

原 著

尿中トリクロロエタノール測定に関する高感度 エレクトロンキャプチャー検出器付き ガスクロマトグラフィー測定法

井上 修

東北労災病院・健康診断部

(平成18年2月28日受付)

要旨：トリクロロエチレン，テトラクロロエチレン等の曝露指標として利用可能な尿中のトリクロロエタノールを $\mu\text{g/l}$ 濃度レベルで検出できる高感度測定法の検討を行った。確立時には，アルゴンガスと純窒素ガスの使用とガス圧およびカラム初期温度の異なる8通りの測定条件を設定し検討した。個々の条件毎に一定濃度のトリクロロエタノールをエレクトロンキャプチャー検出器付きガスクロマトグラフィー装置で測定し，得られるクロマトピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$) の大小で，より高い測定感度が得られる条件を選定した。その結果，トリクロロエタノール濃度測定で最も高感度が得られたのは，キャリアーガスが純窒素ガスで，ガス圧が 2.0kg/cm^2 ，カラム初期温度が 90°C の場合であった。高感度が得られる3要因の内，感度上昇に最も寄与しているのは，純窒素ガスと考えられた。

測定用サンプルの処理は，濃塩酸で尿を加水分解し，0.75規定の水酸化ナトリウムを加え，その後，上清液をメタノールとエタノールおよび精製水の混合液に溶解して作製した。得られた混合液の1~2 μl をジーエルサイエンス社製のキャピラリーカラム (Neutra Bond-1：内径0.53mm，長さ60m，膜厚 $2.0\mu\text{m}$) を装着したエレクトロンキャプチャー検出器付きガスクロマトグラフィー装置に注入し測定した。最も高感度が得られる方法での検出限界値は $0.07\mu\text{g/l}$ であった (P/N = 2)。測定精度 (同時再現性，添加回収率，直線性) は良好であった。

(日職災医誌，54：205—208，2006)

—キーワード—

尿中トリクロロエタノール，高感度分析法，エレクトロンキャプチャー検出器付きガスクロマトグラフィー

はじめに

尿中トリクロロエタノールの測定¹⁾は，職業的にトリクロロエチレン，テトラクロロエチレン等に曝露した労働者の曝露マーカーとして，またトリクロロ酢酸とトリクロロエタノールを合計した総三塩化物^{2)~4)} (藤原反応を利用した測定) とする曝露マーカーとして利用していた。但し，これまでの尿中濃度測定は，職業的曝露で，且つトリクロロエチレン等の濃度レベルがppmに対応する範囲であった。最近ではACGIH (アメリカ) が血中の遊離型トリクロロエタノールの測定をトリクロロエチレン等の曝露マーカーとして推奨している⁵⁾ (BEIとして 4mg/l)。今回は，更に低い $\mu\text{g/l}$ (mg/l の千分の一) レベル濃度でも測定可能な尿中のトリクロロエタノール

測定法の確立を目指し，高感度分析に必要なガスの種類やガス圧，カラム初期温度の条件を検討したので報告する。なお本測定法の対象となる被験者は，職業的なトリクロロエチレン，テトラクロロエチレン等の数ppm~ppbレベル曝露のみならず，職業的に曝露していない飲料水等から摂取する一般人も範囲となる。

材料と方法

トリクロロエタノール濃度測定には，島津製作所のエレクトロンキャプチャー検出器付きガスクロマトグラフィー (GC-14A) 装置を利用した。他の尿中成分とトリクロロエタノールの分離は，ジーエルサイエンス社製のキャピラリーカラム；Neutra Bond-1，内径0.53mm，長さ60m，膜厚 $2.0\mu\text{m}$ を使用した。測定時におけるガスの種類は，アルゴンガスと純窒素ガスを用いた。ガス圧は 1.2kg/cm^2 と 2.0kg/cm^2 (この数値は，カラムの出口で 34ml/分 の流速と同等) を選択し，カラム初期温度

は、90℃と100℃で検討した。ガスクロマトグラフィー本体の注入温度と検出器温度は、共に280℃に設定し、レンジは10¹、電流は0.5nAとした。データの処理は、島津製作所のC-R4Aクロマトパックで行った。カラム初期温度の保持時間は、測定検討条件の中で最も遅いトリクロロエタノールのピークが出現し、且つベースラインが安定した状態で測定できる7分を最大時間とした。その後、1分間に40℃の割合で昇温させ、カラムの最終温度を230℃まで上昇、保持時間を1分間に設定して測定した。検討した方法の測定感度は、775μg/l濃度のトリクロロエタノールを分析して得られるクロマト上のトリクロロエタノールのピーク面積（図1）の大きさとその順位付けで判定した。その理由は、測定感度の基準となる検出限界値が【2×ノイズピークの面積】÷【775μgトリクロロエタノール/lのピーク面積】×775μg/lの式で計算され（【2×ノイズピークの面積】は一定）、775μgトリクロロエタノール/lのピーク面積が大きくなればなる程、検出限界値が低くなり、測定感度が高くなる事に基づく。またトリクロロエタノールのピークの面積の大きさだけでは、選定条件毎の測定感度の相違が理解し難いので、考察する上において、さらに分かり易くするため、測定感度とリンクするトリクロロエタノールのピーク面積の大きさを単純な順位付けをする事で理解を容易にした。方法は選定条件毎に一定濃度のトリクロロエタノールを5回測定し、得られたピークの面積の平均値の

