

GC-MSによるトルエンジイソシアネート尿中代謝物の測定

森田 陽子¹⁾, 坂井 公¹⁾, Yangho Kim²⁾¹⁾ 東京労災病院産業中毒センター, ²⁾ Ulsan University Hospital

(平成15年1月8日受付)

要旨: トルエンジイソシアネート (TDI) 作業者の生物学的モニタリングのために, TDIの尿中代謝物であるトルエンジアミン (TDA) の簡便な測定法を開発した. 方法は, 尿1mlに硫酸0.1mlを加えて1.5時間加水分解し, アルカリ化したのちジエチルエーテル中に抽出する. これに窒素を吹き付け蒸発濃縮したものをトルエンで溶解し, ヘキサフルオロ-n-酪酸無水物で誘導体化する. これを再び蒸発濃縮しトルエンに溶解し, ガスクロマトグラフ質量分析計で測定するものである. 本法により TDI 暴露作業者32名の尿中 TDA の測定を行ったところ, 2,6-TDA 濃度は $0.1 \sim 28.5 \mu\text{g/l}$, 2,4-TDA は $0 \sim 5.1 \mu\text{g/l}$ であった. 一方, TDI 非暴露者の尿中には TDA はほとんど検出されなかった.

(日職災医誌, 51: 154—157, 2003)

—キーワード—

トルエンジイソシアネート, トルエンジアミン, 尿

はじめに

トルエンジイソシアネート (toluene diisocyanate) 略して TDI は, 刺激臭があり, 常温では白色～淡黄色の液体である. TDI にはイソシアネート基の位置により6種類の異性体があるが, 産業現場では2,4-, 2,6-の2種類の異性体の混合物が使用されている. 主な用途は, ポリウレタン樹脂, 塗料, 接着剤, ゴム, 繊維処理剤等である¹⁾²⁾. TDI には皮膚や粘膜の刺激作用があり, 皮膚に直接接触すると, 化学火傷, 接触皮膚炎を起こすほか, 眼に暴露すれば流涙, 炎症, 角膜炎を生じることがある³⁾. 吸入した場合は咳, 分泌亢進, 胸痛, 呼吸困難が現れるほか, 重篤な場合では肺水腫を引き起こすことがある⁴⁾. TDI には感作性があり, 職業性喘息を引き起こす物質として知られている⁵⁾⁶⁾. 我が国でも TDI による急性および慢性中毒例がいくつか報告されている. TDI は体内で代謝され, それぞれが対応するトルエンジアミン (toluenediamine, TDA) の異性体となるので⁷⁾, これらを測定することによる TDI の生物学的モニタリングが可能と考えられる⁸⁾⁹⁾. 本研究では, 超低濃度の TDA の測定法の開発をめざしてガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) を用いた TDA の簡易な分離測定法を検討し, 実際の作業者に適用した.

材料と方法

対象は TDI を使用する楽器製造工場の作業者32名 (暴露群) と非暴露者9名 (対照群) のスポット尿である. 採尿後すみやかに冷凍し, 解凍は測定直前に行った. TDA の標準品は東京化成工業の2,4-TDA, 3-, 4-TDA, 2-, 6-TDA を用いた. 内部標準物質の m- および p- キシレンジアミン (m-, p- xylenediamine, m-, p-XDA) と誘導体化試薬のヘプタフルオロ-n-酪酸無水物 (heptafluoro-n-butyric anhydride, HFBA) も同様である. ジエチルエーテル, 水酸化ナトリウム, 硫酸は和光純薬工業の特級試薬を用いた. 試薬の調整や前処理には Mill-Q システム (Millipore) による純水を使用した.

ふたつき遠心管 (16ml) に尿1mlをとり, 内部標準物質として m-XDA, p-XDA 混液 (各2ppm) 0.1ml と濃硫酸0.2mlを加えてよく混和し, 90分間煮沸した. 冷却後, 8Nの水酸化ナトリウム溶液1mlを加えよく混和し, ジエチルエーテル2mlを加えて20分間振とう抽出した. 5分間の遠心分離 (3,000rpm) 後に上層を分取し, 窒素を吹き付け濃縮乾燥した. これをトルエン500 μl で溶解し, HFBA を25 μl 加え55℃温浴中で1時間加熱し TDA, XDA を誘導体化した. これを再度窒素で濃縮乾燥してトルエン200 μl に再溶解し, GC-MS による測定に供した.

