

図18 ラット肝ミクロソームより得られた未知代謝物のマスペクトル

更に念のため、ラット肝ミクロソームによる triazolam の代謝実験で検出された 3 種の代謝物を無水酢酸とピリジンを用いてアセチル化した。その結果を図 19 ~ 21 に示す。

In vitro 代謝実験から得られた 1-hydroxymethyltriazolam 及び 4-hydroxytriazolam のアセチル体は、それぞれ 11.49 min, 11.27 min に溶出し、共に $[M+H]^+ = 401$ が検出され、標品のアセチル化により得られたものと溶出時間、マススペクトルのパターンが完全に一致した (図 19 ~ 20)。一方、1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam のアセチル体と思われるピークは 15 min 付近に溶出し、 $[M+H]^+ = 459$ が検出されたことから (図 21)、先に毛根より確認された未知物質の構造が、1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam であることが確実となった。

以上の結果から、DA ラット体毛および毛根には、未代謝の triazolam の他に、1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam, 1-hydroxymethyl-4-hydroxytriazolam が排泄されていることを確認した。これまで、実験動物を含めた体毛および毛髪中にこれら一連の化合物が検出されたという報告はなく新規な知見である。本法は、操作法が簡便である上、高感度検出が可能であり、ヒトの毛髪分析にも応用できる有用な方法であると思われる。今後はヒト毛髪の詳細な解析と毛髪診断への可能性を検討する予定である。

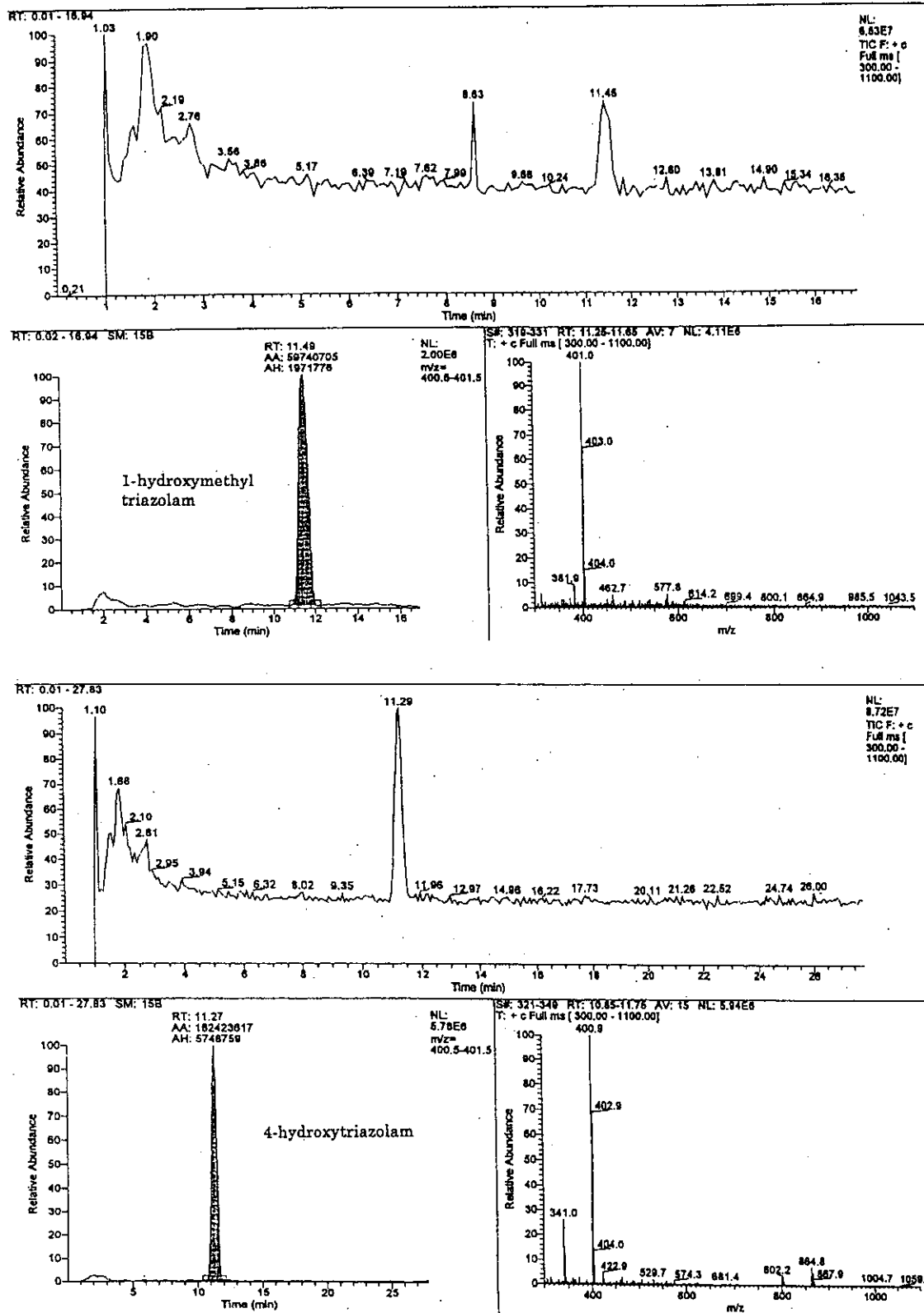


図 19 標品 (1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam) のアセチル体のマススペクトル

