

- 3) 炎光光度検出器の光学フィルターを 526 nm のものを使用するとリンを含む化合物を選択的に高感度検出できる。有機リン系農薬の検出下限は、注入液中濃度で 0.1 µg/ml よりも低いので急性中毒の判別に有用である。
- 4) 今回使用した窒素リン検出器は、島津製でフレイムサーミオニック検出器 (FTD) と呼ばれ、窒素もしくはリンを含む化合物に対して選択的に高感度を示すので、医薬品や農薬などの高感度検出が可能である。
- 5) ガスクロマトグラフ質量分析法は、薬毒物分析において最も信頼度の高い同定法で、電子衝撃イオン化 (EI) 法で標準品のマススペクトルと一致すれば同一物質と断定できる。炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ法や窒素リン検出器付ガスクロマトグラフ法で検出された化合物の確認や窒素やリンを含まない化合物の検出を行う。
- 6) 紫外可視検出器付高速液体クロマトグラフ法は、高極性化合物や難揮発性化合物、熱不安定性化合物などのガスクロマトグラフでの分析が困難な化合物 (アセトアミノフェン、ブロムワレリル尿素、カルバメート系農薬など) の検出を目的に行っている。
- 7) 濃縮乾固すると揮発してしまう化合物 (ジクロロボス、クレゾールなど) の検出のために試料から抽出後、濃縮操作を行っていないが、検出感度向上のため揮発性の高い化合物の確認を行った後濃縮操作を行ってもよい。

【実験】パラコート含有試料保存容器の検討

<操作>

1. 8 ml と 10 ml のガラスバイアル, 15 ml のポリプロピレン遠沈管にブランク血漿 1 ml を入れる.
2. 各容器に 1 mg/ml パラコート溶液を 10 μ l 加える.
3. ウェイブローターにて攪拌し, 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 8 時間, 24 時間後に 100 μ l ずつ採取する.
4. 採取後直ちに試料に発色試薬 (0.25 M ハイドロサルファイトナトリウム-2 N 水酸化ナトリウム溶液) 100 μ l を加え攪拌する. 15 分, 30 分, 1 時間は同じ発色試薬を使用した, 2 時間以後は添加の直前に発色試薬を調整した.
5. 発色の程度を確認する.

<結果>

経時的に採取した試料の発色の程度を図 1 に示した.

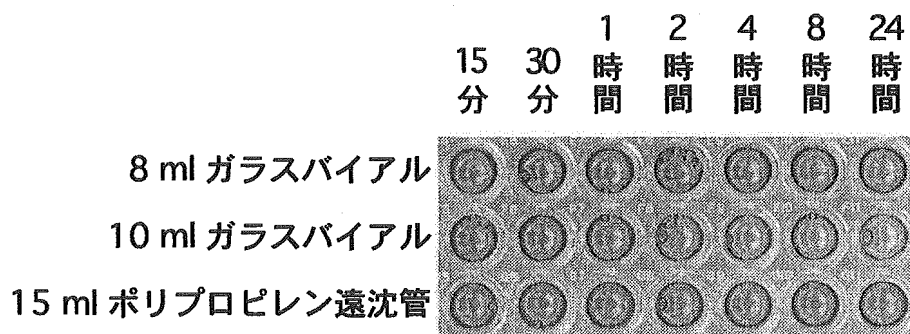


図 1 パラコート含有試料の保存容器とパラコートの発色

15 ml ポリプロピレン遠沈管は時間が経過してもほとんど発色に変化が認められなかった. 10 ml のガラスバイアルは時間経過とともに発色が著明に減少し, 24 時間後には発色が認められなくなった. 8 ml のガラスバイアルは 10 ml のものほど顕著ではないが発色が減少し, 24 時間後の発色はわずかであった. いずれのガラスバイアルも 15 分後の発色はポリプロピレン遠沈管よりも弱かった.

以上の結果より, 血漿中のパラコートは保存中にガラスに吸着される可能性があり, パラコート含有試料を保存する時はポリプロピレン製のものを使用することが望ましいと言える.

