

必須であることが判明した。

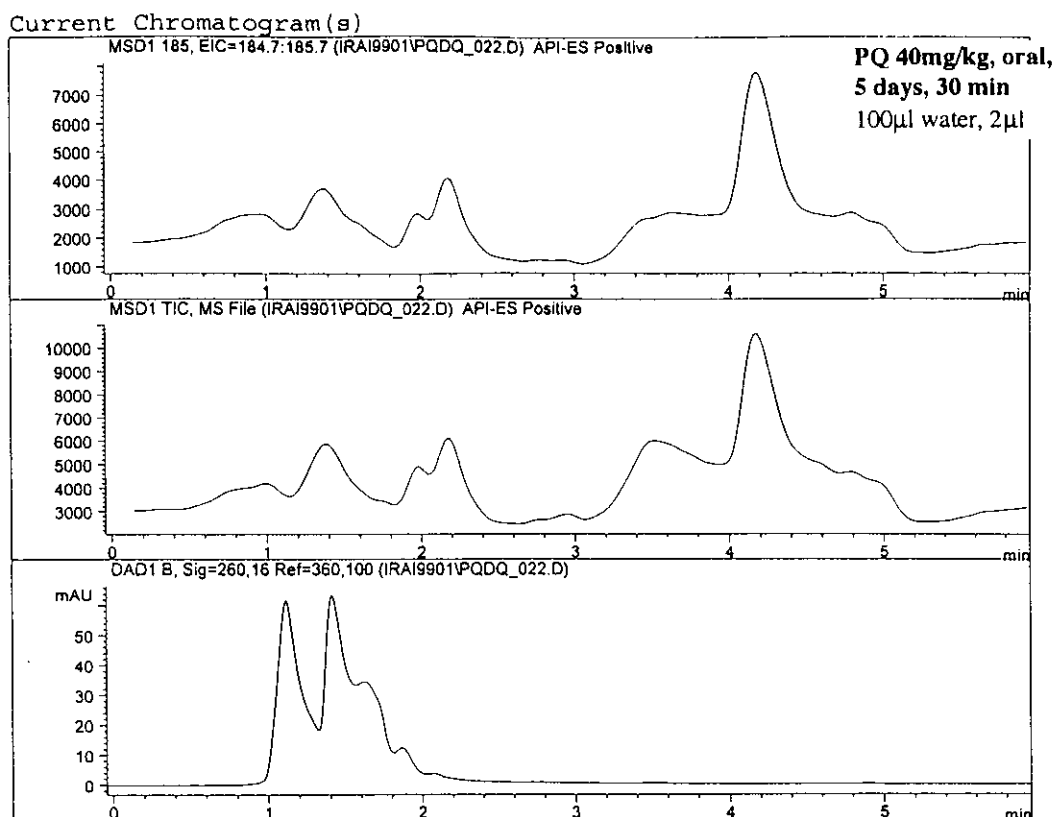


Fig.15 パラコート投与ラット毛髪(MeOH-HCl抽出物)のLC/MSクロマトグラム
パラコート投与ラット毛髪(40mg/kg, oral, 5day, 30min)を2.5mg秤量し, MeOH/5NHCl(20:1)2mlを加え2hr超音波処理, 窒素気流にて蒸発乾固(100°C).

[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

毛髪からの微量パラコート抽出に適した試料前処理法を選定するために, 以下の条件について検討した. また, [1]章で述べたHPLCを用いるパラコート分析についても, 毛髪からの微量パラコート分析を目的とするために種々の検討を加えた.

【試料】

試料は, DAラット(male, 5W, 90-100g)にパラコートを80mg/kgあるいは100mg/kgで1回, 経口投与し, 投与60分後に毛根から採取したラット毛髪(毛髪試料D). あるいは[2]章と同様に, 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】

パラコート100あるいは1000ngを添加した毛髪試料Cに、1)蒸留水、2)CHCl₃、3)HPLC移動相(0.05%TFA+0.05%PFBA+0.1%TEA)、4)MeOH-5N HCl (20:1)、5)0.1N HCl、6)10%トリクロル酢酸、のいずれか2mlを加え、超音波処理を1)2時間、2)24時間おこなったものをろ過して、毛髪を取り除いた。ろ液に10%炭酸ナトリウム2mlを加え、あらかじめ蒸留水5ml、MeOH5ml、蒸留水5mlで活性化したSep-Pak Lightカートリッジ(Waters, 充填量130mg)にapplyした。カートリッジを蒸留水5ml、MeOH5ml、で順次洗浄した後、0.1N HCl5mlで溶出し、100℃のアルミヒートブロック上で、窒素気流により乾固した。試料に100μlの5mMイソニコチン酸(ES)を加え、vortex mixerにてよく攪拌、溶解し、HPLCに注入した(Fig.16)。

