

原 著

N, N-ジメチルホルムアミドを試料溶剤として使用した 尿中メタノール, アセトン, イソプロピルアルコール, 塩化メチレンのガスクロマトグラフ同時測定法

井上 修

東北労災病院検査部

(平成 20 年 5 月 2 日受付)

要旨：化学的視点から観察した場合、溶媒に溶けにくい溶質は、混合溶解しても時間の経過とともに不均一となる。今回、ガスクロマトグラフ装置を用いて、水に溶けやすいメタノール、アセトンおよびイソプロピルアルコールと水に溶けにくい塩化メチレンを同時に測定するサンプル直接注入法の検討を行った。問題点として浮上するのが溶媒と溶質の関係である。本研究では、注入測定時までのサンプル作製過程と標準液中のメタノール、アセトン、イソプロピルアルコールと塩化メチレン濃度の均一化を図るため、両親媒性（水にも有機溶剤にも溶ける性質）の N, N-ジメチルホルムアミドを溶媒として使用する方法を考案した。さらに測定精度を向上させるため 1-ブタノールを内部標準品として使用した。その結果、確立された測定法の精度が良好であることが分かった。応用として、有機溶剤非曝露者の男性 17 名、女性 29 名を対象として、尿中メタノール、アセトン、イソプロピルアルコールと塩化メチレンのバックグラウンドレベルを検討した。尿中メタノールは、男女合計で幾何平均値が 2.1mg で、尿中アセトンは幾何平均値で 0.4mg/l であった。尿中イソプロピルアルコールと塩化メチレン濃度のバックグラウンドレベルは、検出限界値以下であった。有機溶剤非曝露者の男性と女性の尿中 4 溶剤の濃度レベルに有意な性差がみられなかった ($p>0.10$)。

(日職災医誌, 56: 229—234, 2008)

キーワード

N, N-ジメチルホルムアミド使用, 尿中メタノール, アセトン, イソプロピルアルコールと塩化メチレン同時測定,
尿中バックグラウンドレベル

はじめに

水に対する可溶性と難溶性の溶剤を同時に測定する場合、測定精度の観点からは、ターゲットとする測定物質の状態が標準液や測定用サンプル作製下では、溶媒中において均一な状態が保持されなければならない。当検査部では、測定物質を均一に保持する両親媒性の N, N-ジメチルホルムアミドの使用と測定用サンプルをガスクロマトグラフ装置に直接注入することで、測定精度の高い尿中メタノール、アセトン、イソプロピルアルコールと塩化メチレンを同時に測る FID-ガスクロマトグラフ測定法を検討した。ちなみにメタノール、アセトン、イソプロピルアルコール、塩化メチレンは、工業用として使用されることが非常に多い¹⁾²⁾。さらに今回、その確立したガスクロマトグラフ法を用いて、水に対する可溶性のメタノール、アセトン、イソプロピルアルコールと難溶性

の塩化メチレンに関する有機溶剤非曝露者の尿中に排泄される 4 溶剤のバックグラウンドレベルを検討したので報告する。

測定方法および対象

標準液の溶媒として両親媒性の N, N-ジメチルホルムアミドを使用した。測定用サンプルは、尿サンプルおよび標準液 1ml に内部標準液として 0.05% の 1-ブタノール水溶液 1ml を添加した。その後、N, N-ジメチルホルムアミドを 2ml 添加混和し、3,000rpm で 5 分間遠心した。得られる上清液の 1~2 μ l を島津製作所製の GC-14A の FID 検出器付きガスクロマトグラフ装置に直接注入し、メタノール、アセトン、イソプロピルアルコールと塩化メチレンを測定した (図 1)。分離用カラムはキャピラリーカラムであるニュートラボンド-1 (ジーエルサイエンス社) を使用した。長さは 60m で内径は 0.53mm、膜

尿または標準液 1.0ml + 0.05% 1-ブタノール水溶液
1.0ml
↓ 良く混和
N,N-ジメチルホルムアミド (吸収スペクトル用) 2.0ml
↓ 良く混和
3000rpm で遠心 (5 分間)
↓
上清液の 1～2 μl をガスクロマトグラフ装置に注入測定