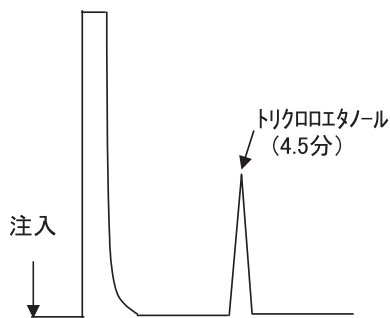


図1 トリクロロエタノール測定のカロマト図

大きさを順位付けして測定感度の良さを判定し、得られたデータを比較検討する事で行った。サンプル処理は、尿または標準液およびブランクとしての精製水をエクセルピペットで、蓋付きガラス試験管に1,000μl取り、濃塩酸50μlを加え、混和後、強く蓋をして100℃で30分間加温して加水分解する。その後、水道水等で冷却して0.75規定の水酸化ナトリウム700μlを加え混和、1分間、3,000rpmで遠心した。得られる上清液の500μlを他の蓋つきガラス試験管に取り、精製水1,000μl、メタノール1,000μl、エタノール1,000μl（総量3,000μl）を加え混和し、測定用サンプルを作製した。測定時には、1～2μlのサンプルをマイクロシリンジ（伊藤製作所製）を利用してガスクロマトグラフィー装置に注入し分析した。測定精度の確認は、高い感度が得られる条件下で、同時再現性、添加回収率および直線性試験を行い検討した。

本研究で確立した方法での実尿サンプルの濃度計算は、【(サンプルのピーク面積-ブランクのピーク面積)/(775μgトリクロロエタノール/lのピーク面積)】×775μg/lの式に代入して行う。但し上記式の775の数値は、作製し使用する標準液濃度が異なる場合、その数値に変換して利用しなければならない。

結 果

尿中トリクロロエタノール濃度の高感度情報を得るための検討組み合わせは、8通りで行った（表1）。測定感度の比較は、エレクトロンキャプチャー検出器付きガスクロマトグラフィー装置で775μgトリクロロエタノール/lの濃度を検討条件毎に5回測定し、得られるピーク面積の大きさ（平均）を順位付けして判定した（表1：ピークの面積と感度は逆比例）。その結果、最も高感度を得られる測定条件は、ガスの種類が純窒素ガスで、カラム初期温度が90℃、ガス圧が2.0kg/cm²の場合であった。一方、最も感度の悪い組み合わせは、カラムの初期温度が100℃、ガスの種類がアルゴンガスで、ガス圧が1.2kg/cm²の場合であった（表1）。8通りの組み合わせを

表1 ガスクロ測定条件とピーク時間、面積および感度順位

カラム初期温度	90℃	90℃	90℃	90℃	100℃	100℃	100℃	100℃	
ガスの種類	Ar	Ar	N ₂	N ₂	Ar	Ar	N ₂	N ₂	
ガス圧 (kg/cm ²)	1.2	2.0	1.2	2.0	1.2	2.0	1.2	2.0	
ピーク時間 (分)	6.2	4.3	5.4	3.4	5.5	3.5	4.5	2.8	
ピーク面積	平均	5,538	7,764	13,261	16,848	4,948	6,545	8,818	10,258
	標準偏差	340	211	733	826	265	415	543	544
	変動係数 (CV)	6.1	2.7	5.5	4.9	5.4	6.3	6.2	5.3
	感度順位	7	5	2	1	8	6	4	3

※トリクロロエタノール 775 μg/l で測定
(各5回測定)

表2 トリクロロエタノールの同時再現性及び添加回収試験

測定項目	回数	濃度 ($\mu\text{g/l}$)	同時再現性 CV (%)	回収率 (%)
トリクロロエタノール	5	387.5	5.0	100.6
トリクロロエタノール	5	775.0	2.3	100.7