【定性分析の結果】

血清①：

1. パラコート- ジチオナイト反応：陰性 ⇒ 全ての分析終了後に行ったため、2ページに記載した理由により発色が認められなかったものとする。
2. アセトアミノフェン検出キット：陰性
3. 有機りん系農薬検出キット：検査せず
4. 乱用薬物スクリーニング検査キット：陰性
5. GC-FPD：毒劇物は検出されない（図2）
6. GC-NPD：毒劇物は検出されない（図3）
7. GC-MS：毒劇物は検出されない（図4）
8. HPLC：毒劇物は検出されない（図5）

血清②：アセトアミノフェン検出

1. パラコート- ジチオナイト反応：陰性
2. アセトアミノフェン検出キット：陽性
3. 有機りん系農薬検出キット：検査せず
4. 乱用薬物スクリーニング検査キット：陰性
5. GC-FPD：毒劇物は検出されない（図2）
6. GC-NPD：アセトアミノフェンのピークに近いブロードなピークを検出（図3）
7. GC-MS：アセトアミノフェンのマススペクトルに一致するピークを検出（図4）
8. HPLC：アセトアミノフェンに一致するピークを検出（図5）

尿：ペントバルビタールとフェニトロチオン検出

1. パラコート- ジチオナイト反応：陰性
2. アセトアミノフェン検出キット：陰性
3. 有機りん系農薬検出キット：陽性
4. 乱用薬物スクリーニング検査キット：BAR 陽性
5. GC-FPD：フェニトロチオンに一致するピークを検出（図2）
6. GC-NPD：ペントバルビタールとフェニトロチオンに一致するピークを検出（図6）
7. GC-MS：ペントバルビタールのマススペクトルに一致するピークとフェニトロチオンのマススペクトルに一致するピークを検出（図7）
8. HPLC：ペントバルビタールとフェニトロチオンに一致するピークを検出（図8）

水溶液：ヒ素検出

1. パラコートー ジチオナイト反応：陰性
2. アセトアミノフェン検出キット：陰性
3. 有機りん系農薬検出キット：検査せず
4. 乱用薬物スクリーニング検査キット：陰性
5. GC-FPD：毒劇物は検出されない
6. GC-NPD：毒劇物は検出されない
7. GC-MS：毒劇物は検出されない
8. HPLC：毒劇物は検出されない
9. 蛍光X線元素分析：ヒ素，亜鉛，銅に相当するスペクトルを検出（図9）

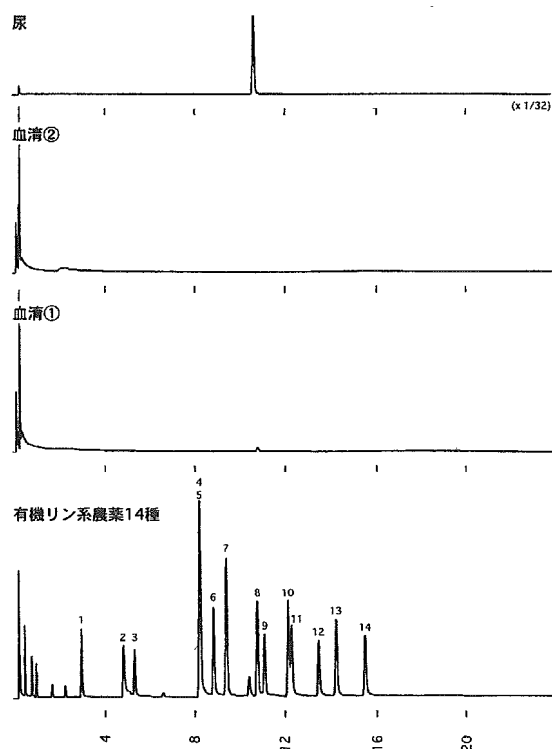


図2 GC-FPDによる有機リン系農薬の検索

装置：Shimadzu GC-4CM
検出器：炎光光度検出器（リン：526 nm）
カラム：DB-1, 30 m x 0.53 mm, 膜厚 1.5 μm
温度：カラム 100°C- (10°C/min)- 320°C
注入部・検出器 320°C
キャリアガス：ヘリウム 40 ml/min

