシレン	21.9	41	トリデカン	5.8
12	ベンゼン	12.1	28	ナフテン	1.9	42	テトラデカン	8.6
13	四塩化炭素	0.6	29	αピネン	120.9	43	ペンタデカン	3.7
15	トリクロロエチレン	1.8	30	1,3,5-トリメチルベンゼン	2.1	44	ヘキサデカン	8.5
17	ヘプタン	8.0	31	1,2,4-トリメチルベンゼン	9.3			

(3) 建築材料(床材)

床材を20Lのチャンバーに入れ、清浄なガスでパージすることにより放散ガスを捕集剤に濃縮・捕集した試料の分析例を図13に示す。トルエンからDEHPまでの一斉分析が可能であることがわかる。

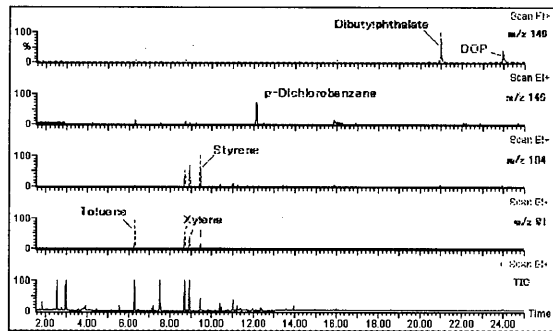


図13 床材からの放散量測定

4. 測定3法の比較

測定3法の比較を表7に示す。

(1) 溶媒抽出法

溶媒抽出法は、吸着剤の充填された捕集チューブにサンプリング後、二硫化炭素(CS₂)などの溶媒で抽出し、抽出液をGCMS分析する方法である。化学的に活性で、指針値の低いクロロピリホス分析に適応する。抽出液を濃縮後、スプリットレスモードで分析します。VOCは沸点が低いため抽出液を濃縮できないことから、サンプリング量の1/10000程度しかGCに導入できず(キャピラリーカラム分析)感度不足となる。また、低沸点成分では多量の溶媒ピークに重畳し分析できない場合がある。

(2) キャニスター法

キャニスター法は、あらかじめ容器内を洗浄し、内表面を水でコーティングした後更に真空引きした容器を現場に持込、バルブを開放し試料採取する。採取した容

器は、加熱脱着機構を備えた前処理装置とGC-MSのシステムにより分析する方法である。したがって、容器洗浄に多大な労力を要したり、フタル酸エステルなどの高沸点物あるいは極性の低沸点物などが容器内表面に吸着されることから、本分析には向かないと考えられる。

(3) チューブ法

クロロピリホス等の除く全成分の一斉分析が可能である。本稿で述べた通り、作業効率の高い最も有効な測定法である。注意点は、一度きりのサンプルであり、分析に失敗が許されないことにある。したがって、安全機構を有する分析システムが要求される。

表7 3法の比較

	チューブ法	溶媒抽出法	キャニスター法
ブランク/コンディション	エージングでOK	ブランク有り	洗浄が不可欠
再使用	可	不可	可
サンプリング量	調整できる(1~20)	調整できる(約100L)	一定量(6L)
低沸点極性成分	可	溶媒と重なる	成分により難しい (容器表面に吸着)
フタル酸エステル	可 (極微量は不可:ブランク)	可 (微量分析は困難:ブランク)	不可 (容器表面に吸着)
再分析	不可 (対策:二重採取)	可	可
コスト/労力	小(捕集管を再使用)	大(捕集管を使い捨)	大(洗浄、運搬)
2重採取/2重測定	必要	必要	必要
その他		CS2を使用	