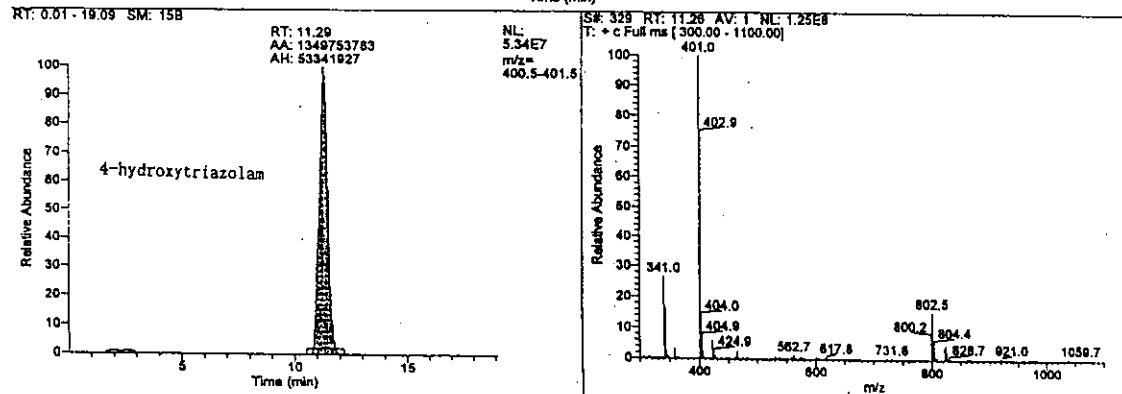
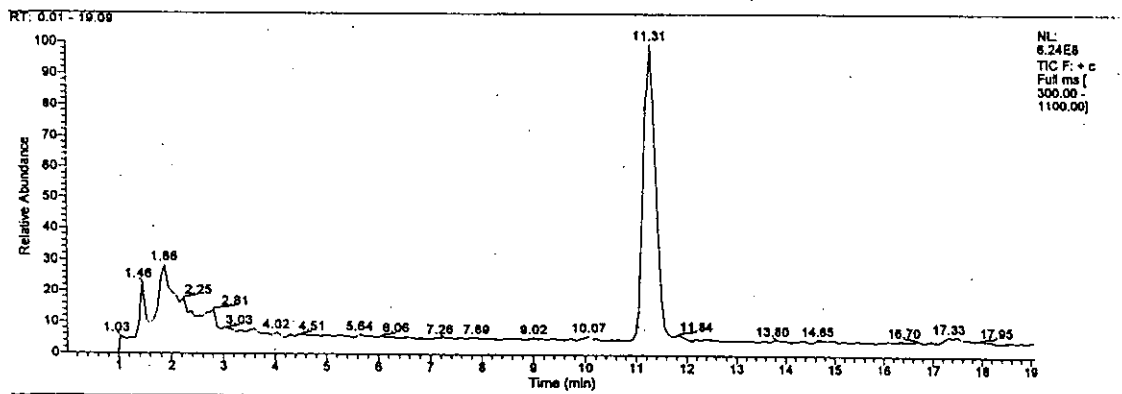
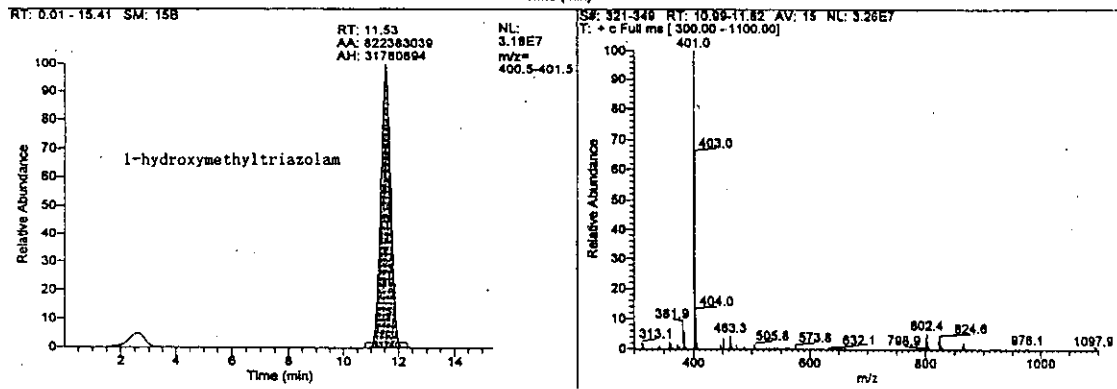
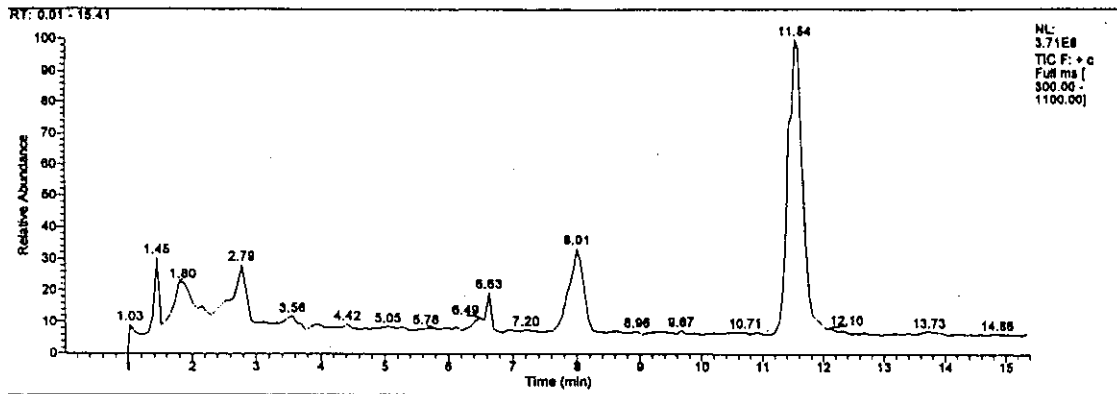


図 20 ラット肝ミクロソームより得られた代謝物 (1-hydroxymethyltriazolam, 4-hydroxytriazolam) のアセチル体のマススペクトル

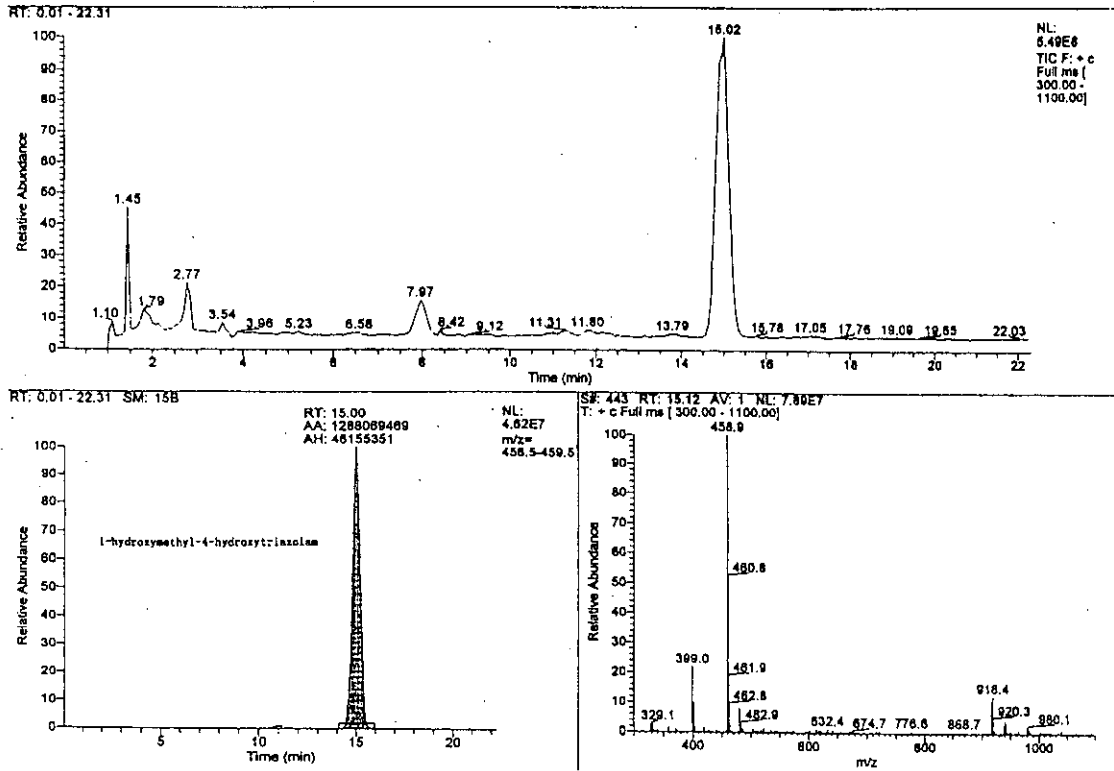


図 2 1 ラット肝ミクロソームより得られた未知代謝物のアセチル体の
マススペクトル

4. 参考文献

- [1] Bixler, E.O., Kalis, A., Manfredi, R.C., *Lancet*, 337, 827 (1991).
- [2] Marris, H.H., Estes, M.L., *JAMA*, 258, 945 (1987).
- [3] *FDA Med. Bull.*, 22, 7 (1992).
- [4] Baktir, G., Fisch, H.V., Huguenin, P., Bircher, J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 24, 195 (1983).
- [5] Robins, A.J., *Bull. Int. Assoc. Forens. Toxicol.*, 20, 18 (1990).
- [6] Sunter, J.P., Bal, T.S., Cowan, W.K., *Br. Med. J.*, 297, 719 (1988).
- [7] O'Dowd, J.J., *Br. Med. J.*, 297, 1048 (1988).
- [8] Olson, K.R., Yin, L., Osterich, J., Tani, A., *Am. J. Emerg. Med.*, 3, 210 (1985).
- [9] Skinner, M.H., Thompson, D.A., *South. Med. J.*, 85, 1207 (1992).
- [10] Eberts, Jr., F.S., Philopoulos, Y., Reineke, L.M., Vliek, R.W., *Clin. Pharm. Ther.*, 29, 81 (1981).
- [11] Coassolo, P., Aubert, C., Cano, J.P., *J. Chromatogr.*, 274, 161 (1983).
- [12] Inoue, T., Suzuki, S.I., *J. Chromatogr.*, 422, 197 (1987).
- [13] Dixon, R., Lucek, R., Young, R., Ning, R., Darragh, A., *Life Sci.*, 25, 311 (1979).
- [14] Fraser, A.D., *J. Anal. Toxicol.*, 11, 263 (1987).
- [15] Jolly, M.E., *J. Anal. Toxicol.*, 5, 236 (1981).
- [16] de Bruyne, M.M., Sinnema, A., Verweij, A.M., *Forens. Sci. Int.*, 24, 125 (1984).
- [17] Konishi, M., Mori, Y., Hirai, K., *J. Chromatogr.*, 229, 355 (1982).
- [18] Moore, B., Nickless, G., Hallett, C., Howard, A.G., *J. Chromatogr.*, 137, 215 (1977).
- [19] Sumirtapura, Y.C., Aubert, C., Coassolo, P., Cano, J.P., *J. Chromatogr.*, 232, 111 (1982).
- [20] Weijers-Everhard, J.P., Wijker, J., Verrijik, R., Van Rooij, H.H., Soudijn, W., *J. Chromatogr.*, 374, 339 (1986).