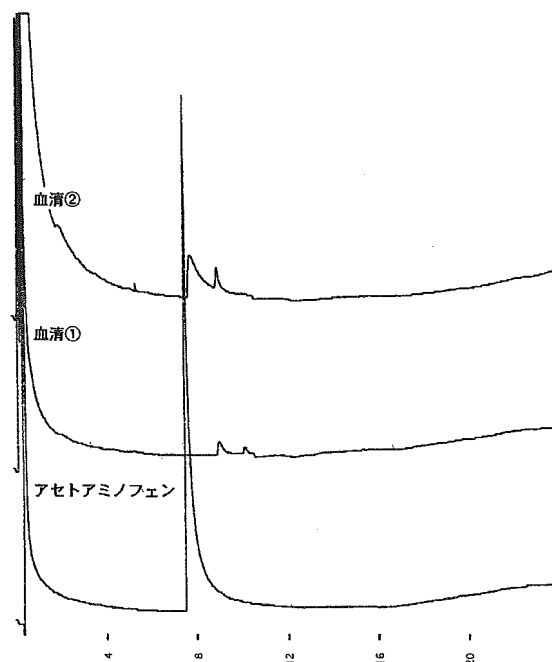


図3 GC-NPDによる毒劇物の検索

装置：Shimadzu GC-7A
検出器：フレイムサーミオニック検出器
カラム：DB-1, 30 m x 0.53 mm, 膜厚 1.5 μm
温度：カラム 100°C- (10°C/min)- 320°C
注入部・検出器 320°C
キャリアガス：ヘリウム 40 ml/min