図 1 測定用サンプル処理法

厚は 2.0μm であった (図 2)。カラム初期温度は 40℃ で 5 分間保持, その後 15℃/分の昇温で 120℃ まで上昇させ, 再度, 40℃/分の昇温で 200℃ まで加温し測定した。注入温度は 200℃, 検出器温度は 250℃ に設定して測定した (図 2)。尿中メタノール, アセトン, イソプロピルアルコールと塩化メチレンのバックグラウンドレベルは, 有機溶剤非曝露者である男性 17 名と女性 29 名で解析した。男女合計 46 名の年齢は, 平均値±標準偏差値で 62±15 歳であった。男性と女性の年齢には, 有意な差がなかった ($p>0.1$)。

統計学的処理法

基礎的な統計量はエクセルを用いて解析した。回帰分析および差の検定等は, STATISTICA (Stat Soft Inc 米国) のソフトを NEC のコンピュータにインストールして解析した。

結 果

内部標準液を含めメタノール, アセトン, イソプロピルアルコールと塩化メチレンのクロマト上でのピークは全て 10 分以内に抽出された (図 3)。アセトンとイソプロピルアルコールのピークは, 隣接したが, 完全に分離できた。本測定法の精度は, 同時再現性を溶剤毎で各 5 回測定した場合, メタノールは 39.6, 50.8, 101.9mg/l の濃度で変動係数 4.2, 4.5, 3.3% であった。アセトンは 39.4, 269.1, 484.6mg/l の濃度で変動係数 3.9, 3.2, 2.5% で, イソプロピルアルコールは 39.3, 186.1, 339.8mg/l の濃度で変動係数 3.9, 1.6, 3.2% であった。塩化メチレンは 66.3, 129.8, 267.2 の濃度で変動係数 4.2, 4.1, 2.1 であった (表 1)。添加回収試験を溶剤毎でみた場合, 非溶剤曝露者 5 名の尿にメタノールを 0, 39.6, 50.8, 101.9mg/l の濃度を添加したサンプルと水に溶解して作製した同じ濃度の標準液で, ガスクロマトグラフ法で得られるピーク面積と濃度の数値を回帰分析して得られる勾配の比較 (以下同様) では, 回収率が 99.0% であった。アセトンは 0, 39.4, 269.1, 484.6mg/l の濃度で回収率は 100.2%, イソプロピルアルコールは 0, 39.3, 186.1, 339.8mg/l の濃度で回収率は 99.1%, 塩化メチレンは 0, 66.3, 129.8, 267.2mg/l

カラム名

NEUTRA BOND-1 キャピラリーカラム (GL サイエンス社)

60m (長さ) × 0.53mm (内径) $df = 2.0 \mu m$

温度条件

初期温度 40℃ 5 分間 (40℃ で保持)