ガスクロマトグラフ (GC) には島津 GC-17A を用いた. カラムは J&W 社の DB-5 (30m, 内径0.32mm) を

使用し、サンプル1 μ lをスプリットレスで注入した。カラムは初温150℃で1分保持の後、毎分10℃で昇温し、終温280℃で1.5分保持した。質量分析計（MS）には島津QP5050Aを使用、インターフェース温度は280℃である。測定は陰イオン化学イオン化法（negative ion chemical ionization：NCI）により選択イオン検出（selective ion monitoring：SIM）を行った。反応ガスにイソブタンを使用した。XDAの誘導体は $m/z = 508$ 、TDAの誘導体としては $m/z = 494$ を選択測定した。

結 果

まずジエチルエーテルによるTDAの抽出効率に及ぼす抽出液のpHの影響をみるために、抽出の前に加えるアルカリの量を検討した。図1に加水分解後の尿（約2ml）に種々の量の水酸化ナトリウム溶液（10N）と水を計2mlとなるように加えて抽出した時の、GC-MSクロマト上のTDAピーク面積の変化を示す。尿に添加したTDAの抽出では、水酸化ナトリウム（10N）が1.6ml、水0.4mlの場合が最も高いピーク面積となった。よってルーチン測定には加水分解後の尿（約1ml）に8Nの水酸化ナトリウム溶液1mlを加えることとした。TDAを水に添加した場合も同様の結果が得られた。一方、複数の尿にTDAを添加して測定を行ったところ回収率に違いがみられた。これらの結果より、尿検体の測定には標準添加法を用いることとした。また抽出溶剤にトルエンを使用したところ、抽出効率が低下した。

図2Aは尿に添加した2,6-TDAと2,4-TDAの検量線を示す。縦軸はTDAのXDA（内部標準物質）に対する比であり、TDAの濃度に対応して良好な直線性を示した。図2Bは水を用いた場合の検量線であり、尿と同様に良好な直線性が得られた。

図3に3種のTDAと2種のXDAのHFBA誘導体のイオンクロマトグラムを示す。Aは標準物質、Bは作業者の尿のクロマトグラムである。TDA 3種の誘導体の検出にはすべて $m/z = 494$ を測定するが、3,4-, 2,6-, 2,4-の順に溶出するため、分離測定が可能である。XDA2種

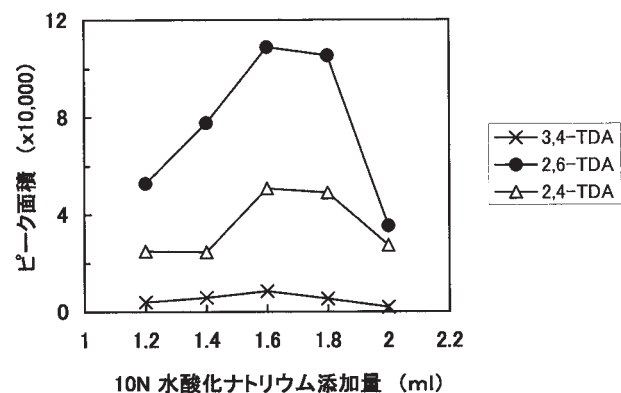


図1 TDA抽出時におけるアルカリ化の影響

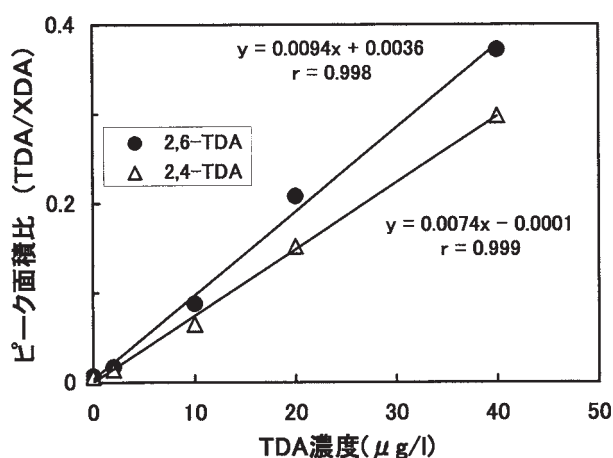
の誘導体は $m/z = 508$ を用い、どちらも内部標準として用いることが可能である。TDA誘導体の保持時間は、2,6-TDAが7.4分、2,4-TDAは7.6分である。図Aの各標準物質の濃度は、TDAが100ppb、XDAは200ppbである。図Bの作業尿には3,4-TDAは認められず、2,6-TDAの濃度は5.2 μ g/l、2,4-TDAは0.5 μ g/lである。