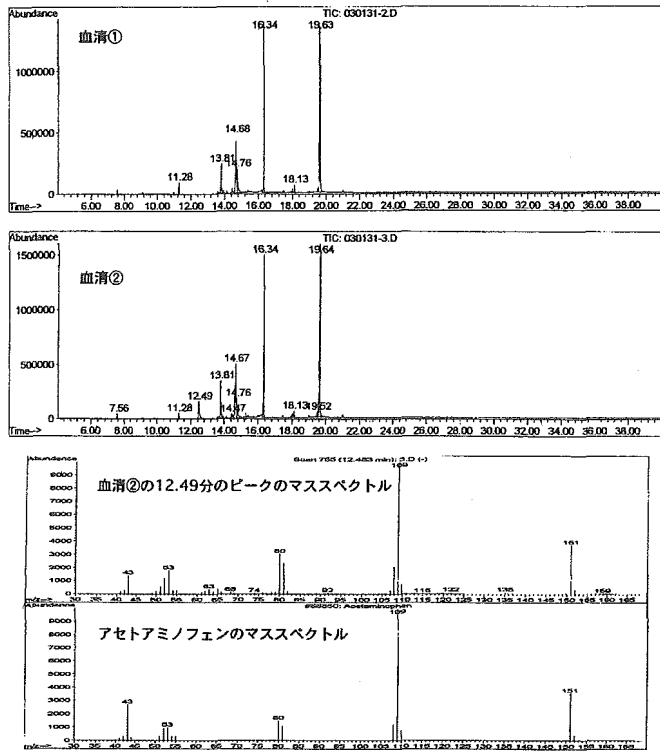


図4 GC-MSによる毒劇物の検索

装置：HP6890 series

検出器：質量分析計

カラム：HP-5, 30 m x 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm

温度：50°C (4 min)–(20°C/min)– 320°C

注入部・検出器 300°C

キャリアガス：ヘリウム 1 ml/min

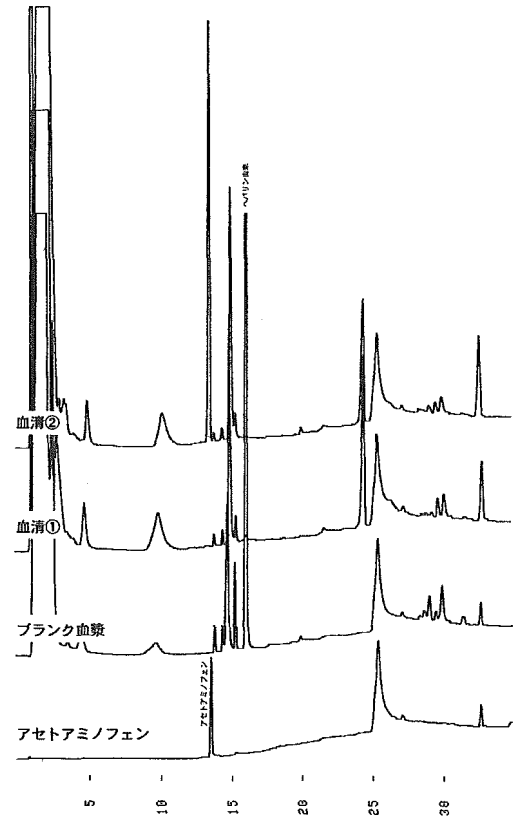


図5 HPLCによる毒劇物の検索

装置：Waters M-600 & M-490E

検出器：紫外可視検出器 (210 nm)

カラム：Nova-Pak C₁₈ (15 cm x 3.9 mm, 4 μm)

移動相：水-(10 min)-アセトニトリル：水=1:1
-(10 min)-アセトニトリル

流速：1 ml/min

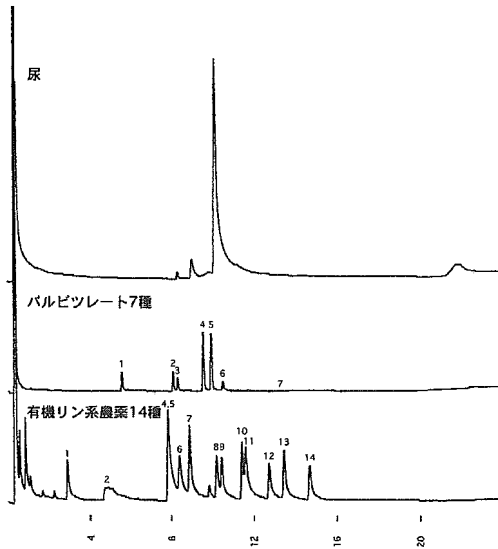


図6 GC-NPDによる毒劇物の検索
(分析条件は図3と同じ)

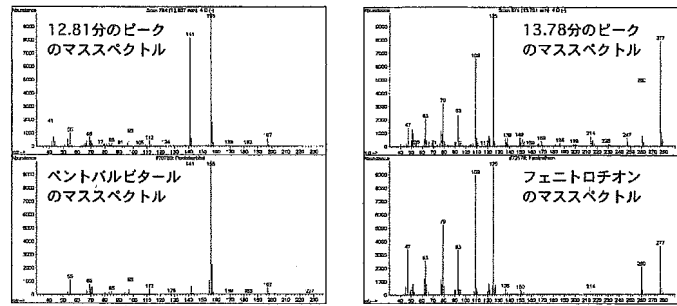
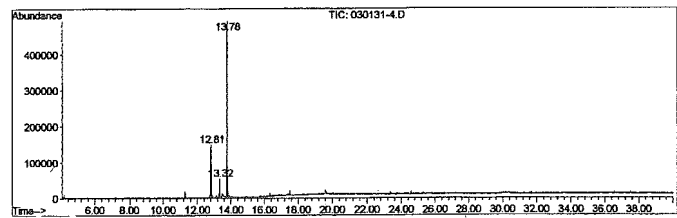


図7 GC-MSによる毒劇物の検索
(分析条件は図4と同じ)

- 有機リン系農薬 14 種 ; 1 : ジクロロボス, 2 : トリクロロホン, 3 : アセフェート,
 4 : ジメトエート, 5 : チオメトン, 6 : シアノホス, 7 : ダイアジノン,
 8 : フェニトロチオン, 9 : マラチオン, 10 : フェントエート,
 11 : メチダチオン, 12 : イソキサチオン, 13 : スルプロホス, 14 : EPN
- バルビツレート 7 種 ; 1 : バルビタール, 2 : アモバルビタール, 3 : ペントバルビタール,
 4 : メホバルビタール, 5 : フェノバルビタール,
 6 : ヘキサバルビタール, 7 : p-ヒドロキシフェノバルビタール