昇温 1 15℃/分 最終温度 1 120℃

昇温 2 40℃/分 最終温度 2 200℃

図 2 カラムの種類と温度条件

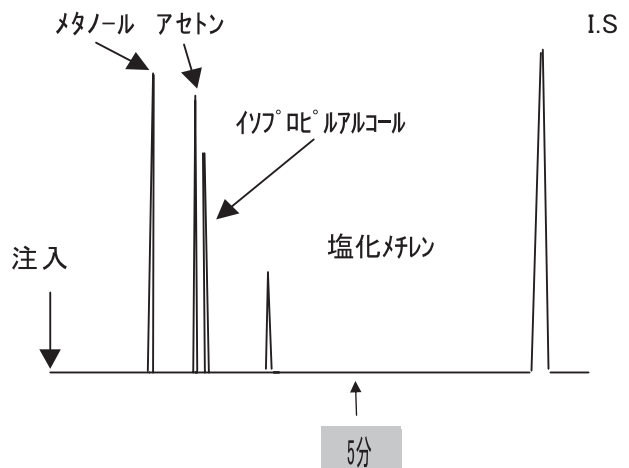


図 3 クロマト図

検出限界: メタノール, アセトンは 0.01mg/l

イソプロピルアルコール, 塩化メチレンは 0.02mg/l

の濃度で回収率は 97.9% であった (表 2)。直線性を溶剤毎に見た場合, メタノールは 4 サンプルの 0, 39.6, 50.8, 101.9mg/l の濃度値とそのサンプルからガスクロマトグラフ法で得られるメタノールのピーク面積と内部標準液としての 1-ブタノールのピーク面積の比 (メタノール・ピーク面積/1-ブタノール・ピーク面積) の値から相関係数 0.999 ($p<0.01$) が得られた。回帰直線式は $Y = 0.0016X + 0.0018$ であった (濃度を X, 比を Y として計算, 以下同様)。アセトンは 0, 39.4, 269.1, 484.6mg/l の濃度で相関係数 0.999 ($p<0.01$), 回帰直線式は $Y = 0.0018X + 0.0036$ で, イソプロピルアルコールは 0, 39.3, 186.1, 339.8mg/l の濃度で相関係数 0.999 ($p<0.01$), 回帰直線式は $Y = 0.0018X + 0.0006$ であった。塩化メチレンは 0, 66.3, 129.8, 267.2mg/l の濃度で相関係数 0.999 ($p<0.01$), 回帰直線式は $Y = 0.0004X - 0.0007$ であった (図 4)。検出限界値はメタノール, アセトンで 0.01mg/l, イソプロピルアルコール, 塩化メチレンでは 0.02mg/l であった ($P/N=2$)。確立された方法の応用として, 有機溶剤非曝露者の男性 17 名 + 女性 29 名の尿中に排泄される 4 溶剤のバックグラウンドレベルを検討した。尿中メタノールは,

表 1 溶剤毎の同時再現性試験（各 n = 5）

溶剤	濃度 (mg/l)	CV (%)	溶剤	濃度 (mg/l)	CV (%)
メタノール	39.6	4.2	アセトン	39.4	3.9
	50.8	4.5		269.1	3.2
	101.9	3.3		484.6	2.5
IPA	39.3	3.9	塩化メチレン	66.3	4.2
	186.1	1.6		129.8	4.1
	339.8	3.2		267.2	2.1

IPA；イソプロピルアルコール

CV；変動係数

表 2 溶剤毎の回収試験（勾配）（1 溶剤各 n = 6）

溶剤	濃度 (mg/l)				回収率 (%)
メタノール	0	39.6	50.8	101.9	99.0
アセトン	0	39.4	269.1	484.6	100.2
IPA	0	39.3	186.1	339.8	99.1
塩化メチレン	0	66.3	129.8	267.2	97.9

IPA；イソプロピルアルコール

CV；変動係数

幾何平均値（幾何標準偏差値）と最高，最小値で見た場合，幾何平均値（幾何標準偏差値）は 2.1 (1.668) mg/l，最高値は 5.0mg/l，最小値は 0.7mg/l であった．平均値±標準偏差値は 2.4±1.1mg/l であった．性別でみた場合，男性 17 名では，メタノールは幾何平均値（幾何標準偏差値）で 2.2 (1.775) mg/l，最高値で 5.0mg/l，最小値で 0.7 mg/l，平均値±標準偏差値では 2.5±1.4mg/l であった．一方，女性 29 名では，幾何平均（幾何標準偏差値）で 2.1 (1.619) mg/l，最高値が 4.3mg/l，最小値が 0.7mg/l で，平均値±標準偏差値は 2.3±1.0mg/l であった．尿中アセトンは幾何平均値（幾何標準偏差値）と最高値，最小値で見た場合，男性 17 名＋女性 29 名では幾何平均値（幾何標準偏差値）は 0.4 (1.831) mg/l，最高値は 1.0mg/l，最小値は 0.1mg/l であった．平均値±標準偏差値は 0.5±0.3mg/l であった．男性 17 名では幾何平均値（幾何標準偏差値）で 0.4 (2.050) mg/l，最高値で 1.0mg/l，最小値は 0.1mg/l であった．平均値±標準偏差値は 0.5±0.3 mg/l であった．女性 29 名では幾何平均値（幾何標準偏差値）で 0.4 (1.714) mg/l，最高値で 0.9mg/l，最小値で 0.1 mg/l であった．平均値±標準偏差値では 0.4±0.2mg/l であった（表 3）．尿中イソプロピルアルコールおよび塩化メチレンは，ともに検出限界値の 0.02mg/l 以下であった．また 4 溶剤とも有機溶剤非曝露者の尿中濃度のレベルに性差がみられなかった（ $p>0.1$ ）．

考 察

確立したガスクロマトグラフ同時測定法による 4 溶剤のメタノール，アセトン，イソプロピルアルコール，塩化メチレンの測定精度は，同時再現性，添加回収率，直線性とも全て良好であった．その内容を詳細にみた場合，