HPLC条件は[1]章と同様で、装置はJascoPU-980,CO-965,UV-970、カラムはInertsil ODS-2 (5mm,25cm×4.0mm I.D.)、移動相は0.05%TFA+0.05%PFBA+0.1%TEAで、流速0.8ml/min、カラム温度30℃、検出波長はUV 260nmを用いた。

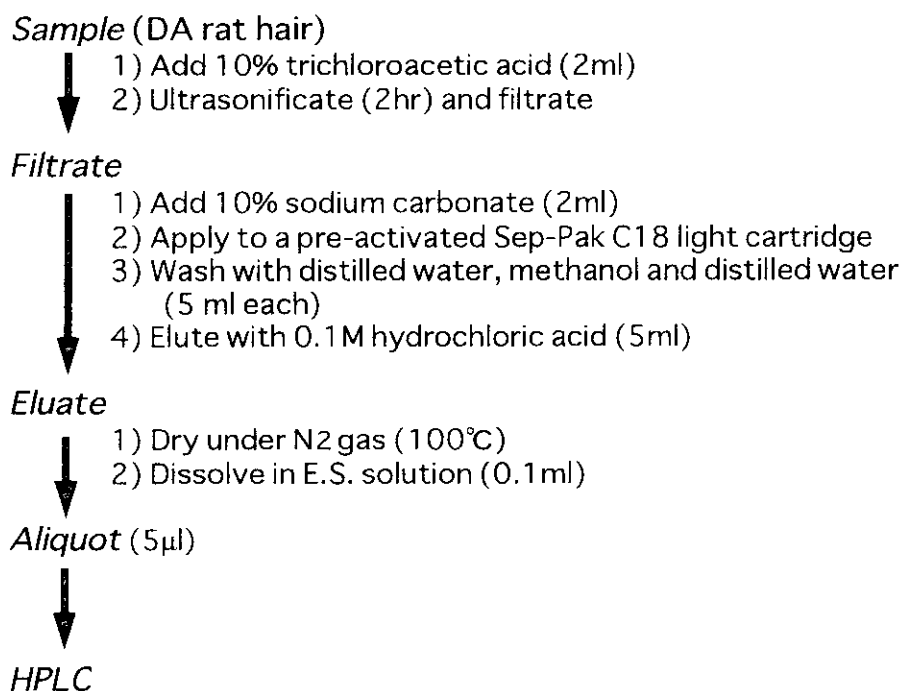


Fig.16 ラット毛髪中パラコート抽出のための前処理法

【結果ならびに考察】

1. 微量パラコートの検量線作成

今回のHPLC条件では、パラコートはRT=7.5付近に、イソニコチン酸(ES)はRT=4.0付近に、それぞれ単独のピークとして検出された。

5mMイソニコチン酸をESとした微量パラコート検量線は、やや直線性に難があるが、50-500ng/mlの範囲で使用可能であると思われた($r^2=0.9882$)(Fig.17)。

500ng/mlにおける再現性はCV値11.62%であった。パラコート希釈液は0.1N HClで調製、保存は硬質ガラス試験管(Pyrex製)で、遮光保存とした。

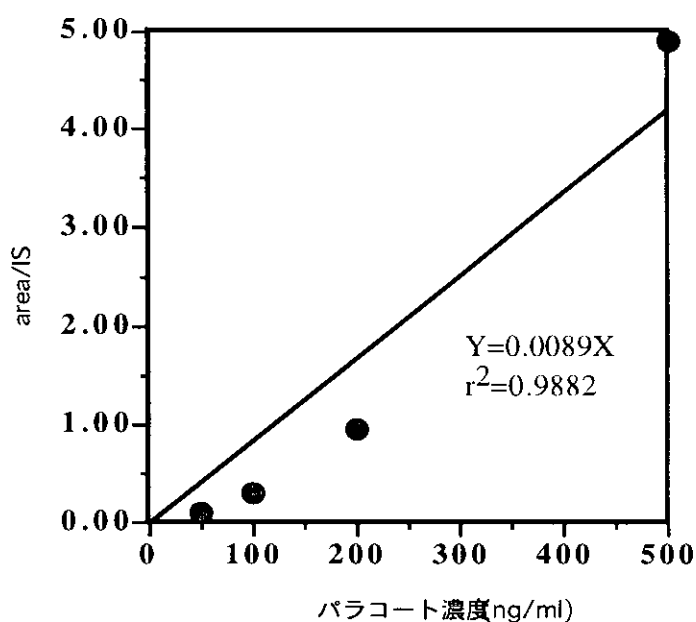


Fig.17 5mMイソニコチン酸を用いたパラコート検量線(50-500ng/ml)

