衛生化学
EISEI KAGAKU
26 (4) 181-185 (1980)

化学イオン化マスフラグメントグラフィーによる 尿中 N-ニトロソジメチルアミンの分析

瀬戸 博

東京都立衛生研究所環境保健部¹⁾

Determination of N-Nitrosodimethylamine in Human Urine by Chemical Ionization-Mass Fragmentography

HIROSHI SETO

Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health¹⁾

(Received February 29, 1980)

N-Nitrosodimethylamine (NDMA) in human urine was determined by chemical ionization-mass fragmentography (CI-MF), and the results were compared with those of thermal energy analyzer (TEA). Urine samples were extracted with dichloromethane and the concentrate was cleaned up on a silica gel column. CI-MF was very sensitive (detection limit was 1.2 pg at S/N=2) and the selectivity was comparable with that of TEA. NDMA levels in urine were ND-0.14 ppb. The values determined by CI-MF were similar to those by TEA, and this method was applicable to trace analysis of urinary NDMA with high sensitivity (above 0.002 ppb).

Keywords—gas chromatography; chemical ionization; mass fragmentography; human urine; N-nitrosodimethylamine; thermal energy analyzer; stable isotope

緒 言

N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) は発ガン性物質として知られており、近年、大気^{2,3)}、水⁴⁾、食品^{5,6)}、人の排泄物中^{7,8)} にその存在が確認されている。

尿中 NDMA は通常低濃度⁹⁾ ではあるが、ある程度負荷量を反映するものと思われる。しかし、基礎的なデータは少なく、高感度な分析法でないと NDMA の変動を

正確に把握することは難しいと考えられる。

NDMA の分析には熱エネルギー分析器 (thermal energy analyzer, TEA) が使用されている。²⁻⁸⁾ また、ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS) も使用されている^{3,9,10)} が最近では TEA が主流となっている。

TEA は、比較的簡便に取り扱え N-ニトロソ化合物をかなり選択的に、高感度に検出する有用な分析器である

- 1) Location: Hyakunincho 3-24-1, Shinjuku, Tokyo (東京都新宿区百人町3-24-1).
- 2) D.H. Fine, D.P. Rounbehler, N.M. Belcher, S.S. Epstein, *Science*, **192**, 1328 (1976).
- 3) D.H. Fine, D.P. Rounbehler, E.D. Pellizzari, *Bull. Environ. Contm. Toxicol.*, **15**, 739 (1976).
- 4) D.H. Fine, D.P. Rounbehler, A. Rounbehler, A. Silvergleid, E. Sawicki, K. Krost, G.A. DeMarrais, *Environ. Sci. Technol.*, **11**, 581 (1977).
- 5) T.A. Gough, K.S. Webb, R.F. Coleman, *Nature*, **272**, 161 (1978).
- 6) 真木俊夫, 田村行弘, 嶋村保洋, 小関正道, 西垣 進, 直井家寿太, 東京衛研年報, **30-1**, 145 (1979).
- 7) T. Kakizoe, T. Wang, V.W.S. Eng, R. Furrer, P. Dion, W.R. Bruce, *Cancer Res.*, **39**, 829 (1979).
- 8) T. Wang, T. Kakizoe, P. Dion, R. Furrer, A.J. Varghese, W.R. Bruce, *Nature*, **276**, 280 (1978).
- 9) E.D. Pellizzari, J.E. Bunch, R.E. Berkley, J.T. Bursey, *Biomed. Mass Spectrom.*, **3**, 196 (1976).
- 10) N.P. Sen, B.A. Donaldson, S. Seaman, J.R. Lyengar, W.F. Miles, "Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds," eds. by E.A. Walker, M. Castegnaro, L. Gričute, R.E. Lyle, IARC Scientific publications No. 19, Lyon, 1978, pp. 373-393.

が、同定手段としては不十分であり、また、NDMA の回収率に相当する適当な内部標準物質を欠いている。

一方、GC-MS は安定同位体を内部標準としたり、トレーサーとする実験には不可欠であり、化合物の同定にも極めて有力な情報を提供するが、一連の N-ニトロ化合物を一斉分析するには不向きである (NO^+ m/e 30 をモニターする場合を除く)。結局、両者は一長一短があり、相補的な分析器であると言えよう。

従来、GC-MS による NDMA の分析には電子衝撃イオン化法 (electron impact, EI) が使われていたが、選択性に問題があった。近年、普及しつつある化学イオン化法¹¹⁾ (chemical ionization, CI) は EI に比べ soft なイオン化法で対象とする化合物によっては感度、選択性とも数段向上することが期待される。