5. おわりに

室内汚染有機物質の測定における「チューブ捕集-加熱脱着-GC/MS法(チューブ法)」の有効性を紹介した。チューブ法は、多成分の一斉分析が可能(クロロピリホス等を除く)であること、分析済みチューブがそのまま次のサンプリングに用いられるなど、最も合理的な分析方法であると言える。特に、液体窒素などの冷媒を使用しないトラップ方式(ペルチェ冷却)を採用したパーキンエルマーの加熱脱着装置 TurboMatrixATD は、ランニングコストが低く、簡単な操作で自動分析を行うことが可能となる。今後追加されると予想される成分の中には、低沸点の極性成分が含まれており、ページ(除水)機能が効力を発揮することとなる。また、本分析は、成分が比較的高濃度であることから、スプリット機能が有効に活用されることとなる。

また、室内空気中には多種多様のVOCが存在することから、本来SCANモードでデータ採取するのが一般的であるが、トルエンなど現実的に高濃度な成分から、将来追加される可能性のある塩素化合物など有害性の高い低濃度の成分の定量を一斉に行うには、分析システムとして 10^4 程度のダイナミックレンジが必要であると考えられる。このような場合、ガスクロマトグラフ質量分析計 TurboMass の

SCAN-SIM モード (FISI™) 同時検出機能を有効に活用できる。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 第1～5回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会議事次第
- 2) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 第6回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会議事次第.
- 3) 有害大気汚染物質測定の実際編集委員会編, 有害大気汚染物質測定の実際, pp142-154, 1997
- 4) 世古民雄, 大気に排出する揮発性有機物質のオンサイト分析と詳細分析, 第9回環境化学討論会講演要旨集, pp. 512-513, 2000
- 5) 徳原 賢, 渡辺征夫ほか, 室内及び室外の揮発性有機化合物の北九州市における分布の実態, 環境化学 Vol. 7, No. 4, pp. 809-819, 1997
- 6) 森 康明, 松下秀鶴ほか, Air Toxics 管-ポンプ法および CarbopackB 管-拡散法による室内空気試料の採取と加熱脱着-GC/MS システムによる揮発性有機化合物の測定, 環境化学 Vol. 7, No. 4, pp. 851-857, 1997
- 7) 田辺新一, 住宅におけるホルムアルデヒド・VOCによる室内空気汚染に関する基礎的研究, 空気調和・衛生工学学術講演会講演論文集, pp19-22, 1997
- 8) 世古民雄, 白倉浩一, 固体捕集加熱脱着-GC/MSによる室内汚染有機物の測定, 第7回環境化学討論会講演要旨集, pp. 88-89, 1998
- 9) 世古民雄, 室内空気中の VOCs の測定, 第1回室内気質計測シンポジウム, pp. 50-51, 1998
- 10) 世古民雄, 環境大気、室内空気中の VOC s 分析における GC/MS の応用, 分析化学会中部支部講演会テキスト, 1998
- 11) Tamio SEKO, Koichi USUKURA, Koshi HARAGUCHI, and Nobuhiko ONDA, Indoor Air Quality Analysis
by Reusable Tube-Sampling Combined with Thermal Desorption-Capillary GC/MS
- 12) 世古民雄, 白倉浩一, 自動車内汚染物質のチューブ捕集・加熱脱着-GC/MS法による測定, 第8回環境化学討論会講演要旨集, pp. 298-299, 1999
- 13) 世古民雄, 恩田宣彦, 室内空気中VOCの測定法と装置, 第2回室内気質計測シンポジウム, (2000)
- 14) 世古民雄, 恩田宣彦, 室内空気汚染物質の一斉同時測定; 熱脱着-GC/MS法の発展, 第49回分析化学会要旨集, pp. 40, (2000)