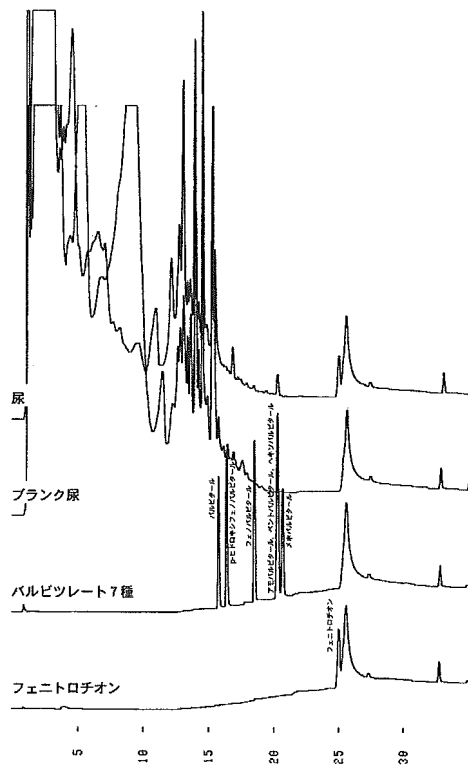


図8 HPLCによる毒劇物の検索
(分析条件は図5と同じ)

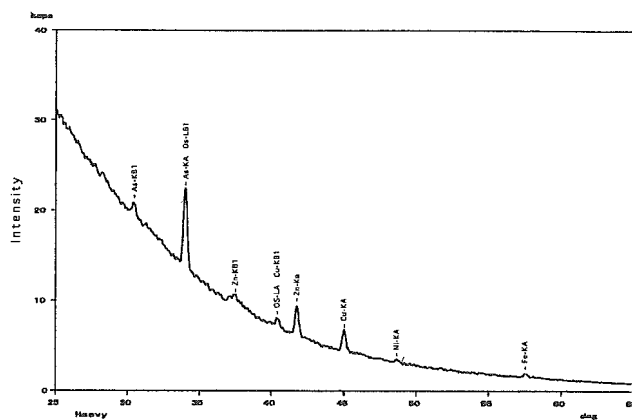


図9 蛍光X線元素分析装置による重金属の検索

2 定量分析

高速液体クロマトグラフによる血清①中パラコートの定量分析

<前処理>

- 1) 血清 100 μl に水 0.9 ml と 1 mg/ml エチルパラコート・ジイオジド内部標準溶液 5 μl を加える。
- 2) 2 N 水酸化ナトリウム溶液 20 μl を加え攪拌後、直ちに活性化しておいた Sep-Pak C18 カートリッジに注入する。
- 3) カートリッジを水 5 ml, メタノール 3 ml, 水 5 ml で洗浄する。
- 4) カートリッジに 0.1 N 塩酸 4 ml を流し、溶出液をガラス試験管に集める。
- 5) 沸騰水浴中で窒素ガスで乾固する。
- 6) 移動相 100 μl に溶解し、その 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入する。

<分析条件>

装置：Shimadzu LC-6A & SPD-6A
検出器：紫外可視検出器 (290 nm)
カラム：Puresil C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm , Waters)
移動相：10 mM オクタンスルホン酸ナトリウム,
10 mM トリエチルアミン, 500 mM 臭化カリウム溶液をリン酸で pH 3.0 に調整
流速：2 ml/min
カラム温度：室温