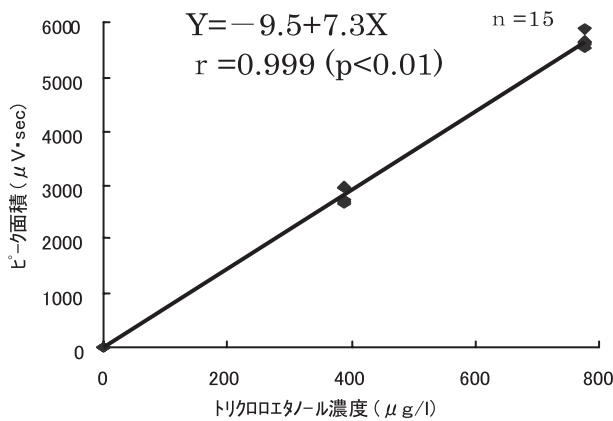


図2 トリクロロエタノールの直線性試験

詳細に観察し、感度順位をみた場合、ガスの種類では、明らかに純窒素ガスの方が、アルゴンガスよりも検出感度が高かった。なお純窒素ガスで観察された順位は1, 2, 3, 4番で、アルゴンガスでは、5, 6, 7, 8番であった(表1)。カラム初期温度では、90℃の検出感度の順位は1, 2, 5, 7番で、100℃の場合は3, 4, 6, 8番であった(表1)。カラムの初期温度では、検出感度順位をトータルで観察した場合、100℃よりも90℃に設定した方が検出感度が良くなる傾向が観察された(表1: 感度順位はトータルで90℃の方が100℃よりも上にある)。ガス圧については、2.0kg/cm²の場合、順位が1, 3, 5, 6番で1.0kg/cm²では2, 4, 7, 8番であった。高い感度が得られるのは2.0kg/cm²の場合であった。純窒素ガスの順位は1, 2, 3, 4番、カラム初期温度90℃の順位は1, 2, 5, 7番、ガス圧2.0kg/cm²の順位は1, 3, 5, 6番となるが、3要因の内、順位比較検討では、高い感度を得るために最も寄与しているのは、純窒素ガスで、その次はカラムの初期温度が90℃とガス圧が2.0kg/cm²の場合であった(表1)。

測定精度は、最も高感度が得られる測定条件下で検討した。その結果、トリクロロエタノール387.5と775.0 $\mu\text{g/l}$ 濃度で、同時再現性は5.0と2.3%、回収率は100.6と100.7%であった(表2)。直線性はトリクロロエタノール濃度が0, 387.5, 775.0 $\mu\text{g/l}$ (各濃度5回測定)で、それぞれの濃度に対応するピーク面積で回帰直線式を計算した場合、 $Y = -9.5 + 7.3X$ (X はトリクロロエタノール濃度、 Y はピーク面積)となり、相関係数は0.999 ($p < 0.01$)となった(図2)。

考 察

高感度尿中トリクロロエタノール測定に関するガスクロマトグラフィー装置を利用する方法を確立するため、キャリアーガス(純窒素, アルゴンガス)の種類とその流量, およびカラム初期温度の8通りの組み合わせを作り, 個々の組み合わせ毎に一定濃度のトリクロロエタノールを測定し, 得られるピーク面積より, 高い感度条件が得られる組み合わせを選定した。その結果, トリクロロエタノール濃度測定で最も高感度が得られる条件は, キャリアーガスが純窒素ガスで, ガス圧が2.0kg/cm², カラムの初期温度が90℃の場合であった。高感度を得るために選択されたキャリアーガスとしての純窒素ガス(感度順位1, 2, 3, 4)は, 観察した条件下では, 全ての順位データでアルゴンガスよりも優れていた。理由としてガスの種類とキャピラリーカラムおよびエレクトロンキャプチャー検出器との関係が考えられるが, 現段階では分からない。カラム初期温度では100℃よりも90℃の方が高い感度が得られる傾向がみられ, ガス圧では2.0kg/cm²の方が1.0kg/cm²よりも高感度を得られる傾向がみられた。それらの理由もガスの種類と同様, 原因が分からない。今後の検討課題である。感度順位から観察した場合, 高感度が得られる3要因(ガスの種類, ガス圧, カラム初期温度)の内, 感度上昇に最も寄与しているのは, 数値上, 純窒素ガスと考えられた。P/N(ピーク/ノイズ)比を2とした場合, 最も高感度が得られる測定法での検出限界値は, 0.07 $\mu\text{g/l}$ であった。その値をトリクロロエチレン等のppm曝露に対応するトリクロロエタノール排泄濃度のmg/lレベルの排泄関係¹⁾から推算した場合, トリクロロエチレン等の曝露がppbレベルでは, トリクロロエタノール排泄濃度が $\mu\text{g/l}$ レベルと考えられるので, $\mu\text{g/l}$ レベル濃度が測定できる高感度トリクロロエタノール測定法は, ppbレベルのトリクロロエチレン等の曝露指標として利用可能である事が示唆される。今回確立した本測定法の同時再現性は, トリクロロエタノールが387.5, 775.0 $\mu\text{g/l}$ で5%以下, 回収率は100.6~100.7%でほぼ100%であった。一方, 直線性試験で得られる回帰式は $Y = -9.5 + 7.3X$, 相関係数0.999 ($p < 0.01$)となった。非常に高い相関係数となった。得られた値をトータルでみた場合, 本法の測定精度は良好であった。