同時再現性試験では，4 溶剤で選定された濃度の全てが，変動係数 5% 以下の範囲にあった．添加回収試験では，回収率はメタノール，アセトン，イソプロピルアルコールではほぼ 100% であった．但し塩化メチレンは 97.9% でやや低目の値となった．サンプル作製時の過程において内部標準品を加えるが，同時に水も添加するため，その影響が若干でたのかもしれない．但し測定精度の視点から問題とならないと考える．直線性試験では，4 溶剤とも全て相関係数が 0.999 で危険率 1% 以下で有意性があった．メタノールでは最高 101.9mg/l，アセトンでは 484.6 mg/l，イソプロピルアルコールでは 339.8mg/l，塩化メチレンでは 267.2mg/l までの直線性が確認された．それ以上の濃度の直線性に関しては，今後の検討課題である．また，本測定法におけるサンプル作製は，尿検体または標準液に内部標準液と両親媒性の N, N-ジメチルホルムアミドを加えるだけの単純操作である事を強調したい．単純操作は，測定者の能力差を小さくでき，測定精度の面では向上に結びつく．また測定精度の向上のため，本研究では，測定用サンプルをガスクロマトグラフ装置に直接注入する方法を選択した．有機溶剤の測定方法では，溶剤を気化する気液平衡法³⁾⁴⁾が主流である．その測定過程においては，標的物質を含む溶液が入ったバイアルビンを加温するため，密封状態が悪いと標的物質が漏れ，測定精度に影響する．今回導入した直接注入法は，ガスクロマトグラフ装置への注入前には，標的物質を加温しないので，その様なことは起こらない．一方，N, N-ジメチルホルムアミドは除蛋白作用もあり，分離用カラムの劣化を防ぐ働きがある．経済的にみても有益である．本研究では，4 溶剤だけの検討であったが，今回確立した測定法の N, N-ジメチルホルムアミドの使用は，他の溶剤分析にも応用が可能であると考えられる．但し N, N-ジメチルホルムアミドのピークに重ならない溶剤が条件となる．確立された方法を応用した有機溶剤非曝露者の男女合計の尿中メタノールのバックグラウンドレベルは，幾何平均値（幾何標準偏差値）と最高値および最小値で見た場合，幾何平均値（幾何標準偏差値）で 2.1 (1.668) mg/l，最高値で 5.0mg/l，最小値で 0.7mg/l あった．男性，女性別にみてもほぼ同じ結果であった．尿中濃度の性差はなかった．本研究では，溶剤の分離用カラムとして高分離が期待さ

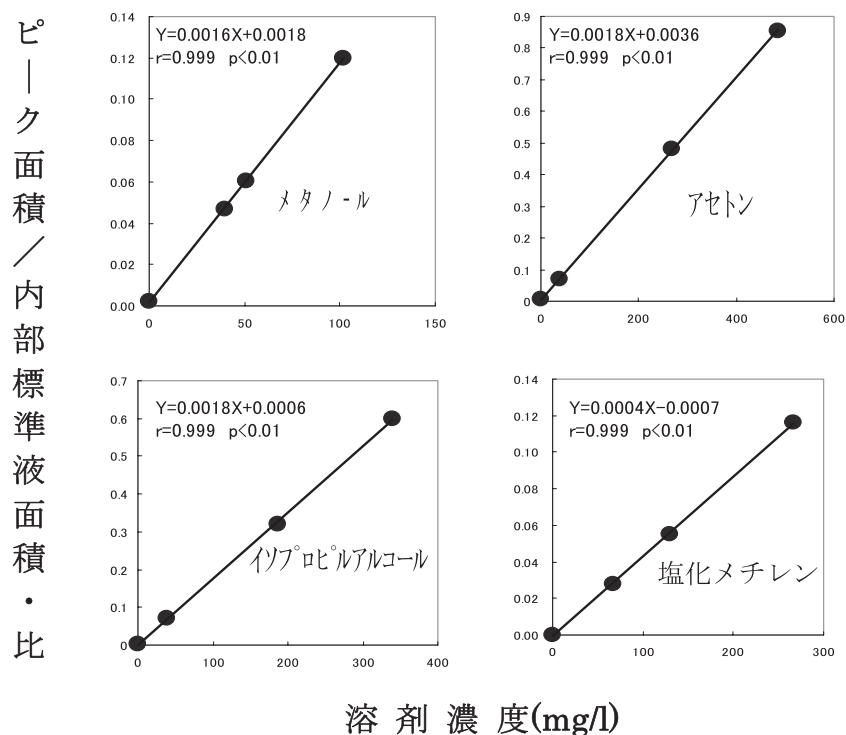


図4 溶剤毎の直線性

表3 尿メタノール、アセトンのバックグラウンドレベル (男性17名+女性29名)