<定量結果>

パラコート：3.6 $\mu\text{g/ml}$

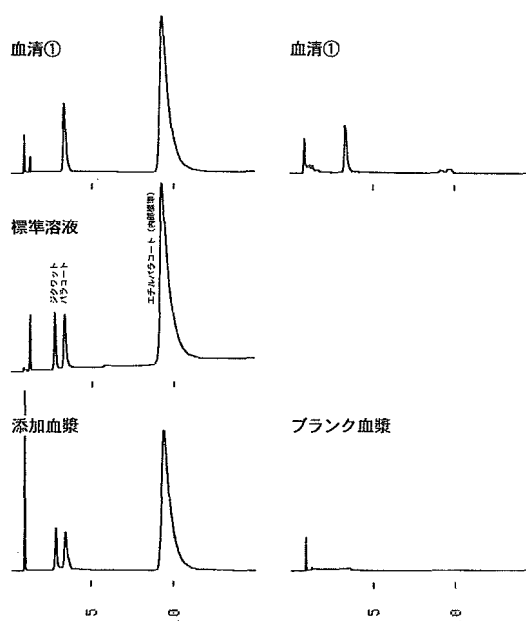


図 10 血清①と標準溶液, 添加血漿のクロマトグラム (添加濃度: 2 $\mu\text{g/ml}$ パラコート, ジクワット)

【注解】

- 1) エチルパラコートを内部標準として使用すると抽出操作前に添加することが可能で、抽出操作による誤差を補正でき便利である。エチルパラコート・ジイオジドは Phillips らの方法 (J Am Chem Soc 1955; 77, 6393-6395) により比較的容易に合成できる。
- 2) Sep-Pak C18 カートリッジはメタノール 5 ml, 水 5 ml, 0.1 N 塩酸 5 ml, 水 5 ml を順次流

して、予め活性化しておく。カートリッジに液を流すときは、2.5 ml/分程度の流速で行う。また、カートリッジに空気が入らないように注意する。空気が入ると回収率が低下することがある。

- 3) アルカリ性にした後、直ちに Sep-Pak C18 カートリッジに注入する。パラコート、ジクワットはアルカリ性で分解する。特にジクワットは著しい。
- 4) 溶出液を乾固するためにエバポレーターや凍結乾燥器を使用しても良い。試料の数が多い場合、凍結乾燥器を使用すると便利である。いずれの方法においても蒸気、蒸留物に塩酸が含まれているので装置の腐食を防ぐため、後処理を十分に行う必要がある。
- 5) 本分析法の検出下限は注入量で約 1 ng である。

高速液体クロマトグラフによる血清②中アセトアミノフェンの定量分析

<前処理>

- 1) 血清 100 μl に飽和塩化ナトリウム溶液 100 μl と 1 mg/ml 2-アセトアミドフェノール 10 μl を加える。
- 2) 酢酸エチル 600 μl を加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌する。
- 3) 12000-g で5分間遠心分離する。
- 4) 有機層を分取する。
- 5) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する。
- 6) 移動相 100 μl に溶解し、その 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入する。

<分析条件>

ポンプ：Shimadzu LC-10A & SPD-10A

検出器：紫外可視検出器 (250 nm)

カラム：Nova-Pak C₁₈ (15 cm x 3.9 mm, 4 μm , Waters)