廣告

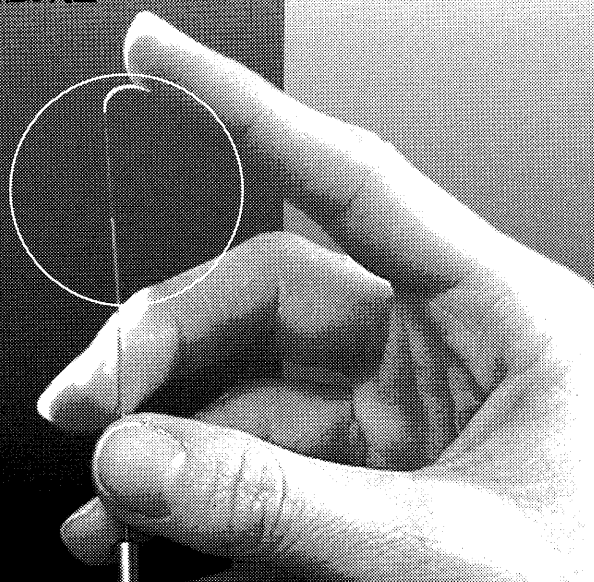
新発売

SPME
SUSPELCO

SPME StableFlex™ Fiber キット

(SPME ステージブルフレックスファイバー)

- 柔軟性のあるフューズドシリカコアで折れ難く、耐久性が向上
- 4種類のStableFlexファイバーのキット
 - 65μm DVB/PDMS
 - 50/30μm DVB/Carboxen/PDMS
 - 85μm Carboxen/PDMS
 - 70μm Carbowax/DVB
- 4本で価格28,000円と廉価
- 従来のSPMEファイバーと同じ抽出効率と性能
- マニュアル用、オートサンプラー用
- 検討用に最適
- 従来のキット(3本組)も値下げ



	キット名	キット内容	Cat. No.			価格
			手動GC用	自動GC用	HPLC用	
新製品	StableFlex キット 1	・65μm PDMS/DVB ・50/30μm DVB/Carboxen/PDMS ・85μm Carboxen/PDMS ・70μm Carbowax/DVB (各1本、合計4本)	57550-U	—	—	28,000
	StableFlex キット 2	・65μm PDMS/DVB ・50/30μm DVB/Carboxen/PDMS ・85μm Carboxen/PDMS ・70μm Carbowax/DVB (各1本、合計4本)	—	57551-U	—	
従来品	キット 1 (一般用)	・85μm Polyacrylate ・100μm PDMS ・7μm PDMS (各1本、合計3本)	57306	57307		22,000
	キット 2 (低沸点化合物用)	・65μm Carbowax/DVB ・65μm PDMS/DVB ・75μm Carboxen/PDMS (各1本、合計3本)	57320-U	57321-U	—	
	キット 3 (HPLC用)	・50μm Carbowax/TPR ・60μm PDMS/DVB ・100μm PDMS (各1本、合計3本)	—	—	57323-U	
	キット 4 (香料、香気成分用)	・100μm PDMS ・65μm PDMS/DVB ・75μm Carboxen/PDMS (各1本、合計3本)	57324-U	57325-U	—	



SIGMA-ALDRICH

シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社

〒103-0004 東京都中央区東日本橋1-1-7
東日本橋スカイビル4階

スペルコ事業部

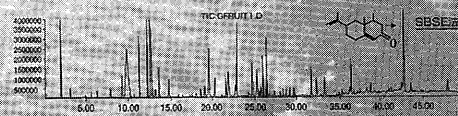
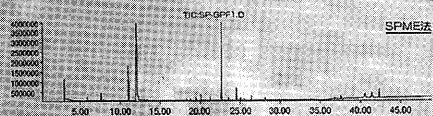
■製品に関するお問い合わせは、弊社テクニカルサポートへ
TEL:03-5821-3191 FAX:03-5821-3578
E-mailアドレス: sialjpsp@sial.com

■大阪営業所
〒532-0004 大阪市淀川区西宮原2-7-38 新大阪西浦ビル
TEL:06-6397-5963 FAX:06-6397-4649

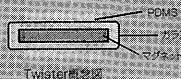
■在庫照会・ご注文方法に関するお問い合わせは、弊社カスタマーサービスへ
TEL:03-5821-3051 FAX:03-5821-3160