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

パラコート100ngならびに1000ngを添加した毛髪試料Cに、1)蒸留水、2)CHCl₃、3)HPLC移動相(0.05%TFA+0.05%PFBA+0.1%TEA)、4)MeOH-5N HCl (20:1)、5)0.1N HCl、6)10%トリクロル酢酸、のいずれか2mlを加え、超音波処理を1)2時間、2)24時間おこない、パラコートの回収率を比較した(Table 2)。

CHCl₃で超音波処理をおこなったものは、いずれも、HPLCクロマトグラム上でパラコートのピークは検出されず、蒸留水で超音波処理をおこなったものも、パラコート

1000ngを添加して超音波処理2時間のものだけがわずかに回収された。HPLC移動相で超音波処理をおこなったものは、いずれも、パラコート回収率は20%以下であった。

MeOH-5N HCl (20:1), 0.1N HCl, 10%トリクロル酢酸で超音波処理をおこなったものでは、超音波処理2時間のものは、パラコートが回収された(Fig.18)が、超音波処理24時間のものは、多数の分解ピークが出現し、パラコートのピークはみとめ

Table 2 毛髪からのパラコート抽出各種条件の検討
(ラットblank毛髪に既知量のパラコートを添加)

	PQ1000ng+rat hair(blank)	PQ100ng+rat hair(blank)
H ₂ O, 超音波処理2hr	13%	*
H ₂ O, 超音波処理24hr	*	*
CHCl ₃ , 超音波処理2h	*	*
CHCl ₃ , 超音波処理24h	*	*
HPLC移動相, 超音波処理2hr	16%	5%
HPLC移動相, 超音波処理24hr	19.5%	16%
MeOH/5N HCl(20:1), 超音波処理2hr	32.8%	18%
MeOH/5N HCl(20:1), 超音波処理24hr	**	**
0.1N HCl, 超音波処理2hr	47.9%	29%
0.1N HCl, 超音波処理24hr	**	**
10%トリクロル酢酸, 超音波処理2hr	43.7%	51.5%
10%トリクロル酢酸, 超音波処理24hr	**	**

* パラコートのピーク(RT=7.58)は認められない

** 不明の分解ピークが多数出現しパラコートは定量不能

られたものの、定量は不能であった(Fig.19)。これらの3法を比較すると、10%トリクロル酢酸で2時間超音波処理をおこなったものが、低濃度パラコートの回収率が良好であった(Fig.20)。