厚生科学研究

薬物中毒，薬害，農薬中毒等の予防と原因解明のための
毛髪診断研究

分担研究 毛髪からのパラコート分析

平成10年度研究報告書

日本医科大学法医学教室

大野曜吉

仁平 信

林田真喜子

目次

[1] 血清など生体試料からのパラコート分析法

【症例】

【試料】

【方法】

【結果ならびに考察】

1. 標準パラコートのHPLC測定
2. 血清など生体試料中パラコートの分析

[2] 液体クロマトグラフィ質量分析法を用いた毛髪からのパラコート分析

【試料】

【方法】

【結果ならびに考察】

1. 標準パラコートのLC/MS分析
2. 毛髪のLC/MS分析
 - 2-1. ラット毛髪(毛髪試料B,C)のLC/MS分析
 - 2-2. パラコート投与ラット毛髪(毛髪試料A)のLC/MS分析

[3] 高速液体クロマトグラフィを用いた毛髪からの微量パラコート分析

【試料】

【方法】

【結果ならびに考察】

1. 微量パラコートの検量線作成
2. 毛髪からのパラコート抽出のための試料前処理法
 - 2-1. 毛髪からのパラコート抽出
 - 2-2. 毛髪抽出物の精製法
 - 2-3. 毛髪からの低濃度パラコート回収
3. パラコート投与ラット毛髪中パラコート分析
4. 総合考察
5. 参考文献

我が国の農薬中毒の中で地域差はあるものの、パラコート中毒は依然として高頻度で認められるものである。大量服用の場合、腎・肝・心・肺に対し毒性を発現し死に至るが、Proudfootの生存曲線が未だ有効で、解毒剤もなく悲惨な転帰をむかえる。18日を超えて生存後死亡した様な場合、剖検時の臓器の分析結果が陰性を示すことがある。このような場合、毛髪への薬毒物の移行が認められるものであるならば、毛髪中の薬毒物の検出により、生前の薬毒物中毒の証明の有効な手段となる。また、毛髪は腐敗にも強く、毛髪からの薬毒物の検出は、死因の究明ばかりでなく個人識別の手段としても有効となろう。

そこで、今回は、パラコートの毛髪への取り込みに関する研究の一環として、微量パラコート分析法の検討を主としておこなった。

[1] 血清など生体試料からのパラコート分析法

【症例】

患者(78歳男性)は自殺企図でパラコート/ダイコート合剤マイゼットを飲用(量は不明)したものの直ちに家族に発見され、自家用車にて最寄りの消防署に運ばれた後、日本医科大学付属千葉北総病院救命救急部に搬送された。パラコート/ダイコート合剤飲用から入室まで40分であったことが確認された。患者は搬送中に緑色の胃内容物を嘔吐。入室時の意識は清明で、ただちに血液浄化法による治療がおこなわれたが、臨床症状が回復せず、入室12日後に死亡した。

【試料】

上記症例より得られた血清・尿・胃内容物で、血清ならびに尿で、試料は死亡まで経時的に採取された。

【方法】

試料は鹿毛らの方法に準じてSep-Pak C₁₈カートリッジ(Waters, 充填量360mg)で前処理後、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で測定した(Fig. 1)。条件はJasco PU-980, CO-965, UV-970, カラムはInertsil ODS-2 (5mm, 25cm×4.0mm I.D.), 移動相は0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)+0.05%ペンタフルオロ酪酸(PFBA) +0.1%トリエチルア

ミン(TEA)で、流速0.8ml/min、カラム温度30℃、検出波長はUV260nm(パラコート), UV310nm(ダイコート), External Standard(ES)として50mMイソニコチン酸を用いた。

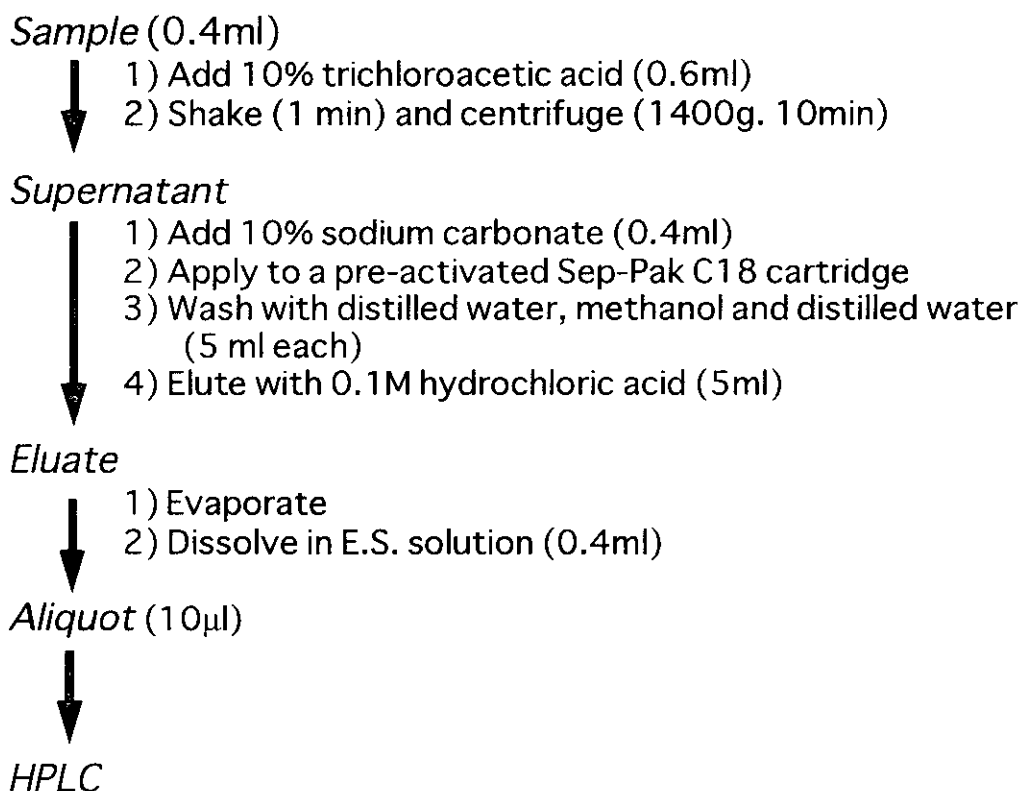


Fig.1 血清パラコート抽出のための前処理法

【結果ならびに考察】

1. 標準パラコートのHPLC測定

今回のHPLC条件では、パラコートはRetention Time(RT)=7.79に、イソニコチン酸(ES)はRT=4.03に、ダイコートはRT=5.73に、それぞれ単独のピークとして検出された(Fig.2).

50mMイソニコチン酸をESとした標準パラコート希釈液の検量線は、0.5-10,000ng/mlの範囲で直線性が認められた($r^2=0.999$)(Fig.3).