メタノール (単位 mg/l)

性別	人数	AM	ASD	GM	GSD	最小値	最大値
男	17	2.5	1.4	2.2	1.775	0.7	5.0
女	29	2.3	1.0	2.1	1.619	0.7	4.3
男+女	46	2.4	1.1	2.1	1.668	0.7	5.0

性差なし (p > 0.1)

アセトン (単位 mg/l)

性別	人数	AM	ASD	GM	GSD	最小値	最大値
男	17	0.5	0.3	0.4	2.050	0.1	1.0
女	29	0.4	0.2	0.4	1.714	0.1	0.9
男+女	46	0.5	0.3	0.4	1.831	0.1	1.0

性差なし (p > 0.1)

AM : 平均 ASD : 標準偏差 GM : 幾何平均 GSD : 幾何標準偏差

れるキャピラリーカラムを使用した。その結果をみた場合、尿中メタノールのバックグラウンドレベルは、河合らが公表した幾何平均が2.0mg/l以下で、95%上限値が5.0mg/l以下の数値⁵⁾とほぼ同程度の数値となった。尿中アセトンのバックグラウンドレベルは、男女合計で幾何平均値(幾何標準偏差値)と最高値、最小値で見た場合、幾何平均値(幾何標準偏差値)で0.4(1.831)mg/l、最高値で1.0mg/l、最小値で0.1mg/lであった。男性、女性別にみてもほぼ同じ結果であった。尿中濃度の性差はなかった。河合らが公表した0.05mg/l以下~1.6mg/lの数値⁶⁾と Ghittori らが公表した0.1~1.43mg/lの範囲で、且つ幾何平均値が0.44mg/lで幾何標準偏差が1.95の数値³⁾のバックグラウンドレベルと今回のデータの数値を比較

すると、本研究結果はやや低くなっていた。一方、河合らは尿中アセトンについて、女性の方が男性より1.5倍高いことを報告⁶⁾しているが、その様な結果にはならなかった。尿中イソプロピルアルコール、塩化メチレンは、ともに検出限界値以下であり、既発表値⁴⁾⁶⁾と同じであった。有機溶剤非曝露者の尿中イソプロピルアルコール、塩化メチレン濃度の性差については、有意差がなかった(p>0.1)。

まとめ

水に対する可溶性と難溶性の溶剤を同時に測定する場合、測定精度の観点からは、ターゲットとする測定物質の状態が標準液や測定用サンプルの作製下では、溶質は

溶媒中において均一な状態が保持されなければならない。本研究では、標準液の作製および測定用サンプルの処理過程で両親媒性のN,N-ジメチルホルムアミドを使用する事で、メタノール、アセトン、イソプロピルアルコールおよび塩化メチレンを同時に含むサンプルを直接注入する測定精度の高いFID-ガスクロマトグラフ法を確立できた。尿中メタノール、アセトンの検出限界値は0.01mg/lで、イソプロピルアルコールと塩化メチレンは0.02mg/lであった(P/N=2)。応用として、有機溶剤非曝露者を対象として尿中のメタノール、アセトン、イソプロピルアルコール、塩化メチレンのバックグラウンドレベルを検討した。その結果、男女合計46名の尿中メタノール濃度は、幾何平均値(幾何標準偏差値)と最高値、最小値で見た場合、幾何平均値(幾何標準偏差値)は2.1(1.668)mg/l、最高値は5.0mg/l、最小値は0.7mg/lであった。尿中アセトンは幾何平均値(幾何標準偏差値)で0.4(1.831)mg/l、最高値は1.0mg/l、最小値は0.1mg/lであった。尿中イソプロピルアルコール、塩化メチレン濃度は検出限界値(0.02mg/l)以下であった。また4溶剤とも有機溶剤非曝露者の尿中濃度のレベルに性差はなかった($p>0.1$)。