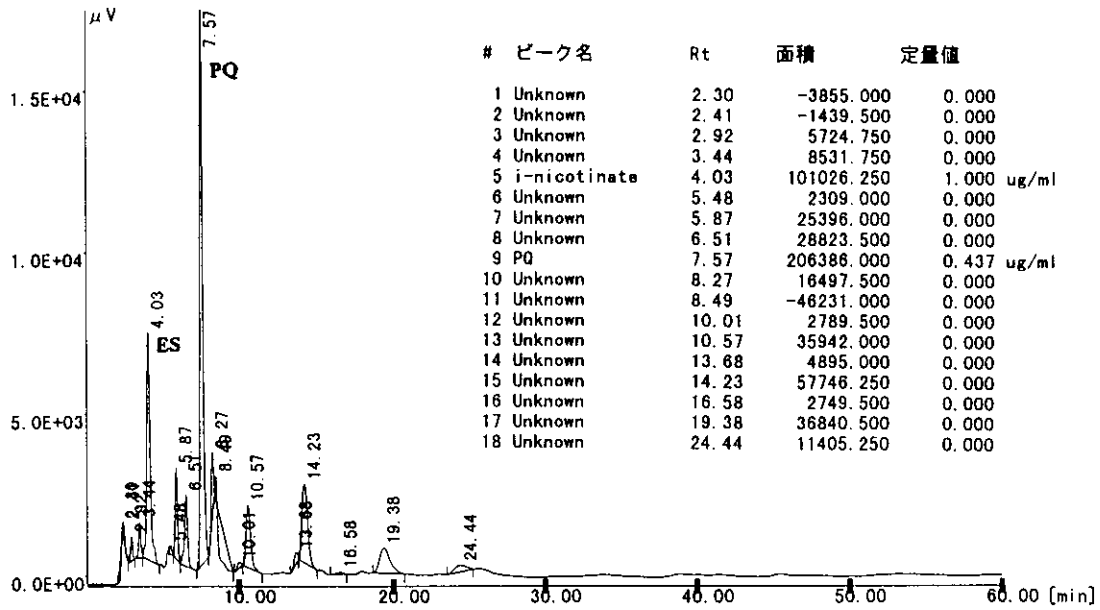


Fig.18 パラコート添加ラット毛髪(超音波処理2hr)の10%TCA抽出物のHPLC
 ラットblank毛髪にPQ1000ngを添加後, 10%トリクロル酢酸2mlを加え2hr超音波処理. 窒素気流にて蒸発乾固(100°C). UV260nmで測定.

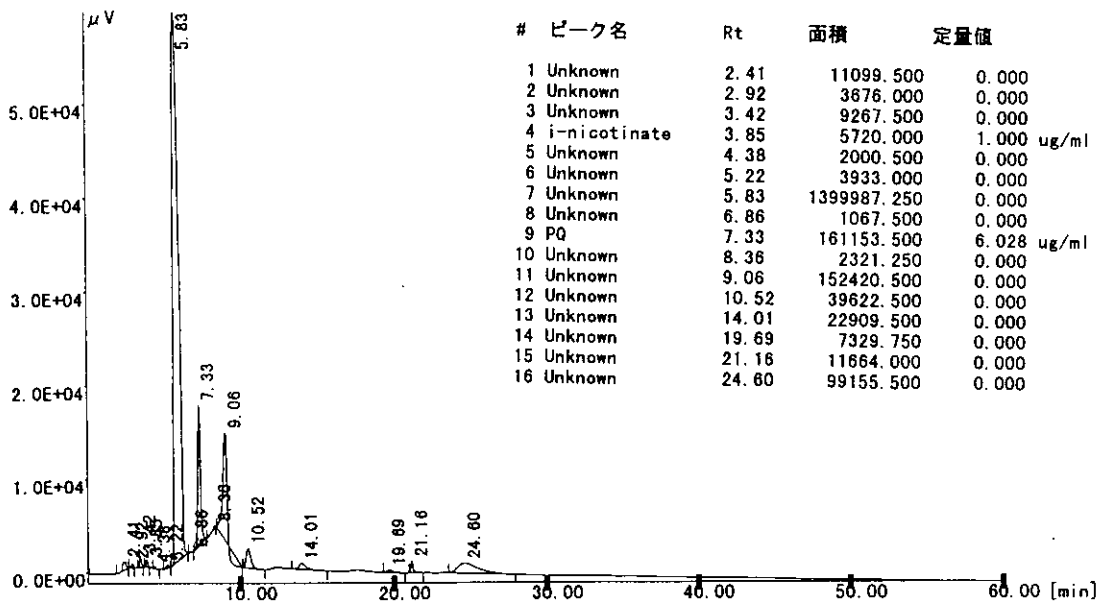


Fig.19 パラコート添加ラット毛髪(超音波処理24hr)の10%TCA抽出物のHPLC
 ラットblank毛髪にPQ1000ngを添加後, 10%トリクロル酢酸2mlを加え24hr超音波処理. 窒素気流にて蒸発乾固(100°C). UV260nmで測定.