URL:<http://www.sigma-aldrich.com/japan>

これが本当の香りです。

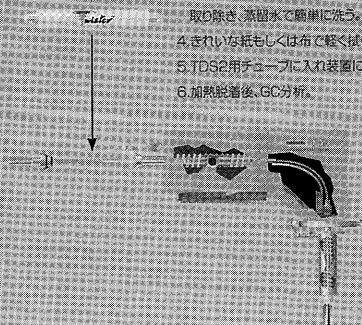


天然グレープフルーツ果汁分析例 SPME法とSBSE法の比較 Split 1:20



【分析手順】

1. Twister™を試料の入ったバイアルに入れる。
2. 撹拌させる。
3. Twister™をピンセットでバイアルから取り除き、蒸留水で簡単に洗う。
4. きれいな紙もしくは布で軽く拭く。
5. TDS用チューブに入れ装置にセットする。
6. 加熱脱着後、GC分析。

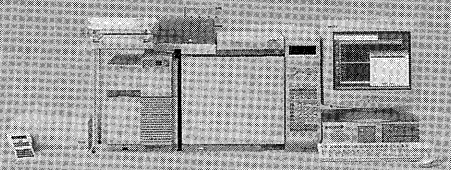


SPME法を超える新技術SBSE法*

GERSTEL TDS<加熱脱着システム>+Twister™

Twisterとは、直径約1.5cmのSter Bar(スターバー)にPDMS (polydimethylsiloxane)をコーティングしたものです。

これを液体試料を入れたバイアルの中で撹拌させながら、目的の成分を抽出します。VOC~SVOCという広い沸点範囲で、高感度分析が可能です。従来の前処理に比べて迅速、低コスト、簡便で、
 香氣成分、オフフレーバー、環境ホルモン等のアプリケーションに最適です。
 *SBSE法(Stir Bar Sorptive Extraction)GERSTEL社製Twister™を利用し、液-液分配の理論を応用した、画期的な手法です。



www.agilent.co.jp/chem/yan

Agilent Technologies
 Innovating the HP Way

横河アナリティカルシステムズ株式会社

営業本部 / 〒180-8543 東京都武蔵野市中町1-16-5三層高木ビル 電話 0120-477-111

アジレント・テクノロジーは、ヒューレット・パッカートの電子計測、化学分析、電子部品と医療電子の4つの事業が独立した新会社です。

Old brand new.



J&W Scientific
Technically Advanced GC Columns for Optimum Performance

HPシリーズそしてDBシリーズGCカラム。

25年以上もお客様の分析をサポートしてきた、信頼のブランドです。

今、ふたつのブランドは、ひとつのパッケージで販売されています。

生産はカリフォルニア州フォールソン。

パッケージが変わっても、名前が変わっても、お客様が期待する最高の品質と性能は変わりません。

どうぞ、いままでと変わりなく安心して、ご使用ください。

信頼のブランド。Agilent Technologies

www.agilent.co.jp/chem/yan



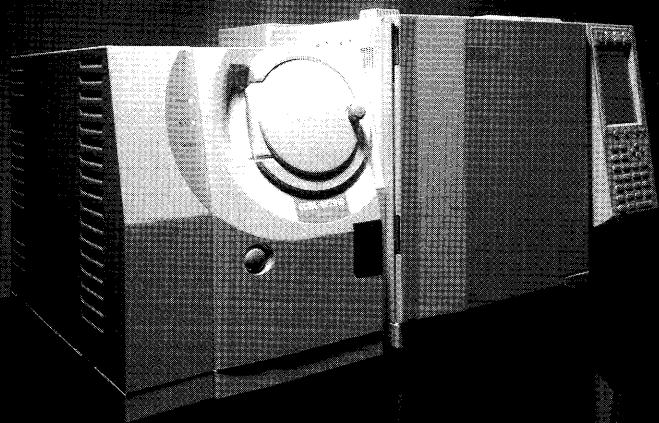
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