検出限界は5-10ng/ml, 1000ng/mlにおける再現性はCV値3-5%であった。

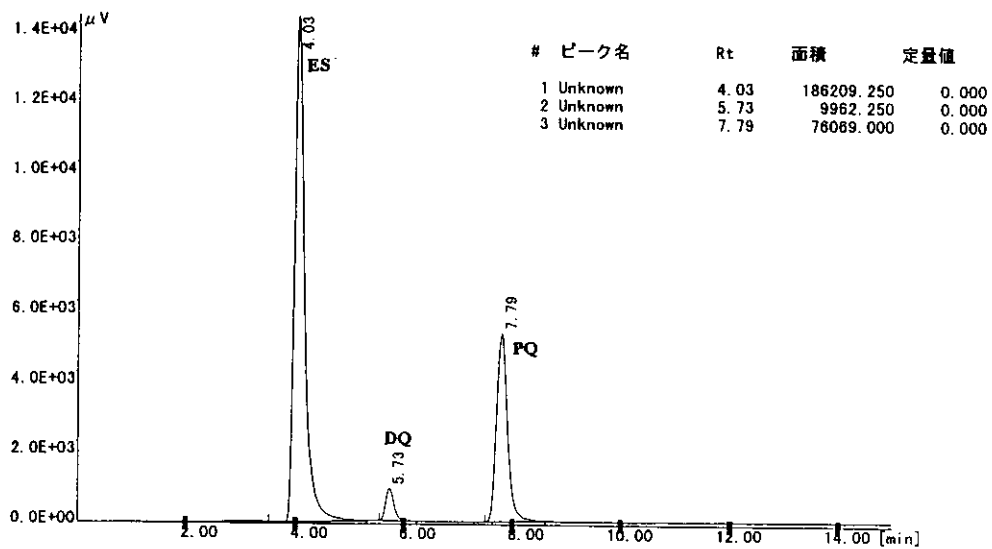


Fig.2 標準パラコート(2.5ng), ダイコート(2.5ng), イソニコチン酸(ES)のHPLCクロマトグラム

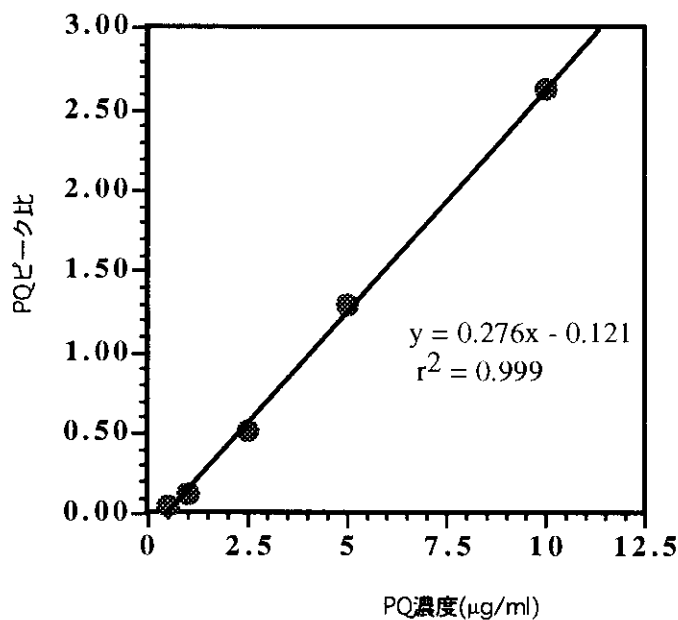


Fig.3 50mMイソニコチン酸を用いたパラコート検量線(0.05-10mg/ml)

2. 血清など生体試料中パラコートの分析

患者の入室時の血清・尿・胃内容物のSep-Pak C₁₈抽出物のHPLCクロマトグラムか

ら、パラコートはRT=8.12付近に、イソニコチン酸(ES)はRT=4.10付近に、ダイコートはRT=5.95付近に、それぞれ単独のピークとして検出された(Fig.4-6). 生体試料中のパラコートは、標準パラコートに比べて、ややRTが増加する傾向であったが、RT=8.12のピークがパラコートであることは添加法で確認した.

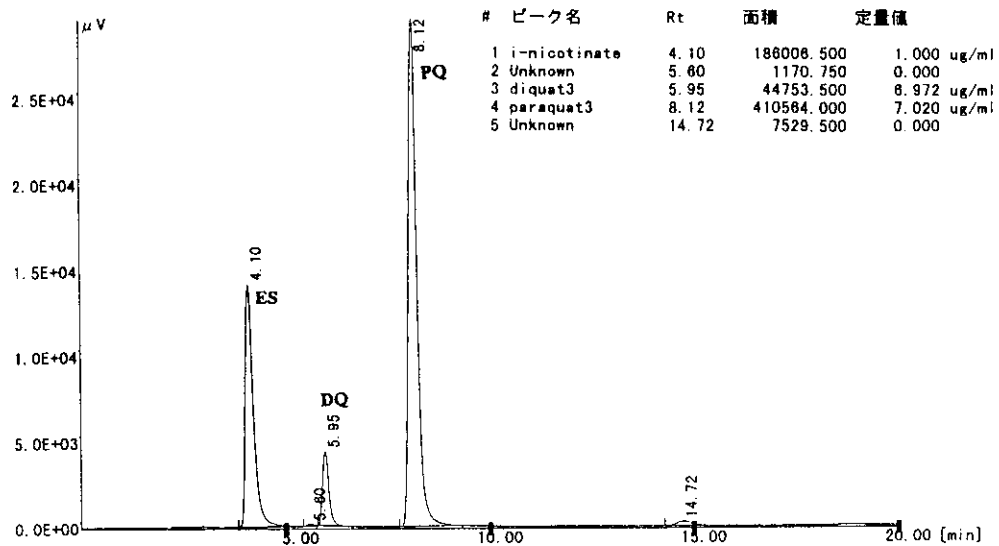


Fig.4 患者試料, 入室時血清のSep-Pak C₁₈抽出物のHPLCクロマトグラム
10%トリクロル酢酸で除蛋白後, Sep-Pak C₁₈カートリッジで前処理. UV260nmで測定.

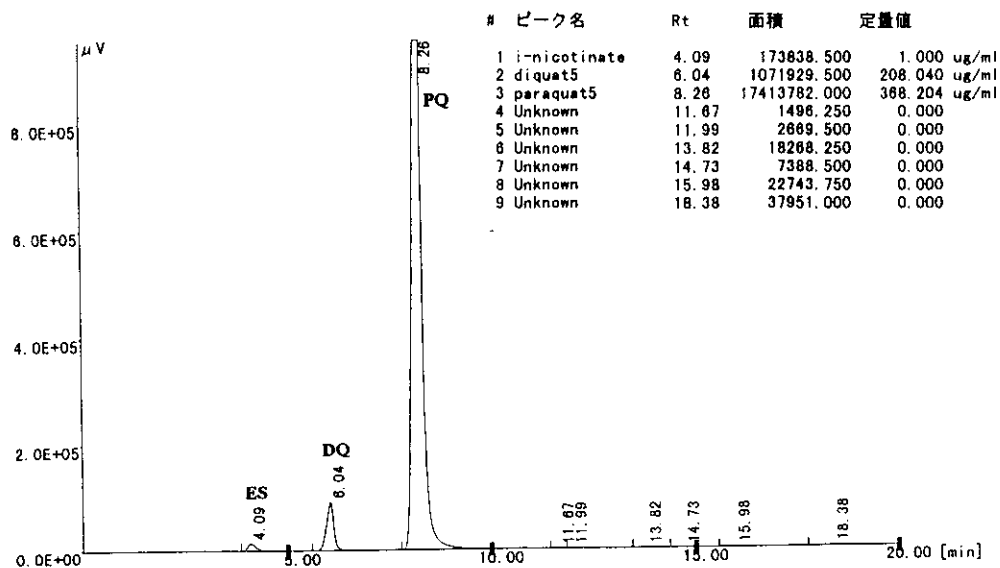


Fig.5 患者試料, 入室時尿のSep-Pak C₁₈抽出物のHPLCクロマトグラム
10%トリクロル酢酸で除蛋白後, Sep-Pak C₁₈カートリッジで前処理. UV260nmで測定.

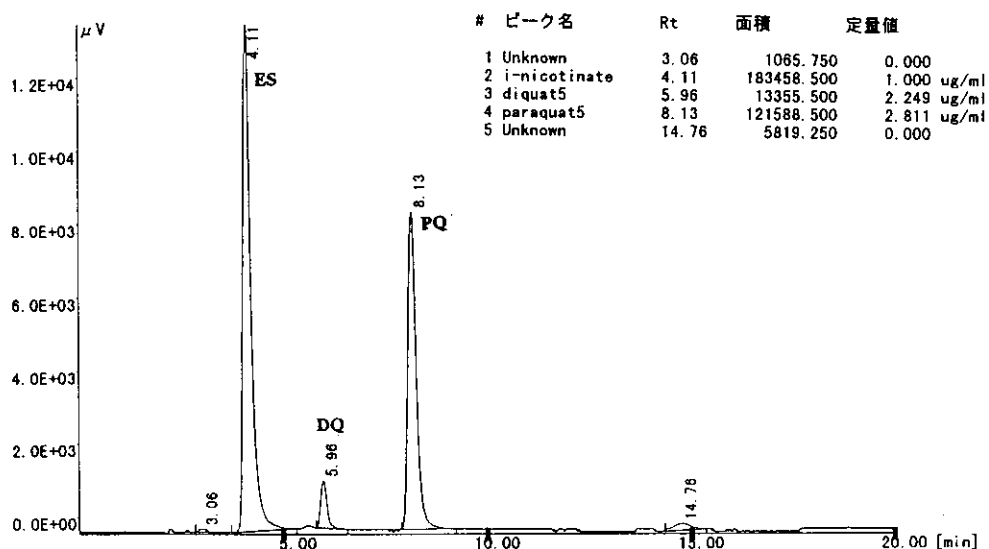


Fig.6 患者入室時胃内容物(×1000)のSep-Pak C₁₈抽出物のHPLCクロマトグラム
10%トリクロル酢酸で除蛋白後, Sep-Pak C₁₈カートリッジで前処理, UV260nmで測定.