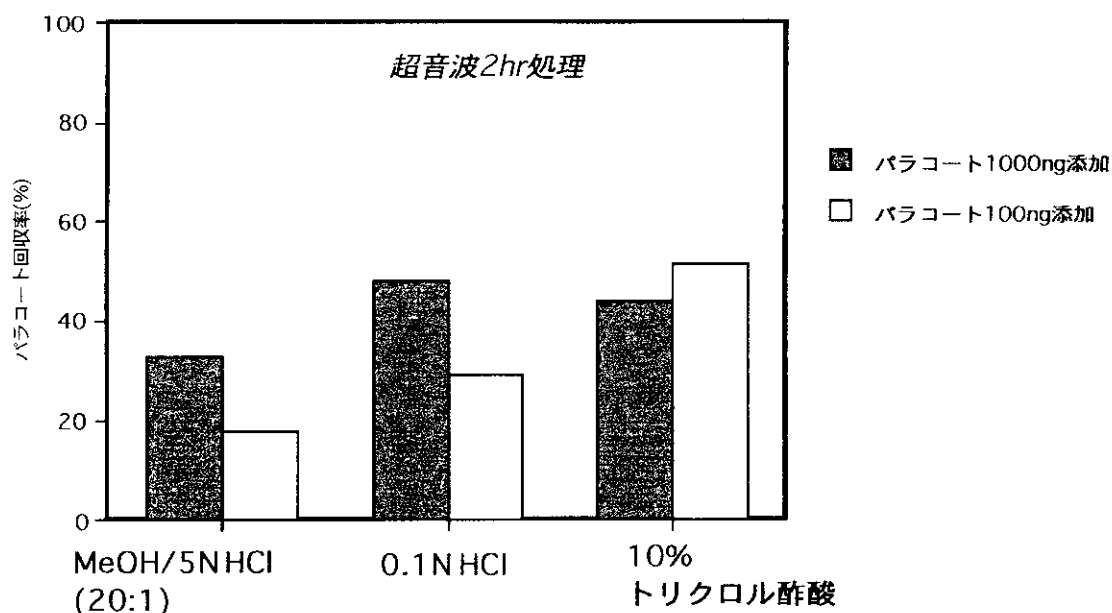


Fig.20 ラット毛髪からのパラコート回収の抽出条件の検討

2-2. 毛髪抽出物の精製法

毛髪抽出物の精製は、Sep-Pack C₁₈よりカラム充填量の少ないSep-Pak Lightカートリッジを用いた。カートリッジの活性化や化合物の溶出は常法に従った。Sep-Pak Lightカートリッジのblankとして、10%トリクロル酢酸2mlについて、常法に従ってカートリッジ処理を行い、0.1N HClで溶出した溶出液を窒素気流により乾固したものを用いた。HPLCクロマトグラムでは、ESのイソニコチン酸のピーク以外は認められなかった。ラットblank毛髪に10%トリクロル酢酸2mlを加えたものについて、同様に、カートリッジ処理を行い、0.1N HClで溶出した溶出液を窒素気流により乾固したものを用いた。HPLCクロマトグラムでは、ESのイソニコチン酸のピークとRT=5.37, 14.15のピーク以外は認められなかった(Fig.21)。

2-3. 毛髪からの低濃度パラコート回収

パラコート50, 100, 200, 500ngを添加した毛髪試料Cに、10%トリクロル酢酸を加え2時間超音波処理後、Sep-Pak Lightカートリッジ処理を行った。パラコート回収率は、50ng/ml(64%), 100ng/ml(83%), 200ng/ml(74%), 500ng/ml(119%)で、おおむね良好であったが、パラコート添加量が少ない場合は、回収率が低下する傾向にあった(Fig.22)。

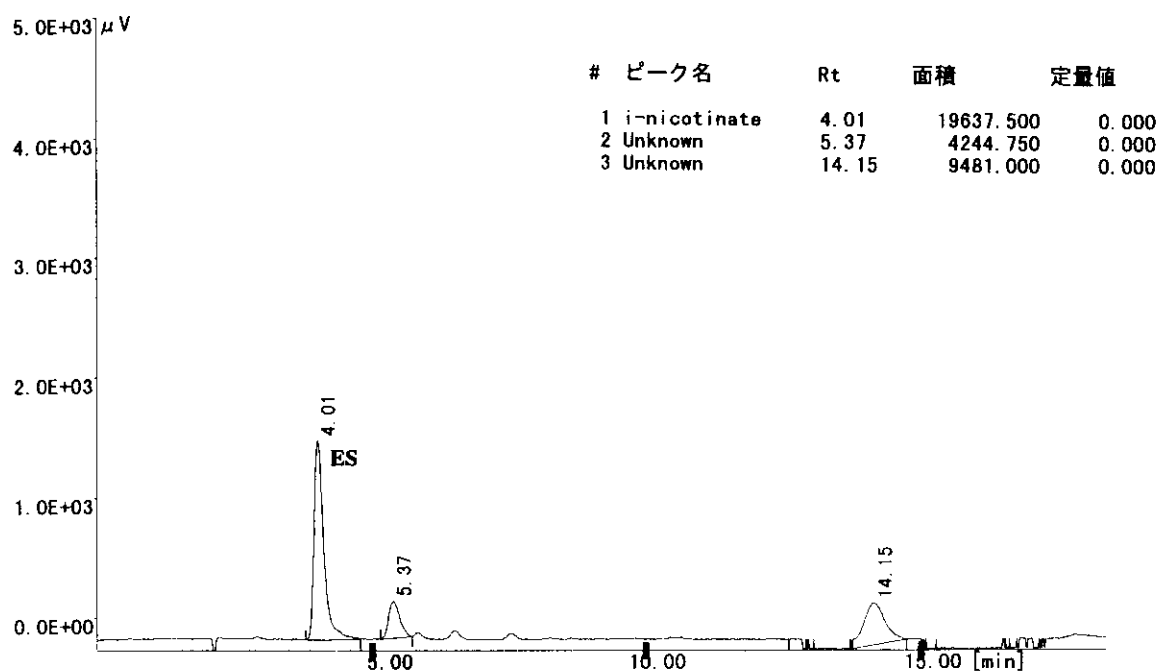


Fig.21 ラットblank毛髪に10%TCA/Sep-Pak Light抽出物のHPLCクロマトグラム
 ラットblank毛髪にTCA2mlを加え、2hr超音波処理。Sep-PakLightカートリッジで前処理後、窒素気流にて蒸発乾固(100°C)。UV260nmで測定。