図4はTDA作業（暴露群）32名と非暴露者（対照群）9名について尿中TDA濃度の測定結果を示す。検出限界は0.1 μ g/lである。暴露群の2,6-TDAの範囲は0.1～28.5（平均1.95） μ g/l、2,4-TDAは0～5.1（平均0.79） μ g/l、対照群のうち8名の2,6-TDA、2,4-TDA濃度は検出限界以下であり、1名のみが約0.1 μ g/lであった。

考 察

TDIには感作性があるためその許容濃度は非常に低く設定されている。日本産業衛生学会では、2,4-TDIと

A. 検量線（尿）



B. 検量線（水）

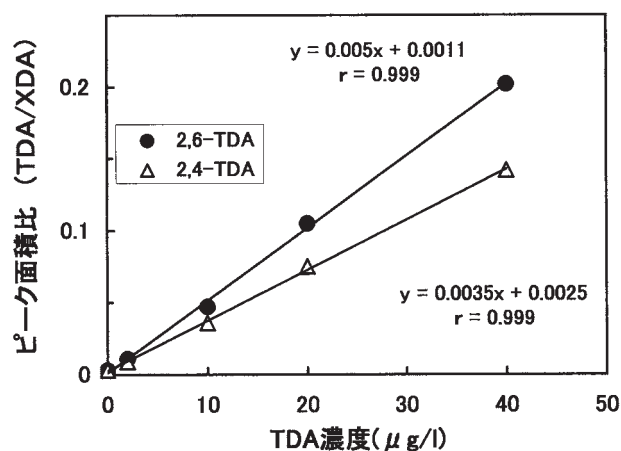


図2 直線性の検討

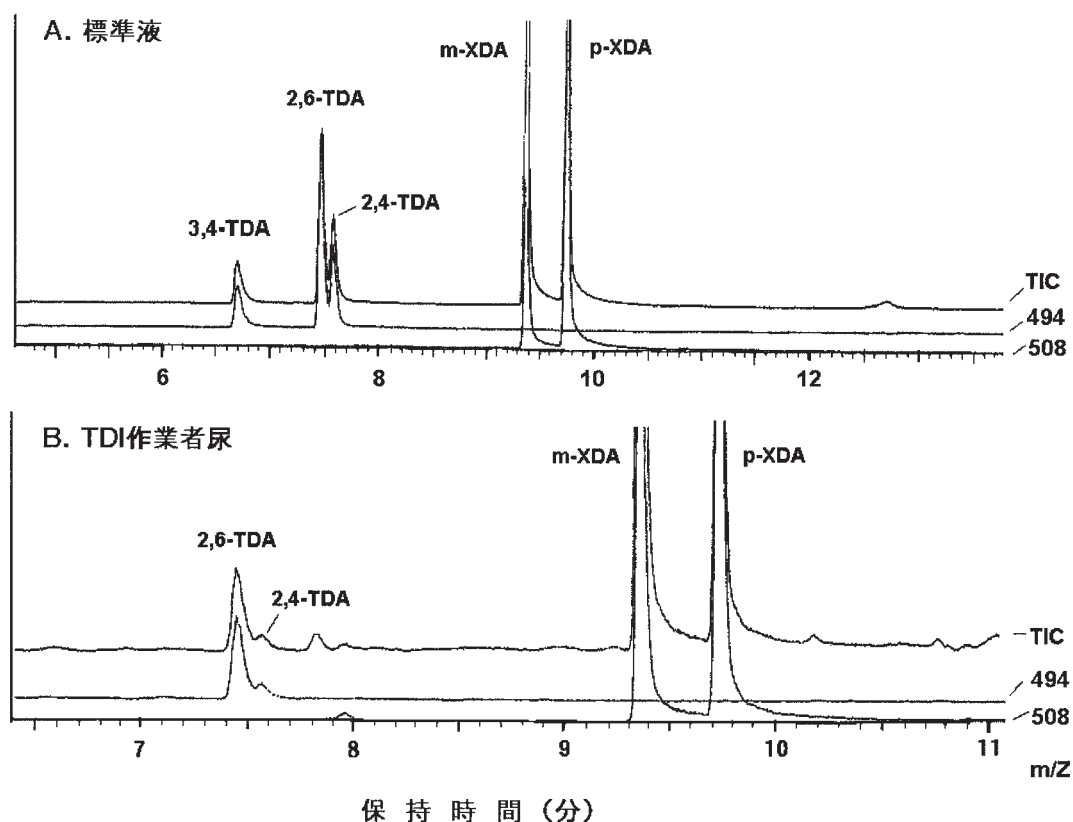


図3 TDA, XDAのHFBAの誘導体クロマトグラム

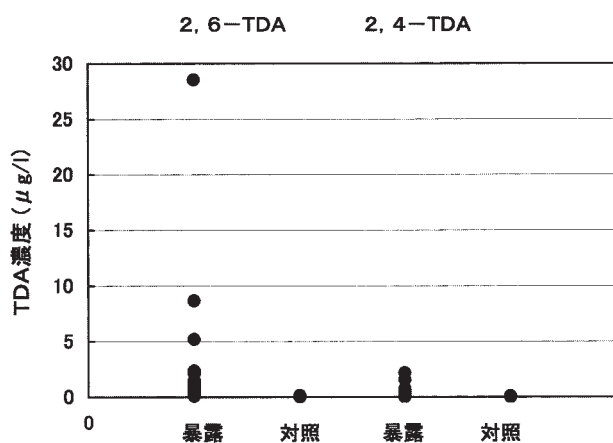


図4 TDI暴露群 (32名) と非暴露対照群 (9名) の尿中TDA濃度

2,6-TDIの和として、許容濃度 (1日8時間, 1週40時間の場合の当該物質の平均暴露濃度) を0.005ppm (0.035mg/m³), 最大許容濃度 (この暴露濃度以下ならば健康上の悪い影響がみられないとされる濃度, 実際には最大暴露濃度を含む5分までの測定で得られる最大値) を0.02ppm (0.14mg/m³) と提案している¹⁰⁾。アメリカ労働衛生専門家会議 (ACGIH) は2,4-TDIのTLV (Threshold Limit Value) を0.005ppm, STEL (Short Term Exposure Limit: 短時間暴露限界, 15分間) を0.02ppmと勧告している¹¹⁾。近年, 実際に体内にとりこまれたTDI量を測定して健康障害の予防に役立てる

生物学的モニタリングの手法の開発が試みられてきている^{8) 9) 12) ~ 14)}。この目的のため代謝産物である尿中TDAの測定が行われているが, TDIの許容濃度が低いことから尿中TDAの濃度も非常に低く, 測定には煩雑で時間のかかる前処理が必要とされてきた。