患者試料の入室時パラコート濃度は, 血清7.0μg/ml, 尿368.2μg/ml, 胃内容物は2811.0μg/ml, 入室時ダイコート濃度は, 血清14.0μg/ml, 尿240.5μg/ml, 胃内容物は2908.0μg/mlであった(Table 1). 血液浄化法の治療を開始するまでに, 血清ならびに尿中パラコート, ダイコート濃度は入室時の約50%に低下し, 治療開始4時間(入室後312分)では入室時の約10%以下までに低下し, パラコート, ダイコートともに急速な体外排泄を示した(Fig.7).

Table 1 患者入室時のパラコートならびにダイコート濃度

| | 血清 | 尿 | 胃内容 |
|-------|------|-------|--------|
| パラコート | 7.0 | 368.2 | 2811.0 |
| ダイコート | 14.0 | 240.5 | 2908.0 |

単位はμg/ml

飲用後早期に救急医療を受け, パラコート, ダイコートの体外排泄がなされていたにもかかわらず, 患者の予後は悪かったことから, パラコート/ダイコート合剤中毒の toxico-kinetics 解明の重要性があらためて示唆された.

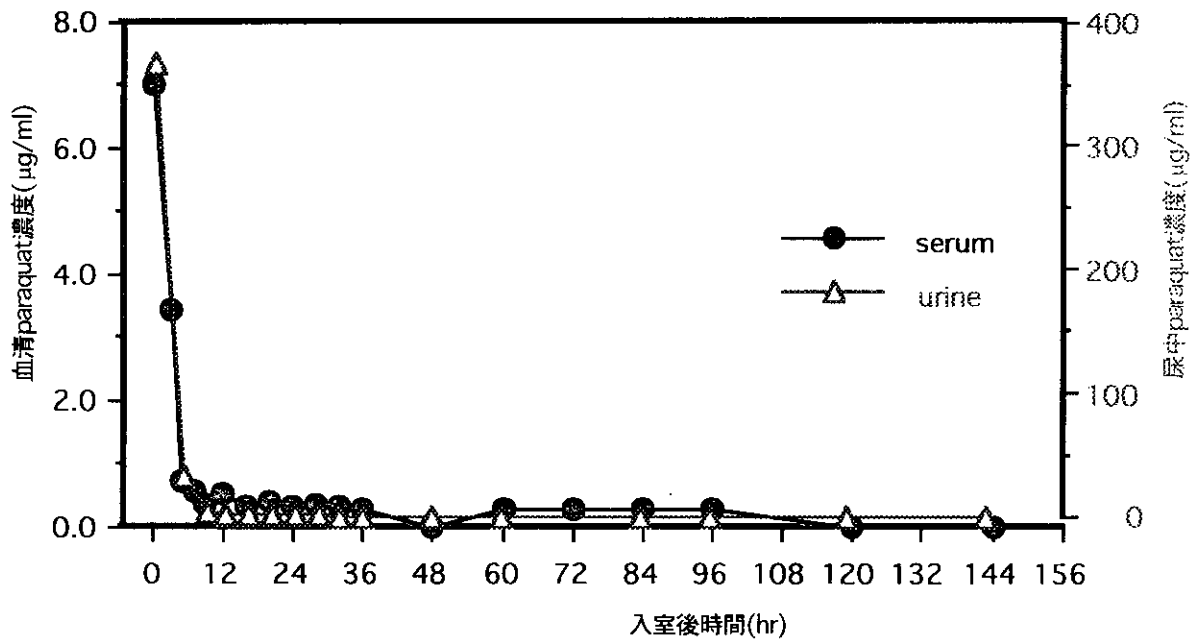


Fig.7 患者血清ならびに尿中パラコート濃度の経時変化

[2]液体クロマトグラフィ質量分析法を用いた毛髪からのパラコート分析

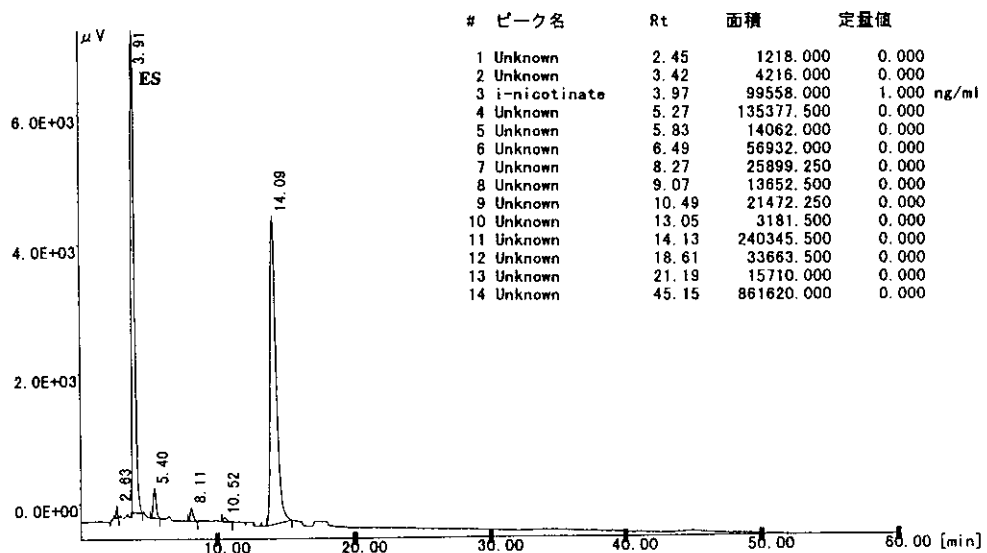


Fig.8 パラコート投与ラット毛髪(MeOH-HCl/Sep-Pak C₁₈抽出物)のHPLC
 パラコート投与ラット毛髪(40mg/kg, oral, 5day, 30min)を2.5mg秤量し, MeOH-5N HCl (20:1)2mlを加え2hr超音波処理. Sep-PakC₁₈で前処理後, エバポレータにて蒸発乾固. UV260nmで測定.

前章[1]の方法, すなわちSep-Pak C₁₈抽出物を用いて, パラコート投与ラット毛髪(後述)からのパラコート分析を試みたが, HPLCクロマトグラム上でパラコートのピークは検

出されなかった(Fig.8). 次に, Sep-Pak C₁₈カートリッジによる前処理をおこなわずに MeOH-5N HCl(20:1)抽出のみでHPLC分析を試みたところ, HPLCクロマトグラム上でパラコートのピーク(RT=7.43) がごく小さなピークとして検出された(Fig.9).

そこで, 選択的検出ならびに感度の増大が期待される液体クロマトグラフィ質量分析法(LC/MS)によるパラコート投与ラット毛髪からのパラコート分析について検討した.