横河アナリティカルシステムズ株式会社

営業本拠 / 〒180-8543 東京都武蔵野市中町1-16-5 三層番木ビル ☎0120-477-111

アgilentは、テクノロジー、バイオ、コンピュータハードウェア、医薬品、化学分析、電子部品と区別電子の4つの事業が独立した新会社です。

高感度・高信頼性・拡張性を
凝縮した高性能機



SHIMADZU

Solutions for Science
since 1875

New

島津ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-QP2010

More Sensitive

- 環境分析で要求される厳しい微量分析にも余裕をもって対応

More Confident

- データの信頼性を確保するための機能を搭載

More Flexible

- 自由度の高い装置構成で多様な分析に最適環境を提供

e³イー・キュービック

島津キャピラリーガスクロマトグラフ

GC-2010 with GCsolution

Everywhere

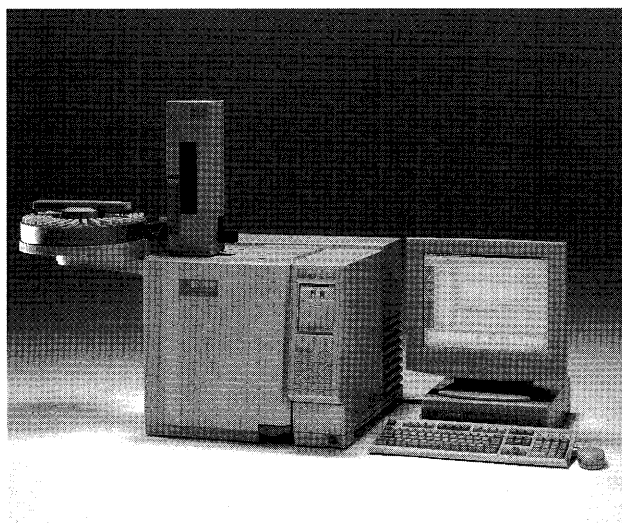
- あらゆる状況下で最高性能を発揮

Efficient analysis

- 高速分析/効率的な分析

Easy operation

- 簡単操作Gwindow/GCsolution



⊕ 島津製作所

本社 京都市中京区西ノ京桑原町1

島津ホームページアドレス <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

分析機器事業部 (075) 823-1195
お問合せはもよりの営業所へ

- 東京 (03)3219-5685 ●大阪 (06)6373-6551 ●札幌 (011)205-5500
- 仙台 (022)221-6231 ●郡山 (0249)39-3790 ●つくば (0298)51-8515
- さいたま (048)646-0081 ●横浜 (045)311-4615 ●静岡 (054)272-5600
- 名古屋 (052)565-7531 ●京都 (075)811-8151 ●神戸 (078)331-9665
- 岡山 (086)221-2511 ●高松 (087)834-3031 ●広島 (082)248-4312
- 福岡 (092)283-3334

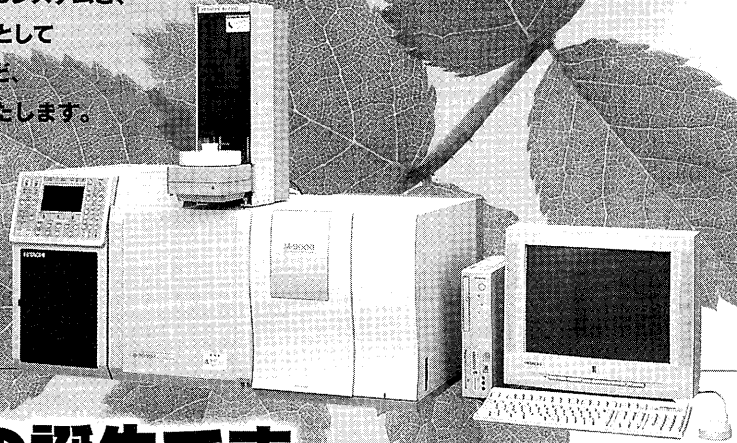
島津分析コールセンター (お客様に対する電話相談窓口)
東京 (03) 3219-1691(東日本地区) 京都 (075) 813-1691(西日本地区)