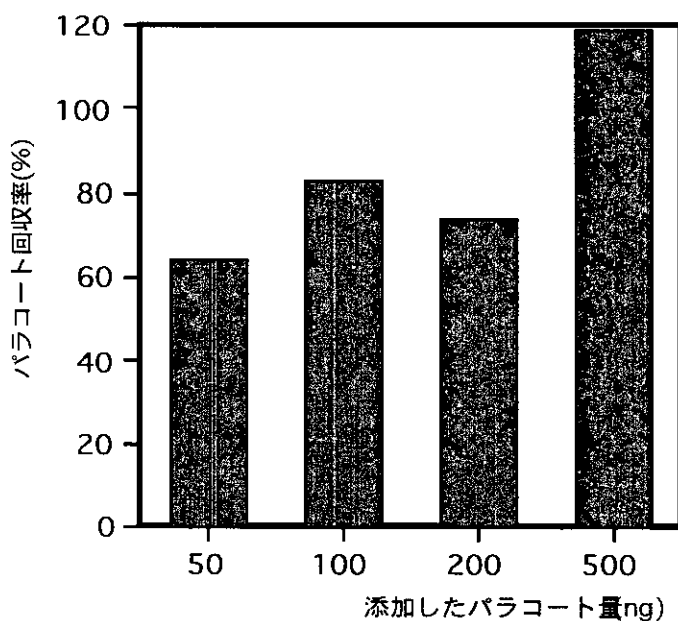


Fig.22 毛髪に10%TCA/Sep-Pak Light抽出における低濃度パラコート回収率
 ラットblank毛髪に既知量のパラコートを添加、10%トリクロル酢酸を加え2hr超音波処理。Sep-PakLightカートリッジで前処理後、窒素気流にて蒸発乾固(100°C)。

3. パラコート投与ラット毛髪中パラコート分析

毛髪試料Dを秤量し、10%トリクロル酢酸2ml加え、2時間超音波処理後、Sep-Pak Lightカートリッジで精製したもののHPLCクロマトグラムから、RT=7.57にパラコートのピークが検出された(Fig.23,24)。濃度は、100mg/kg投与ラットの毛髪で56.149ng/5.4mg、80mg/kg投与ラットの毛髪で8.870ng/4.6mgであった。

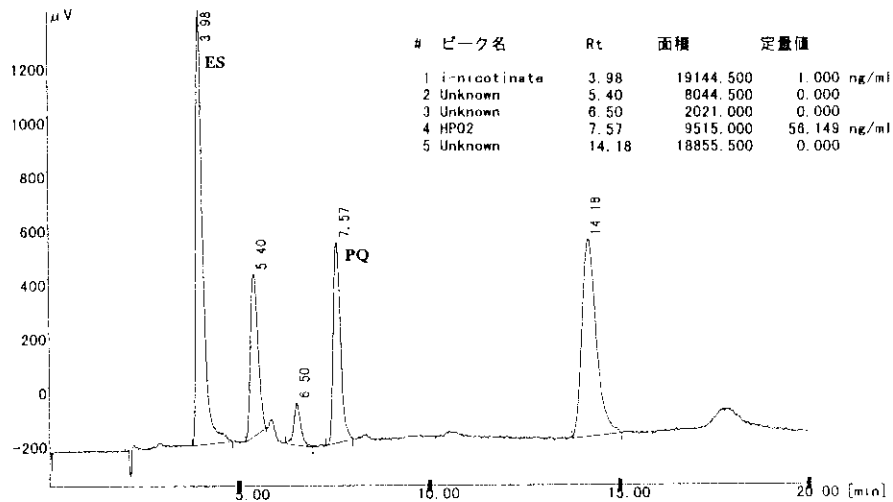


Fig.23 パラコート投与ラット毛髪(100mg/kg, oral, 60min)を5.4mg秤量し、10%トリクロル酢酸2mlを加え2hr超音波処理。Sep-PakLightカートリッジで前処理後、窒素気流にて蒸発乾固(100℃)。