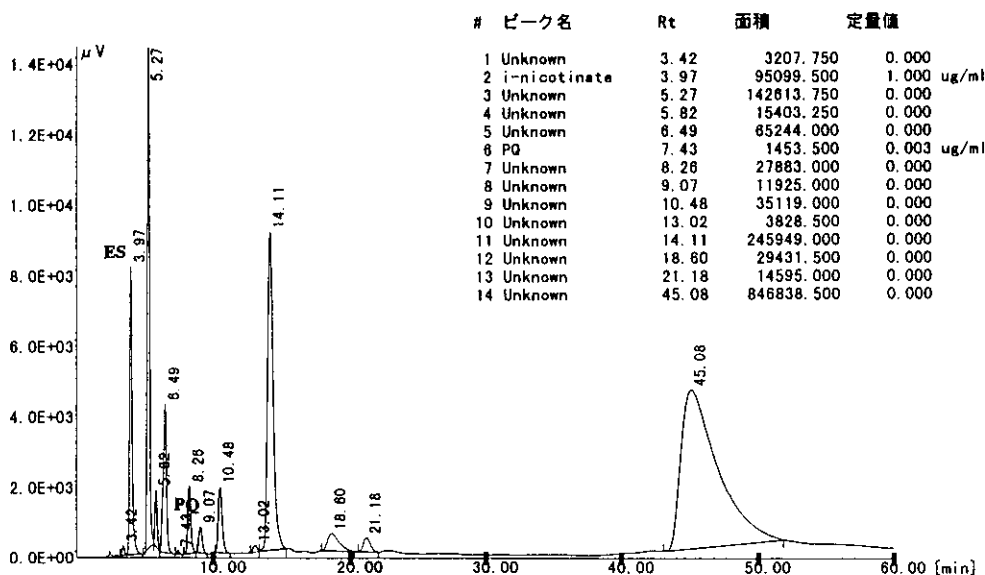


Fig.9 パラコート投与ラット毛髪のMeOH-HCl抽出物のHPLCクロマトグラム
 パラコート投与ラット毛髪(40mg/kg, oral, 5day, 30min)を2.5mg秤量し, MeOH/5N HCl(20:1)2mlを加え2hr超音波処理. 窒素気流にて蒸発乾固. UV260nmで測定.

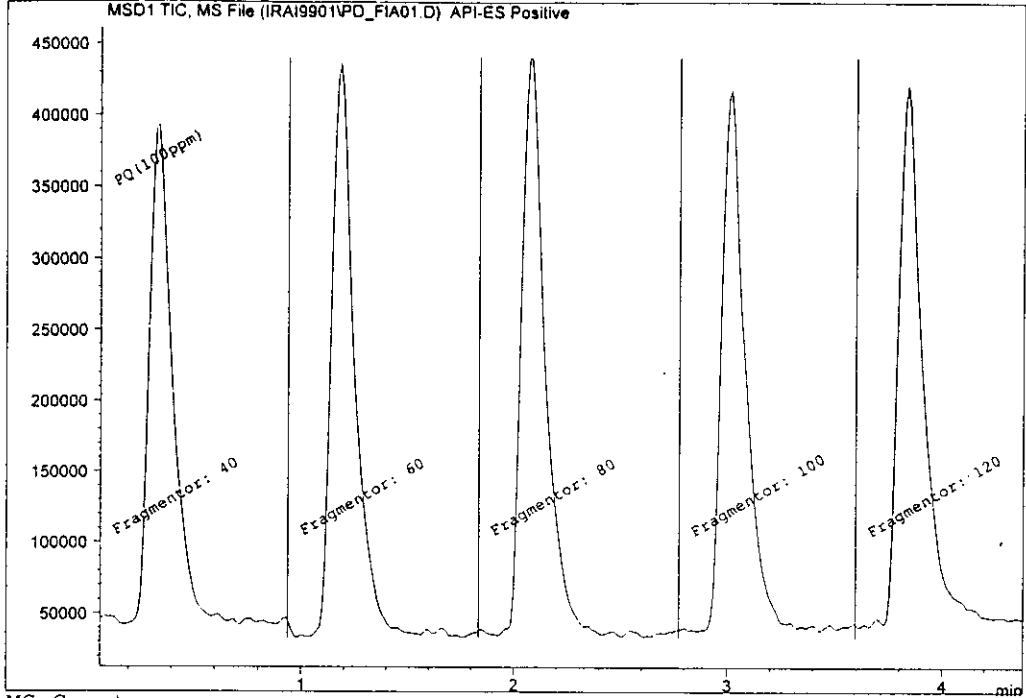
【試料】

試料は, DAラット(male, 5W, 90-100g)にパラコート40mg/kgを1日1回, 5日間経口投与し, 5日目の投与30分後に毛根から採取したラット毛髪(毛髪試料A), あるいは洗浄済みのDAラットblank毛髪(毛髪試料B), 毛髪試料Bに既知量のパラコートを添加したもの(毛髪試料C)とした.

【方法】

1. 毛髪試料A, 毛髪試料B, パラコート50, 200, 500, 1000ngを添加した毛髪試料Cに, MeOH-5N HCl (20:1)を2ml加え2時間超音波にて抽出後, ろ過して毛髪を取り除いたろ液を窒素気流にて蒸発乾固した. 蒸留水0.1mlに溶解し2μlをLC/MSに注入.
2. パラコート1000ngを添加した毛髪試料Cに, MeOH-5NHCl (20:1)を2ml加え2時間超音波にて抽出後, 窒素気流にて蒸発乾固後, 10%炭酸ナトリウム(pH11)に溶解し, あらかじめ蒸留水, MeOHで活性化したSep-Pak C₁₈カートリッジにapplyした. カートリッジを蒸留水 5ml, MeOH 5ml, で順次洗浄した後, 0.1N HCl 5mlで溶出し, エバポ

Current Chromatogram(s)