そこで今回、著者は GC-MS を用いて CI-マスフラグメントグラフィー (CI-MF) による尿中 NDMA の定量を試み、TEA および EI-MF による方法と比較し、より高感度で、選択性も十分満足のできる結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬および装置 ジクロロメタン (DCM)—関東化学特級品を蒸留し使用した。NDMA—和光純薬特級品 (99.5%) をそのまま使用した。NDMA 標準液—NDMA の約 74 mg を精秤し 100 ml の DCM で希釈し原液とした。次に DCM で適宜希釈し標準液を調製した。¹⁵N-ジメチルアミン・塩酸—Merk Sharp & Dohme Canada (95 atom % ¹⁵N)。¹⁵N-NDMA—¹⁵N-ジメチルアミン・塩酸より Dutton ら¹²⁾ の方法により合成した。DCM で抽出した後、GC-MS にて ¹⁵N-NDMA であることを確認した。次に TEA で定量し、原液の濃度を決定し、DCM で適宜希釈した。シリカゲル—和光純薬製ワコーゲル C-200 を 105°, 1 時間加熱し活性化した。他の試薬は特にことわりのないかぎり市販の特級品を使用した。

GC-MS—ヒューレットパッカード HP-5710A および日本電子 JEOL D-300 を使用した。動作条件は Table I に示した。データ処理は JMA-2000 データ処理システムを使用した。但し、マスフラグメントグラムは UV レコーダで記録した。

GC-TEA—島津 GC-6AM およびサーモエレクトロン TEA-502 を使用した。動作条件は Table II に示した。

2. 試料処理方法 医薬品を服用していない健康な

TABLE I. Operating Conditions for GC-MS

Equipment	: HP-5710A and JEOL D-300
Column	: 10% Versamide 900 on Chromosorb W (AW) 60—80 mesh, 6 feet × 2 mm i. d. glass
Column temp.	: 140°
Injection temp.	: 200°
Carrier gas	: He 30 ml/min
Separator temp.	: 200°
Ion source temp.	: 150—200°
Ionization voltage	: 70 eV (EI), 200 eV (CI)
Reagent gas	: NH_3 , CH_4 , iso- C_4H_{10} , press. $1-2 \times 10^{-5}$ Torr (ion source)

TABLE II. Operating Conditions for GC and TEA

Equipment	: Shimadzu GC-6AM and Thermo Electron TEA 502
Column	: 10% Versamide 900 on Chromosorb W (AW) 60—80 mesh, 3 m × 3 mm i. d. glass
Column temp.	: 200°
Injection temp.	: 220°
Carrier gas	: Ar 60 ml/min
TEA Pyrolyzer	: 450°
TEA Cold trap	: -35.6°
TEA Vacuum	: 1—2 mm Hg

成人男子 (30—35 歳) の尿を随時採取し、直ちに分析に供した。

定量—尿試料 100—300 ml に DCM 20 ml を加え 5 分間振とう後、DCM 層を分離、更に同様に 2 回抽出を行い DCM 層を集めた。エマルジョン処理は他の分液ロートに DCM 20 ml を新たにとり、これに集めたエマルジョン層を少しずつ加え振とう分離した。次に無水硫酸ナトリウム約 2 g を加えて脱水し、KD 濃縮器 (50 ± 1°) で 0.5 ml に濃縮した。更にシリカゲル 3.3 g を湿式法で充てんした内径 9.8 mm、長さ 30 cm の活栓付きガラスカラムで cleanup を行った。溶出溶媒は DCM 100 ml を使用し、毎分 4—5 ml の流速で流し、最初の 20 ml を捨て、次の 20 ml を NDMA 画分とした。(予備実験により NDMA は 25—35 ml の画分に溶出することを確認した。回収率 96%) 再び KD 濃縮器で 0.5 ml に濃縮して GC-TEA (10 μ l 注入) GC-MF (1—3 μ l 注入) 用試料とした。尿を一夜程度保存しても NDMA の生成は無視できる¹³⁾とされており、ニトロサミン生成阻害剤であるアスコルビン酸ナトリウムは加えなかった。また、抽出

11) M.S.B. Munson, F.H. Field, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2621 (1966).

12) A.M. Dutton, D.F. Heath, *J. Chem. Soc.*, 1892 (1956).

13) D.H. Fine, D.P. Rounbehler, E. Sawicki, K. Krost, *Environ. Sci. Technol.*, **11**, 577 (1977).

Fig. 1. Mass Spectra of NDMA 100 ng (GC-MS)

Reagent gas press.: 1.5×10^{-5} Torr; ion source temp. 175° .