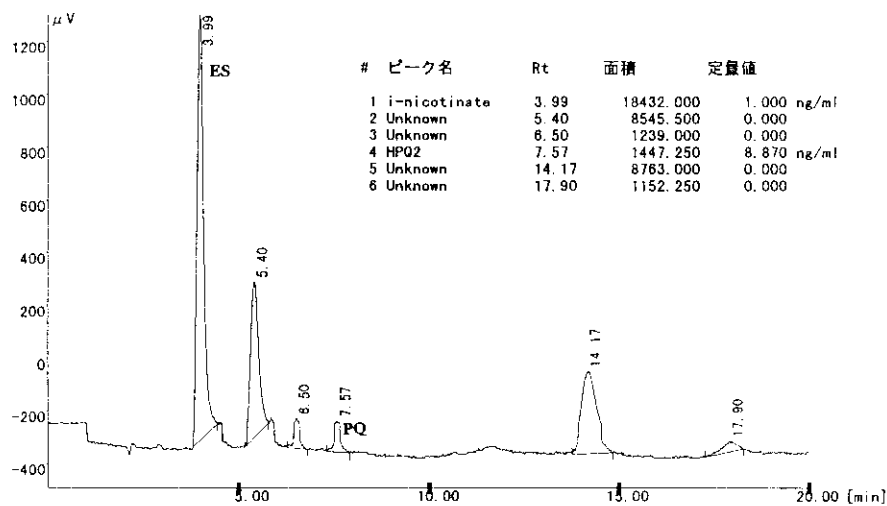


Fig.24 パラコート投与ラット毛髪(80mg/kg, oral, 60min)を4.6mg秤量し、10%トリクロル酢酸2mlを加え2hr超音波処理。Sep-PakLightで前処理後、窒素気流にて蒸発乾固(100℃)。UV260nmで測定。

[4] 総合考察

血清、尿などの生体試料からのパラコートの検出は、Sep-Pack C₁₈で前処理後HPLCによる測定により良好な成績が得られた。パラコート標準液については、0.5-10,000ng/mlの範囲で直線性が認められ、経時的に採取した生体試料からの測定が可能であった。測定値については、中毒域の定量性に関しては問題ないと思われたが、低濃度領域では回収率や再現性の点で検討の余地があるように思われた。試料によってはHPLC分析でパラコートのRTに若干の変動がみられたが、1年間で500検体を超える測定数をこなした現在でも、パラコートのRTは8.0付近から7.5付近へと変化したのみで、agingによる影響はほとんど問題にならないといえよう。

そこで、今回我々はこの方法を毛髪中のパラコート測定に応用すべく低濃度領域における試料調製に検討を加えた。パラコートは通常のガラス器具には吸着しやすく、光による分解も受けやすい。これらのパラコートの物性が原因となって、低濃度試料で影響が強く出やすいものと考えられた。

一方、パラコート合成の過程では100℃加熱しても分解等はおこらないことから、耐熱性のある化合物であるとされている。我々は、当初、各行程における試料乾固を水流アスピレータを用いた真空エバポレータでおこなっていたが、100℃のアルミヒートブロック上での窒素気流による乾固に切り替えた。

また我々は、プラスチック器具やパイレックスガラスを用いることをはじめとして、種々の検討を加えたが、分析のartifactや行程を考慮して、パイレックスガラスを用い、アルミホイルで遮光することにより、50-500ng/mlの範囲で良好なパラコート測定が可能であった。しかし、厳密に考えると検量線の直線性や再現性などに精度の向上が得られなかったことは、パイレックスガラスやろ紙などにパラコートが吸着することが原因となっていると推察された。

[1]章の方法、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からのHPLC分析を試みたが、パラコートのピークは検出されず、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、パラコートのピークがわずかに検出された。このピークがパラコートであることを確認すべく、LC/MSで測定したが、パラコートに相当するm/z=185イオンのピークは検出されたが、毛髪成分と重なり、パラコートの同定はできなかった。このことから、不純物

を除く精製が必要であることが確認され、毛髪からのパラコート抽出法と精製法の両面からの検討が必要と思われた。

次に我々はHPLCを用いて、毛髪からのパラコート分析法を確立すべく、無処置のダラットの毛髪に既知の微量パラコートを添加し抽出、精製法の検討を行った。その結果、毛髪(毛根を含む)を10%トリクロル酢酸で2時間超音波抽出し、Sep-Pack C₁₈よりカラム充填量の少ないSep-Pak Lightを用いて精製し、窒素気流下で乾固後、イソニコチン酸(外部標準物質)を含む蒸流水に再溶解し、HPLCにて測定する方法が確立された。この方法を用いるにより、50~500ng/mlの範囲で良好な検量線を得ることができた。実際試料として、100mg/kg 1回投与1時間後のラットの毛髪から同上操作によりパラコートが測定され、この方法が有効であることが示された。