Sandstromら⁸⁾は2mlの尿を3mlの6N塩酸で処理したが, 加水分解にovernight (= 16時間程度) と長い時間を要し, 水酸化ナトリウムで強アルカリ化したTDAをトルエンで抽出しGC-MSで測定している。その後, Maitreら¹²⁾は12Nの塩酸を用いて加水分解時間を2時間に短縮したが, トルエンによる2回の抽出を必要としている。Lindら^{13) 14)}は加水分解に硫酸を用いたが16時間の加水分解とトルエン抽出を行っている。本研究では, 加水分解に硫酸を用い, 有機溶剤への抽出効率を検討し (図1), トルエンに替えてジエチルエーテルで抽出を行った。これにより抽出効率が向上し, 測定に必要な尿量を1mlに減じ, 加水分解時間も1.5時間に短縮することができた。本法によるTDAの検量線は水, 尿ともに良好であり (図2), 3種のTDAは分離測定可能であった (図3)。

本研究で確立した方法によってTDI暴露群と非暴露対照群の尿中TDAの測定を行ったところ, 暴露群の尿中にはTDAが測定されたが, 対照群にはほとんど検出されなかった (図4)。Maitreら¹²⁾は気中2,6-TDI濃度の時間加重平均が9.5から94μg/m³の工場で9名の作業者

について尿中TDAによる生物学的モニタリングを行い、尿中2,6-TDA濃度は6.5から31.7 $\mu\text{g/gCre}$ であったと報告している。本研究では工場の気中TDI濃度の測定を行っていないが、Maitreらの工場よりも低い暴露であったと予想される。

本研究で得られた方法を尿中TDAの測定に応用することにより、従来法に較べ使用する尿量と加水分解時間を減らすことができた。本法により実際の尿検体の測定を行ったところ、TDI作業者の尿には代謝物であるTDAが検出され、非暴露者にはほとんど検出されなかった。本法によりTDI作業者の生物学的モニタリングが可能と考えられる。(本研究の一部は、平成14年度厚生労働科学研究費補助金(H14—労働—11)によった。)