MS Spectrum

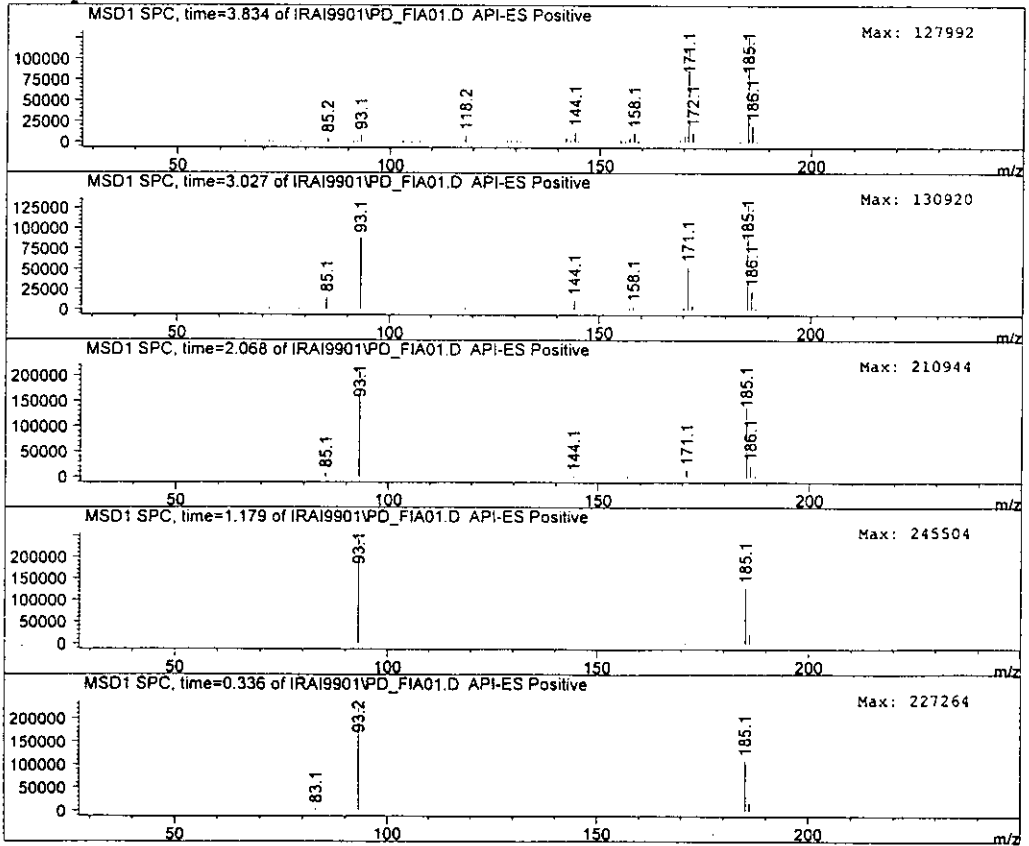


Fig.10 パラコートm/z=185イオンとフラグメント電圧

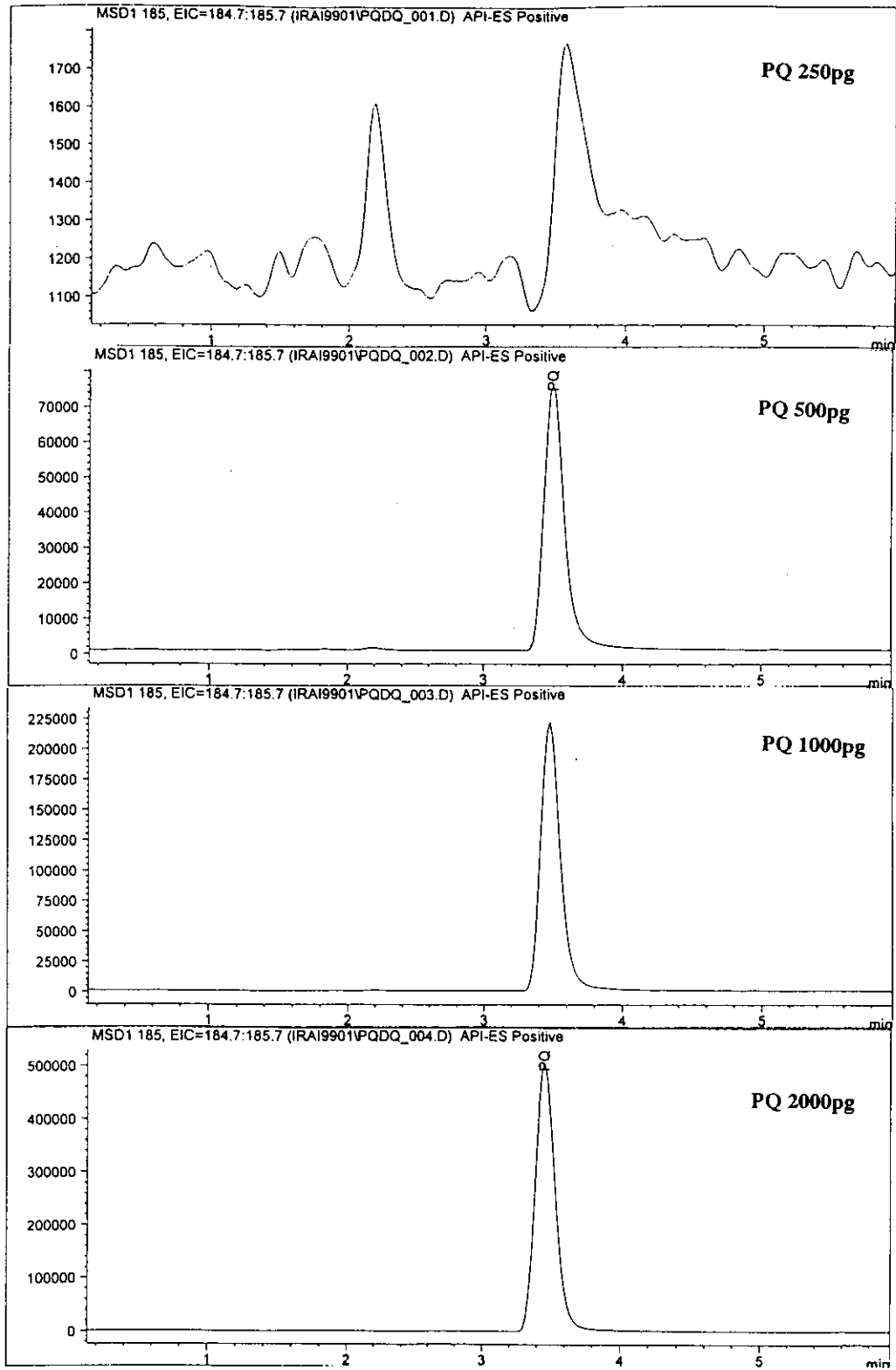


Fig.1 1 パラコート250-2000pgのSIMクロマトグラム(m/z=185)

レータで蒸発乾固したものを蒸留水0.1mlに溶解して、2 μ lをLC/MSに注入。

LC/MSの測定条件としては、装置はHewlett Packard HP1100/MSDで、HPLCカラムはZorbax C18 (3 μ m,10cm \times 2.0mmI.D.), 移動相はMS7(イオンペア剤, GL Science製)/CH₃CN(60:40)で、流速0.2ml/min, カラム温度40 $^{\circ}$ C, MSD mass rangeはm/z 50-500, イオン化法はAPI-ES(ESI), positiveモード, ネブライザは窒素ガス, 12L/min, 350 $^{\circ}$ Cで、フラグメント電圧は120Vで行なった。

【結果ならびに考察】

1. 標準パラコートのLC/MS分析

パラコートの分子イオン(M-1)に相当するm/z=185は、フラグメント電圧120Vで最適のイオン強度を示した(Fig.10)。今回のLC/MS条件では、SIMクロマトグラム(m/z=185)からは、RT=3.5付近にパラコートのピークとして検出された(Fig.11)。

m/z=185のSIMモードにおけるパラコートの検量線は、100-1000ng/mlの範囲で直線性が認められた($r^2=0.99263$)(Fig.12)。

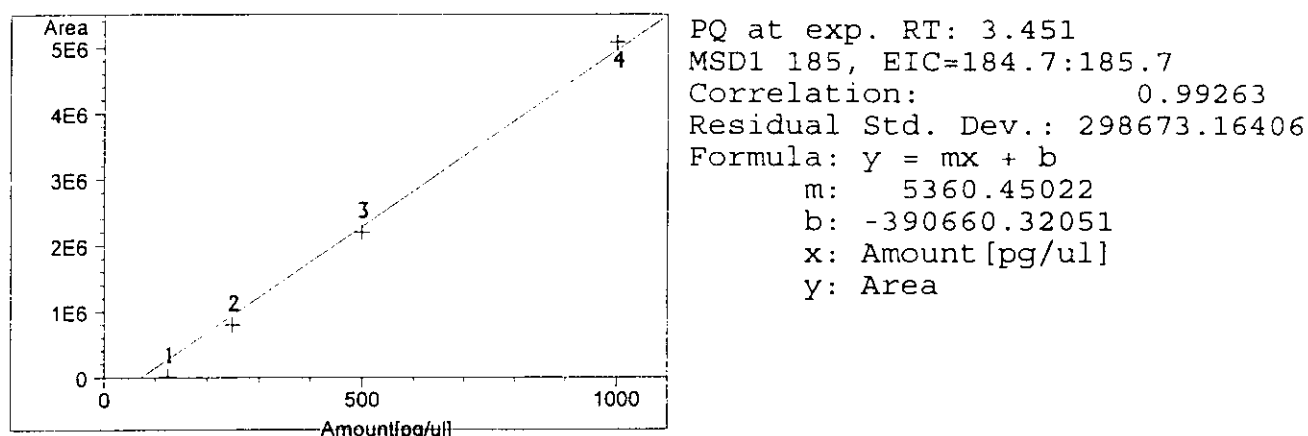


Fig.12 パラコートのSIMモード(m/z=185)を用いた検量線(100-1000ng/ml)

2-1. ラット毛髪(毛髪試料B,C)のLC/MS分析

パラコート50, 200, 500, 1000ngを添加した毛髪試料CのMeOH-HCl抽出物のSIMクロマトグラム(m/z=185)からは、RT=3.6付近にパラコートのピークが検出された

(Fig.13).

毛髪試料BのMeOH-HCl抽出物のLC/MSクロマトグラムからは、RT=3.6付近に毛髪成分に由来するピーク(m/z=185)が検出された(Fig.14).