今後、この方法を用いれば、[2]章の抽出・精製では結果が思わしくなかった40mg/kg 5回投与30分後のラットの毛髪についても、十分に良好な検出が可能と思われる。LC/MSにより毛髪中のパラコートや代謝物であるジピリドン等についても検討する必要がある。

また、今回検出されたパラコートが本当に毛髪中に取り込まれたものか、毛根部に付着したものかの判別に関する検討も重要となろう。そのために、0.1% SDSによる毛髪の洗浄、パラコート投与量とラット毛髪中の濃度との相関、パラコート投与後毛髪採取との時間的経過、パラコート毛髪濃度と血中濃度ならびに臓器中濃度との相関などの検討を系統的に進めることを最終年度の課題としたい。

[5]参考文献

R.Gill, S.C.Qua and A.C.Moffat : High-performance liquid chromatography of paraquat and diquat in urine with rapid sample preparation involving ion-pair extraction on disposable cartridges of octadecyl-silica. J.Chromatogr. , 255, 483-490 (1983)

細井要一, 神津 公 : 高速液体クロマトグラフィによる血中パラコートの定量. 衛生化学, 31(4), 251-255 (1985)

鵜飼茂夫, 河瀬章司 : パラコート中毒と裁判化学. 衛生化学, 31(5), 283-297 (1985)

三浦 修, 佐々木智, 他 : 血清中パラコートの迅速簡易定量法. 衛生化学, 32(3), 167-170 (1986)

加藤晴代, 磯野秀夫, 藤田 進 : 生体試料中パラコートの定性・定量のための除蛋白剤の検討について. 衛生化学, 32(6), 460-463 (1986)

山本好男, 龍野嘉紹 : 逆相高速液体クロマトグラフィーによる血液中パラコートの迅速定量法. 中毒研究, 2, 419-424 (1989)

福家千昭, 飴野 清, 白川洋一, 他 : 高速液体クロマトグラフィーによる体液および臓器・組織中パラコートとジクワットの同時分析法と中毒例への応用. 中毒研究, 5, 387-393 (1992)

T.Yoshioka, T.Sugimoto, N.Nishioka.et al : Effect of concentration reduction and partial replacement of paraquat by diquat on human toxicity:a clinical survey. Hum.Experiment.Toxicol. , 11, 241-245 (1992)

古沢世理子, 本庄弘次, 米満孝聖, 恒成茂行 : 血液中パラコートの定量分析-試料の前処理方法と分析方法の評価. 日法医誌, 47(1), 57-62 (1993)

福家千昭, 飴野 清, 飴野節子, 他 : in vitro代謝実験法によるパラコートとジクワットの代謝に関する研究-パラコートとジクワットの代謝産物について- 日法医誌, 47(1), 33-45 (1993)

K.Ameno.,C.Fuke, Y.Shrakawa, et al : Differentdistribution of paraquat and diquat in human poisoning cases after ingestion of a combined herbicide. Arch.Toxicol. , 68, 134-137 (1994)

C.Fuke.,K.Ameno, S.Ameno, et al : Detection of two metabolites of diquat in urine and serum of poisoned patients after ingestion of combined herbicide of paraquat and diquat. Arch.Toxicol. , 70, 504-507 (1996)

S.Kage, K.Kudo, S.Fukushima and N.Nagai : Selrctivedetermination of paraquat and diquat in blood by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Jpn.J.Forensic Toxicol. , 16(1), 34-41 (1998)

付属文書

(本研究により得られた刊行物)

1. Life Sci., 63: 883-893 (1998)
2. ファルマシア, 34(9): 820-826 (1998)
3. 中毒研究, 12: 43-50 (1999)

19980069

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Hair analysis for drugs of abuse XX. Incorporation and behaviors of seven methamphetamine homologs in the rat hair root.

Nakahara Y, Kikura R, Takahashi K.

Life Sci. 1998;63(10):883-93.

依存性薬物の毛髪分析の進歩.

中原雄二

ファルマシア. 34 巻 9 号 Page820-826 1998.

妊娠中ブロン液および覚せい剤乱用の母親と新生児の毛髪分析例.

木倉瑠里, 中原雄二, 渡部基信

中毒研究. 12:43-50,1999