ま と め

$\mu\text{g/l}$ レベルの尿中トリクロロエタノール濃度測定法の確立を目指し, ガスクロマトグラフィー条件やサンプル作製法を検討した結果, 検出限界が0.07 $\mu\text{g/l}$ となる高感度トリクロロエタノール測定法が確立できた(P/N=2)。本解析の内, 最も高感度が得られる測定条件は, キャリアーガスが純窒素ガスで, ガス圧が

2.0kg/cm², カラム初期温度が90℃の場合であった。同時再現性と添加回収率および直線性を検討した結果、本法の測定精度は良好であった。

今後は、今回確立した高感度トリクロロエタノール測定法を、職業的な数ppmレベルのトリクロロエチレン等の曝露指標としてのみならず、一般人が飲料水等から摂取するppbレベルのトリクロロエチレン曝露等の指標としても応用したい。

文 献

- 1) Inoue O, Ukai H, Ikeda M : Green chemistry in urinalysis for trichloroethanol and trichloroacetic acid as markers of exposure to chlorinated hydrocarbon solvents. *Ind Health* 44 : 207—214, 2006.
- 2) Ikeda M, Ohtsuji H, Imamura T, et al : Urinary excretion of total trichloro-compounds, trichloroethanol, and trichloroacetic acid as a measure of exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene. *Br J Ind Med* 29 : 328—333, 1972.
- 3) Seiji k, Inoue O, Jin C, et al : Dose-excretion relationship in tetrachloroethylene-exposed workers and the effects of tetrachloroethylene co-exposure on trichloroethylene metabolism. *Am J Ind Med* 16 : 675—684, 1989.
- 4) Inoue O, Seiji K, Kawai T, et al : Relationship between vapor exposure and urinary metabolite excretion among workers exposed to trichloroethylene. *Am J Ind Med* 15 : 103—110, 1989.
- 5) American Conference of Governmental Industrial Hygienist : Threshold limit values for chemical substances and physical agents and Biological exposure indices, 2000. (原稿受付 平成18. 2. 28)

別刷請求先 〒981-8563 仙台市青葉区台原4-3-21
東北労災病院・健康診断部
井上 修

Reprint request:

Osamu Inoue
Department of Health Examination, Tohoku Rosai Hospital,
4-3-21 Sendai 981-8563, Japan

A SENSITIVE ECD-GC METHOD FOR DETERMINATION OF TRICHLOROETHANOL IN URINE

Osamu INOUE

Department of Health Examination, Tohoku Rosai Hospital

The purpose of the present study was to develop a sensitive electron-capture detector-equipped gas-chromatograph (ECD-GC) method of urinalysis for trichloroethanol. In order to establish a highly sensitive method on determination of urinary trichloroethanol as a marker of tichloroethylene, methylchloroform and tetrachloroethylene exposure at ppb levels, comparative evaluation for Ar and N₂ as carrier gas, 1.2kg/cm² and 2.0kg/cm² as gas pressure, 90°C and 100°C as initiative column temperature were performed by ECD-GC. The column used was a Neutra Bond-1 capillary column, which was 60m in length, 0.53mm in diameter and 2.0μm in film thickness (GL science, Tokyo, Japan). With regard to pretreatment of urine samples and standard solutions, 50μl of concentrated hydrochloric acid (36% HCl) was added to 1,000μl of urine sample and standard solution. After the glass tube was tightly sealed and the contents were well mixed, the mixture was heated at 100°C for 30 min. and 700μl of 0.75N sodium hydroxide (NaOH) was added after cooling. A sample was centrifugated at 3,000rpm for 1 min. 500μl of the supernatant phase was transferred to a tube containing a mixture (3,000μl) of ethanol, methanol and redistilled water (1 : 1 : 1 by volume) and mixed, and 1–2μl of them was injected into ECD-GC system. As the results, this was achieved by the use of N₂ gas as carrier gas, 2.0kg/cm² as gas pressure and 90°C as initiative column temperature. The detection limit was 0.07μg trichloroethanol /l when a peak / noise ratio of 2 was taken. It should be noted that a present method developed was able to apply the analysis of urine samples collected from men and women exposed to tichloroethylene, methylchloroform and tetrachloroethylene at low-levels.