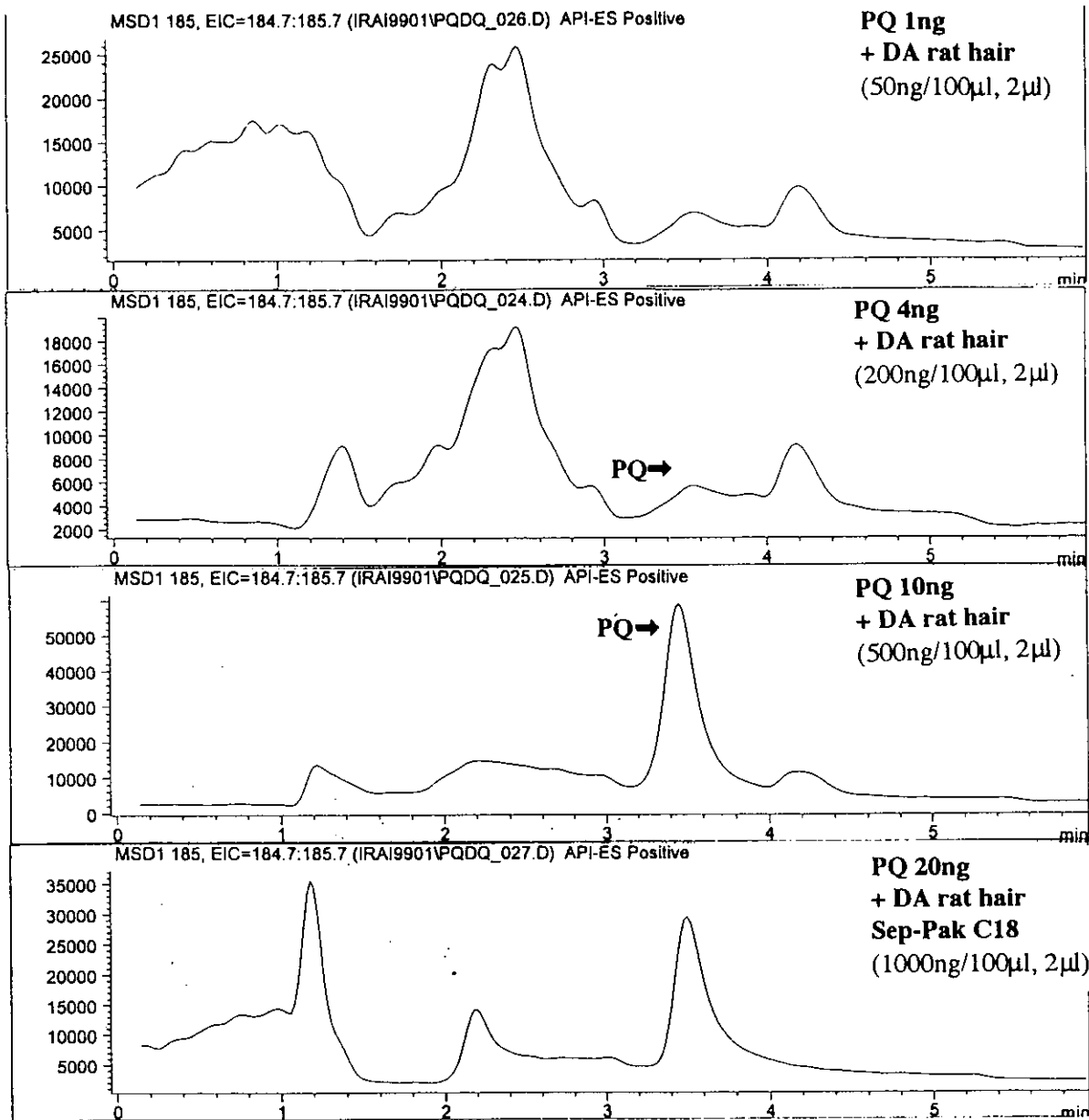


Fig.13 パラコート添加ラット毛髪(MeOH-HCl抽出物)のSIMクロマトグラム(m/z=185)

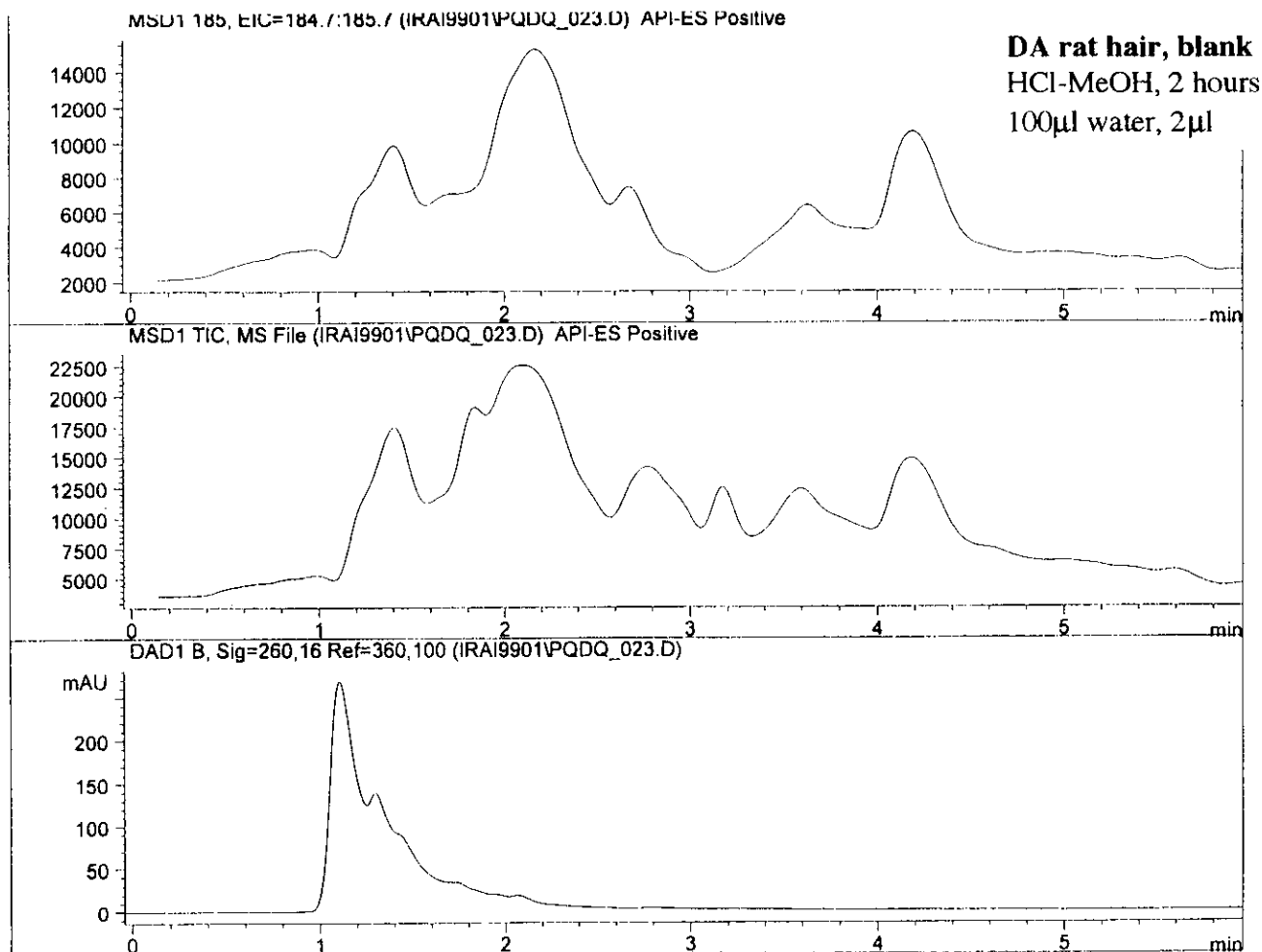


Fig.14 DAラットblank毛髪のMeOH-HCl抽出物のLC/MSクロマトグラム

DAラットblank毛髪にMeOH/5NHCl(20:1)2mlを加え2hr超音波処理。窒素気流にて蒸発乾固(100℃)。

2-2. パラコート投与ラット毛髪(毛髪試料A)のLC/MS分析

毛髪試料AのMeOH-HCl抽出物のLC/MSクロマトグラムから、RT=3.6付近に、 $m/z=185$ のピークがわずかながら検出された(Fig.15)。

しかしながら、前項2-1で、毛髪試料BのMeOH-HCl抽出物から毛髪成分に由来するピーク($m/z=185$)がみとめられたことから、 $m/z=185$ のピークがパラコートに由来するものか毛髪成分に由来するものかは判別ができなかった。

LC/MSを用いた毛髪からのパラコート分析は、 $m/z=185$ のSIMモードでパラコートを検出しようが、混在する毛髪成分($m/z=185$)を除去するためには、なんらかの精製法が