濃縮の過程ではジメチルアミンと亜硝酸の存在によって NDMA の生成は無い¹³⁾ものとされている。

3. 回収率測定 添加回収率は、濃度既知の尿試料 100 ml, 300 ml に NDMA 100 ng を添加し、全操作終了後の濃度を TEA で測定し算出した。別に内部標準物質として ^{15}N -NDMA 20 ng を尿 100 ml に添加し、同様に全操作終了後の濃度を CI-MF で測定し算出した。

結果および考察

1. CI 反応条件の検討

イ 反応ガスの種類とそのスペクトル NDMA の EI および CI スペクトルを Fig. 1 に示した。いずれの反応ガスとも CI 反応を起こし、 QM^+ が観測された。アンモニアを反応ガスとした場合 $(\text{M}+\text{H})^+$ よりも $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$ が主であった。

ロ イオン源温度および圧力の影響 CI 反応はイオン源温度、反応ガス圧力などによって影響を受けやすい。イソブタンおよびアンモニアについてこれらの点を検討した。(Fig. 2, Table III) メタンの場合、試料注入回数が増えるにつれて分離が悪くなり実用的でなかった。これらの結果から反応ガスはイソブタンまたはアンモニアが良く、イオン源温度は 175° 、反応ガス圧力は

Fig. 2. Effect of Reagent Gas Pressure

NDMA injection 20 pg; MID gain 50
○: $\text{iso-C}_4\text{H}_{10}$ (200°), ●: NH_3 (150°).

TABLE III. Relative Sensitivities of Each Condition

IS temp. ($^\circ\text{C}$)	CI-MF ($\text{iso-C}_4\text{H}_{10}$)	CI-MF (NH_3)	CI-MF (CH_4)	EI-MF
150	96	76	—	—
175	106	100	a)	42
200	120	71	a)	—

Sensitivities relative to NH_3 as reagent gas at 175° assigned 100; IS: ion source; reagent gas press.: 1×10^{-5} Torr; —: not determined; a) separation and sensitivity were reduced with repeating injections.

1.5×10^{-5} Torr (イオン源ハウジング内圧力) が良いことがわかった。

2. 回収率

GC-TEA で測定した添加回収率 (40%) と CI-MF で測定した内部標準物質の回収率 (38%) とは比較的良い一致をみた。尿試料 300 ml からの回収率は 35% であった。回収率が悪いのは水中油滴型エマルジョンを形成し、分離が悪くなるためと思われる。Kakizoe ら⁷⁾によれば、尿試料 200 ml からの NDMA の添加回収率は 50% である。本法ではカラムクロマトグラフィーと KD 濃縮操作が一段づつ多いため、35—40% 程度に低下したのであろう。各操作での効率をみると KD 濃縮は 86%、カラムクロマトグラフィーは 96% であるから、結局、抽出操作での損失が大きく、試料状態によっては大きく変動することも予想される。その意味では ^{15}N -NDMA は理想的な内部標準物質と言えよう。N-ニトロソジプロピルアミンを内部標準としている例¹⁴⁾があるが、回収率が異なるのであまり意味がない。また、同一試料の測定

14) B. Spiegelhalder, G. Eisenbrand, R. Preussmann, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **17**, 29 (1978).

Fig. 3. Calibration Curves of Standard NDMA

Reagent gas, iso-C₄H₁₀ (1.5×10^{-5} Torr); ion source temp. 175°

○: MID gain 10, ●: MID gain 1.

値の再現性は変動係数 4.6% ($n=4$) であった。

3. 検量線および検出限界

反応ガスとしてイソブタンを使用した場合の検量線の一例を Fig. 3 に示した。アンモニアでも同様に 1 ng 程度まで良い直線が得られた (m/e 92)。絶対検出限界はイオン源温度 175°, 圧力 1.5×10^{-5} Torr でイソブタン, アンモニアのいずれの反応ガスでも 1.2 pg ($S/N=2$) で, 今回使用した TEA の 30–70 pg (仕様書では 1 ng で S/N 10 が標準とされている) に比べて約 25–60 倍高感度であった (Fig. 4)。他の報告でも TEA の検出限界は 34 pg,¹⁵⁾ 50 pg⁷⁾ 程度である (相対検出限界から算出した)。

4. 尿中 NDMA の実測例

既述の方法によって尿中 NDMA を測定した結果を Table IV に示す。この表より CI-MF による測定値と GC-TEA による測定値は、ピコグラムレベルとしては良く一致していることがわかる。尿中 NDMA の測定例は極めて少ないが、Kakizoe ら⁷⁾ の報告値 ND (<0.01)–0.1 ppb とほぼ同様の結果であった。今回の実験で確認された健康人の最低濃度は 0.002 ppb 以下で極めて低濃度であることが判明した。NDMA は体内で速やかに代謝されるとされており, 本実験結果もそれを裏付けるものと思われる。Kakizoe ら⁷⁾ は喫煙と尿中 N-ニトロサミンとの関連は見い出せなかったが, 膀胱ガンの患者で少数ではあるが, NDMA および N-ニトロソジブチルアミンが, 各々 0.32, 0.70 ppb および 0.35, 0.66 ppb

Fig. 4. CI Mass Fragmentogram of NDMA and Urine Extract (iso-C₄H₁₀ m/e 75)

Operating conditions: ion source temp. 175°; ion source press. 1.5×10^{-5} Torr; MID gain, urine sample 20, standard and solvent 50.