文 献

- 1) WHO : Environmental health criteria 75. Toluene diisocyanates. Geneva. World Health Organization. 1987.
- 2) 大前和幸, 桜井治彦 : トルエンジイソシアネート・ジフェニルメタンジイソシアネート中毒と健康管理. 産業医学ジャーナル 4 : 4—12, 1981.
- 3) Calas E, Castelain PY, Lapointe HR, et al : Allergic contact dermatitis to a photopolymerizable resin used in printing. Contact Dermatitis 3 : 186—194, 1977.
- 4) Luckenbach M, Keiler R : Toxic corneal epithelial edema from exposure to high atmospheric concentration of toluene diisocyanates. Am J Ophthalmol 90 : 682—686, 1980.
- 5) Banks DE, Butcher BT, Salvaggio JE : Isocyanate-induced respiratory disease. Ann Allergy 57 : 389—398, 1986.
- 6) Baur X, Marek W, Ammon J, et al : Respiratory and other hazards of isocyanates. Int Arch Occup Environ Health 66 : 141—152, 1994.
- 7) Rosenberg C, Savolainen H : Determination in urine of diisocyanate-derived amines from occupational exposure by gas chromatography-mass fragmentography. Analyst 111 : 1069—1071, 1986.
- 8) Sandstrom JF, Skarping G, Dalene M : Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to biological monitoring of isocyanates and amines. II. Determination of 2,4- and 2,6-toluenediamine using glass capillary gas chromatography and selected ion monitoring. J Chromatogr 479 : 135—143, 1989.
- 9) Skarping G, Brorson T, Sangö C : Biological monitoring of isocyanates and related amines III. Test chamber exposure of human to toluene diisocyanate. Int Arch Occup Environ Health 63 : 83—88, 1991.
- 10) 日本産業衛生学会許容濃度等に関する委員会. 許容濃度の暫定値(1992)の提案理由. トルエンジイソシアネート類(TDI). 産業医学 34 : 394—395, 1992.
- 11) ACGIH : 2002 TLVs and BEIs (Threshold limit values and biological exposure indices), American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, 2002, pp 127.
- 12) Maitre A, Berode M, Perdrix A, et al : Biological monitoring of occupational exposure to toluene diisocyanate. Int Arch Occup Environ Health 65 : 97—100, 1993.
- 13) Lind P, Dalene M, Skarping G, Hagmer L : Toxicokinetics of 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed urine and plasma after occupational exposure to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate. Occup Environ Med 53 : 94—99, 1996.
- 14) Lind P, Dalene M, Tinnerberg H, Skarping G : Biomarkers in hydrolyzed urine, plasma and erythrocytes among workers exposed to thermal degradation products from toluene diisocyanate foam. Analyst 122 : 51—56, 1997.

(原稿受付 平成15. 1. 8)

別刷請求先 〒143-0013 東京都大田区大森南4—13—21
東京労災病院産業中毒センター
森田 陽子

Reprint request:

Yoko Morita
Center of Occupational Medicine, Tokyo Rosai Hospital, 13-21, Omoriminami-4, Ota-ku, Tokyo, 143-0013

GC-MS DETERMINATION OF URINARY METABOLITE OF TOLUENE DIISOCYANATE

Yoko MORITA¹⁾, Tadashi SAKAI¹⁾ and Yongho KIM²⁾

Occupation Poisoning Center, Tokyo Rasai Hospital¹⁾, Ulsan University Hospital²⁾

To improve the biological monitoring method for toluene diisocyanate (TDI) exposure, we developed a simple and rapid method for analysis of the corresponding urinary metabolites, toluenediamine (TDA). One ml of urine was hydrolyzed at 100°C for 1.5h with sulphuric acid. Alkalinized hydrolysate was extracted with diethyl ether and evaporated to dryness under nitrogen stream. Samples were resuspended in toluene and derivatized with heptafluorobutyric anhydride. Then samples were further evaporated to dryness, and resuspended in toluene, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Using the present method, the urinary levels of 2,6- TDA and 2,4- TDA in TDI-exposed 32 workers were calculated to be 0.1 to 28.6 and 0 to 5.1 $\mu\text{g/l}$, respectively, whereas both TDA isomers were not detected in the non-exposed (control) subjects.