新世紀にふさわしい

環境分析システム

HITACHI

21世紀の時代、環境ホルモンや食品中の残留農薬分析など、分析技術に関するニーズはますます多様化し複雑さを増しています。日立では、これらの多様化した高度の分析技術にお応えするシステムとして、新世紀にふさわしい分析能力を誇る3DQMSシステムと、私たちの生命の源である水分析前処理装置として脚光を浴びている固相マイクロ抽出装置など、数々の新技术をラインアップしてお応えいたします。



GC/MSの誕生です。

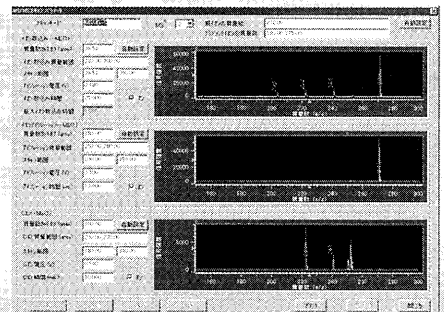
高選択性

MS/MSの搭載でS/Nの大幅な向上

夾雑イオンの除去や物質の構造解析に威力を発揮するMS/MSシステム。M-9000形GC/3DQMSシステムではMS/MSシステムの持つ魅力を100%引き出します。

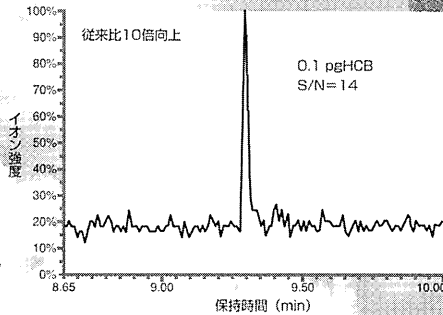
夾雑イオンの除去や、未知試料の構造解析にはなくてはならないMS/MSシステム。M-9000形GC/3DQMSシステムは、環境中の微量成分の検出手段としてMS/MSシステムをラインアップしました。

MS/MS分析例



高感度

高感度分析例



数々の新技术の搭載により、 $\text{HCB}^{1100\text{fg}}$
 $\text{S/N} \geq 10$ を達成。^{*}

*1: HCB: ヘキサクロロベンゼン
*2: 高感度検出器(オプション)
取り付け時

時代はpgオーダーからfgオーダーへ

M-9000形GC/3DQMSシステムでは、数々の新技术の搭載により感度を大幅アップいたしました。環境ホルモンなど極微量成分の定性定量同時分析に適したシステムです。

pg(ピコグラム)→ 10^{-12} 、fg(フェムトグラム)→ 10^{-15}

簡単操作 快適な操作環境を提供するデータ処理システムの採用

信頼性や操作性の高さなど分析業界では圧倒的な支持を得ているOS、Windows NT[®]を採用。M-9000形GC/3DQMSシステムでは、HPLC、LC/MS、GCでご好評を頂いているデータ処理システムと共通化を図り、快適な操作環境を提供いたします。