本研究で確立した方法については、今後、メタノールやアセトンおよびイソプロピルアルコール、さらには塩化メチレンについて、単独または混合曝露する労働者に対する生物学的モニタリングへの応用が可能であるかを検討したい。

文 献

- 1) Ukai H, Okamoto S, Ikeda M, et al: Use of water-based solvent preparations in factories in Japan. *J Occup Health* 38: 124—127, 1996.
- 2) Ukai H, Inui S, Ikeda M, et al: Type of organic solvents used in small-to medium-scale industries in Japan; a nationwide field survey. *Int Arch Occup Environ Health* 70: 385—392, 1997.
- 3) Ghittori S, Maestri L, Marcell P, Imbriani M: Acetone in urine as biological index of occupational exposure to isopropyl alcohol. *Industrial Health* 34: 409—414, 1996.
- 4) Sakai T, Morita Y, Wakui C: Biological monitoring of workers exposed to dichloromethane, using head-space gaschromatography. *J Chromatogr B* 778: 245—250, 2002.
- 5) Kawai T, Yasugi T, Ikeda M, et al: Methanol in urine as a biological indicator of occupational exposure to methanol vapor. *Int Arch Occp Environ Health* 63: 311—318, 1991.
- 6) Kawai T, Yasugi T, Ikeda M, et al: Biological monitoring of occupational exposure to isopropyl alcohol vapor by urinary analysis for acetone. *Int Arch Occup Environ Health* 62: 409—413, 1990.

別刷請求先 〒981-8563 仙台市青葉区台原 4-3-21
東北労災病院検査部
井上 修

Reprint request:

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

**A Method of Using N,N-Dimethylformamido Followed by Gas Chromatograph
for the Simultaneous Determination of Urinary Methanol, Acetone,
Isopropyl Alcohol and Dichloromethane**

Osamu Inoue

Department of Medical Examination, Tohoku Rosai Hospital

In order to establish the simultaneous determination of urinary methanol, acetone, isopropyl alcohol and dichloromethane by FID-gas chromatograph equipped with NEUTRABOND-1 as a capillary column. N,N-dimethylformamid was applied as a solution when making standard solution and pretreated sample. one ml of urine sample or standard solution was transferred into a 10ml screw-capped glass tube, and added to 0.05% 1-butanol in water and 2ml of N,N-dimethylformamid. The tube was spun, and centrifuged at 3,000rpm for 10min. The supernate of 1 to 2 μ l was introduced into a FID-gas chromatograph. The column oven was heated at 40°C for 5min to 120°C at the speed of 15°C/min and to 200°C at the speed of 40°C/min. The detection and the injection port were heated at 200°C and 250°C respectively. The detection limit was 0.01mg/l for both methanol and acetone, and 0.02mg/l for both isopropyl alcohol and dichloromethane (Peak/Noise = 2). The reliability of the simultaneous determination on methanol, acetone, isopropyl alcohol and dichloromethane in urine has been confirmed by the examination of accuracy (recovery rate 97.9–100.2%), precision (coefficients variation below 4.5%), and linearity (All correlation coefficients were 0.999 ($p < 0.01$)). Background levels for methanol, acetone, isopropyl alcohol and dichloromethane in urine were studied in 46 non-exposed subjects (17 men and 29 women, aged 62 ± 15 years as mean $\pm$ standard deviation). Urinary methanol determined in 46 no-exposed subjects was present in all sample with a geometric mean of 2.1mg/l and a geometric standard deviation of 1.668. a minimum methanol concentration in urine was 0.7mg/l. a maximum methanol concentration in urine was 5.0mg/l. Urinary acetone was present with a geometric mean of 0.4mg/l and a geometric standard deviation of 1.831. a minimum acetone concentration in urine was 0.1mg/l. a maximum acetone concentration in urine was 1.0mg/l. No isopropyl alcohol and dichloromethane were detected in any of urine samples from the non-exposed subjects. With regard to urinary excretion on methanol, acetone, isopropyl alcohol and dichloromethane for no-exposed subjects, there was no significant difference between men and women ($p > 0.10$).

(JJOMT, 56: 229–234, 2008)