TABLE IV. Urinary NDMA Concentration (ppb), Comparison of Results obtained by GC-TEA and CI-MF

Doner	GC-TEA ^{a)}	CI-MF (NH ₃) ^{a)}	CI-MF (iso-C ₄ H ₁₀) ^{a)}
A	0.14	0.07	0.10
B	ND ^{e)}	0.01	0.02
C	ND ^{e)}	0.01	0.02
D	0.04	0.01	0.02
E	0.04	0.04	0.02
F	0.11 ^{b)}	0.14	—
G	ND ^{e)}	ND ^{e)}	0.007
H	ND ^{d)}	ND ^{f)}	0.002

All values were corrected with recovery efficiency.

a): after cleaned up on a silica gel column.

b): before cleaned up on a silica gel column.

c): <0.04 , d): <0.01 , e): <0.005 , f): <0.002 .

ND: not detectable; —: not determined; sample size: A–G 100 ml, H 300 ml.

と高かったことを報告している。今後 NDMA の尿への排泄状態と負荷量および病態との関係を知る上で本法は極めて有用であろうと思われる。

CI-MF ではカラムクロマト操作によって cleanupしないと不純物による妨害を受けた。一方, EI-MF では cleanup した抽出液でも NDMA の付近に妨害ピークが, 2, 3 出現し測定できなかった。¹⁶⁾ CI-MF で検出されたピークはブラックライト (BLB, 放射 λ max 352 nm) の照射によって消滅し, NDMA であることが裏付けられた。これは紫外線により N-NO 結合が切断され

15) M.D. Gomez, P.F. Swann, P.N. Magee, *Biochem. J.*, **164**, 497 (1977).

16) 低分解能 EI-MF で m/e 74 の M⁺ イオンをモニターした。

る¹⁷⁾ためとされ、Wang ら^{8,18)}は同定の一手段としてあげている。尿中 NDMA は超微量であり、高分解能 GC-MS による確認は不可能であった。本実験においては (1) CI-MF で m/e 75 (イソブタン), m/e 92 (アンモニア) のピーク出現位置が標品と一致したこと, (2) 上記ピークは紫外線照射 (BLB) により消滅すること, (3) GC-TEA の測定値と良く一致すること, の3点をもってこれを NDMA としたが, 今後さらに同定法を検討する必要もあろう。

最近の GC-MS では, EI-MF でも CI-MF でもピコグラムオーダーの検出が可能である。しかし, 低分解能 MF では, 他物質からのイオンにより妨害される可能性がある。EI ではフラグメントイオンが CI に比べて多いので特に低分子量領域で妨害の程度が高いと思われる。事実, 本実験でも簡単なカラムクロマト操作のみでは EI-MF は使用不可能であった。Sen ら¹⁰⁾は GC-MS の選択性をあげるため高分解能 EI-MF により M^+ または NO^+ をモニターし定量している。彼らの方法は選択性に優れてはいるが, 技術的に難しく, まだ一般的ではないと思われる。また, 高分解能条件では通常感度が大幅に低下する点も不利と思われるが, Sen ら¹⁰⁾は 100 pg が検出可能としている。本実験は尿中 NDMA の測定のため, これらの難点の改善を目指したものであるが,

CI-MF は感度は高いが, 選択性は不十分でカラムクロマトグラフィーなどの前処理が必要であることが判明した。

結 語

CI-MF による尿中 NDMA の定量を行い GC-TEA と比較検討した。その結果, CI-MF は GC-TEA および EI-MF よりも高感度で適当な clean up を行えば選択性も改善され, 尿中 NDMA の測定が十分可能であった。一方, 低分解能 EI-MF では妨害ピークにより測定不可能であった。CI-MF による尿中 NDMA の濃度は ND (<0.002)—0.14 ppb で既報の結果と一致した。本法は GC-TEA に比較し, 25—60倍高感度であることから少量の生体試料, 海水, 河川水または安定同位体を使用するトレーサー実験などの分析にも応用可能と思われる。しかし, CI-MF も選択性は完全でなく, 他の妨害物質の存在を確かめ, できればキャピラリーカラムを使用し, 測定値は TEA と比較するなど慎重に検討することが必要であろう。

謝辞 本研究に当たり, 御助言御援助をいただいた東京都立衛生研究所・秋山和幸博士に深謝いたします。また, GC-TEA の測定技術等多くの御援助をいただいた同所・真木俊夫氏に深謝いたします。

-
- 17) J. Sander, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 852 (1967).
18) R.C. Doerr, W. Fiddler, *J. Chromatogr.*, **140**, 284 (1977).