* Windows NTはMicrosoft社の登録商標です。

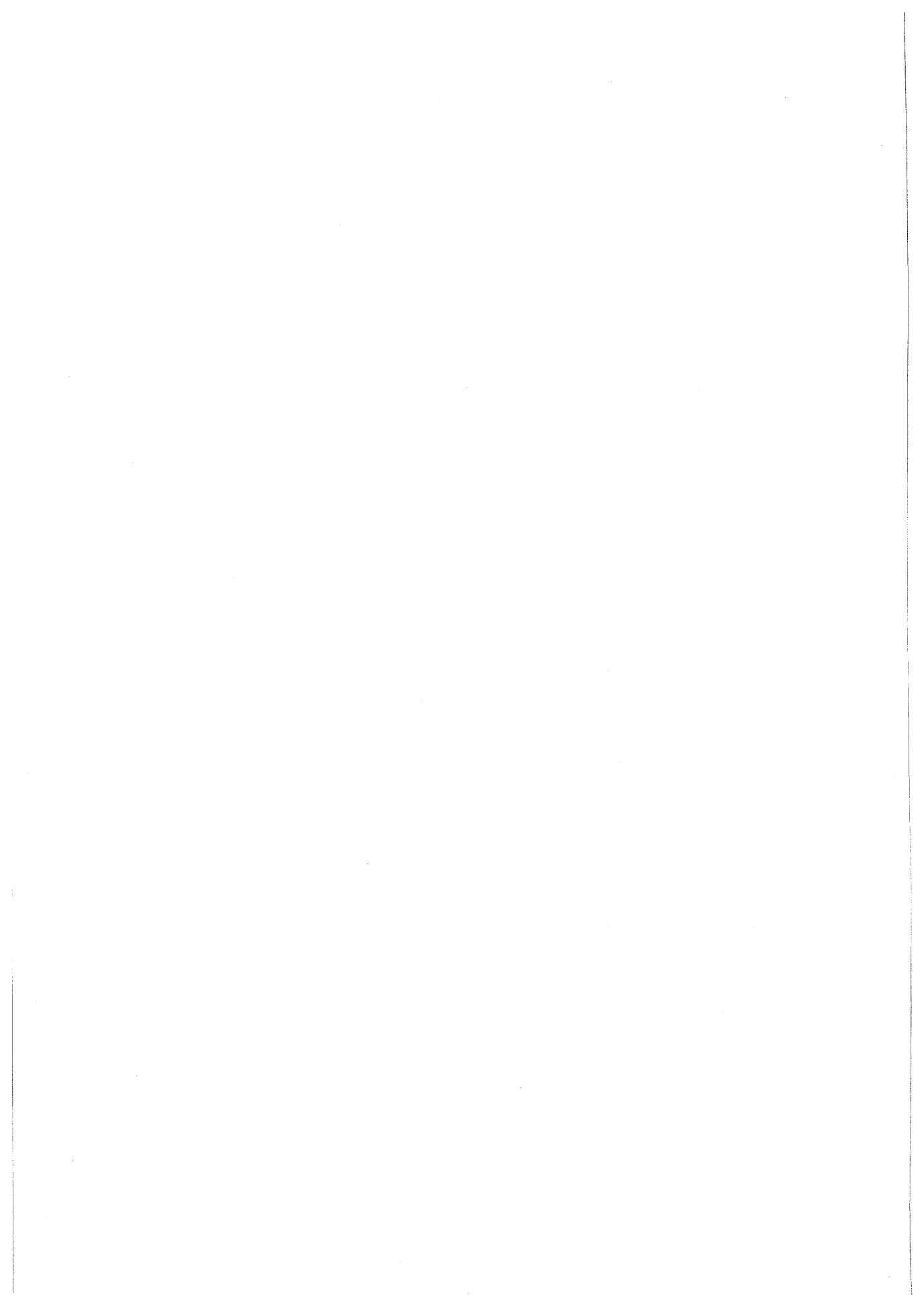
日立高性能GC/3DQMSシステム

M-9000

株式会社 日立ハイテクノロジーズ 本社 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目24番14号 電話ダイヤルイン (03) 3504-7211

事業所 北海道(札幌) (011) 221-7241 中部(名古屋) (052) 583-5851 四国(高松) (0878) 62-3391
東北(仙台) (022) 264-2211 北陸(金沢) (0762) 63-3480 中国(広島) (082) 221-4514
筑波(土浦) (0298) 25-4811 関西(大阪) (06) 4807-2551 九州(福岡) (092) 721-9501
横浜(横浜) (045) 451-5151 京都(京都) (075) 241-1591

インターネットホームページ <http://www.hitachi-hitec.com/science/>



「健康管理へのガスクロマトグラフィーの利用」

(第 247 回 ガスクロマトグラフィー研究懇談会 特別講演会資料) ¥2000 円

2001 年 12 月 7 日 初版第 1 刷

編 者 渡辺征夫

発 行 日本分析化学会

ガスクロマトグラフィー研究懇談会

住 所 〒 141 東京都品川区西五反田 1-26-2
五反田サンハイツ 304 号

電話番号 TEL:03-5487-2790, FAX:03-3490-3572

I S B M ; *****