移動相：アセトニトリル：20 mM リン酸 2 水素カリウム (pH 3.0) = 5 : 95

流速：1 ml/min

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

<定量結果>

アセトアミノフェン：51.5 $\mu\text{g/ml}$

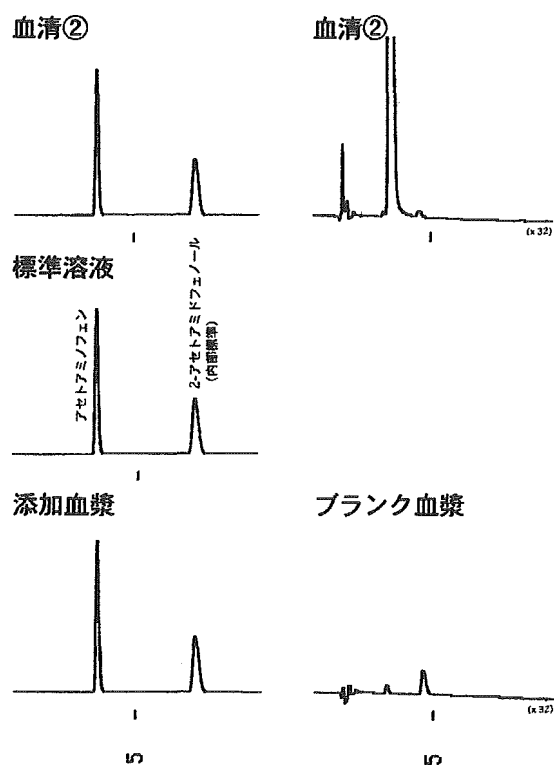


図 11 血清②と標準溶液、添加血漿のクロマトグラム
(添加濃度：50 $\mu\text{g/ml}$ アセトアミノフェン)

【注解】

- 1) アセトアミノフェンをガスクロマトグラフにて定量分析する場合、誘導体化して分析する必要がある。
- 2) アセトアミノフェンは酸性条件下で 245 nm 付近に強い UV 吸収を持ち高速液体クロマトグラフで感度良く分析することができる。
- 3) アセトアミノフェンは水溶性が高いので、飽和塩化ナトリウム溶液を加えることにより効率的に抽出できる。

高速液体クロマトグラフによる尿中ペントバルビタールの定量分析

<前処理>

- 1) 尿 100 μ l に 100 μ g/ml フェノバルビタール-メタノール溶液 10 μ l と水 100 μ l, 0.2 M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 20 μ l を加える.
- 2) 酢酸エチル/エーテル (1:1, v/v) 600 μ l を加え, ボルテックスミキサーで1分間攪拌する.
- 3) 12000-g で5分間遠心分離する.
- 4) 有機層を分取する.
- 5) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する.
- 6) 移動相 100 μ l に溶解し, その 20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する.

<分析条件>

ポンプ : Shimadzu LC-6A & SPD-6A

検出器 : 紫外可視検出器 (210 nm)

カラム : Nova-Pak Phenyl (15 cm x 3.9 mm, 4 μ m, Waters)

移動相 : アセトニトリル : 水 = 15 : 85

流速 : 1 ml/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

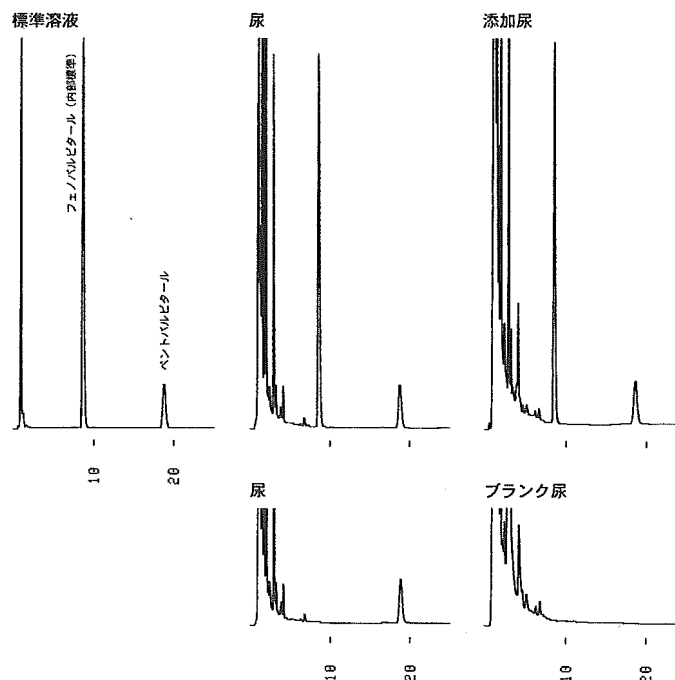


図 12 尿と標準溶液, 添加尿のクロマトグラム
(添加濃度 : 5 μ g/ml ペントバルビタール)

<定量結果>

ペントバルビタール：4.8 µg/ml

【注解】

- 1) 本分析法でバルビツール酸類に加え、ブロムワレリル尿素、アリルイソプロピルアセチル尿素も同時に分析できる。
- 2) 本分析条件ではペントバルビタールとアモバルビタール、ヘキソバルビタールのピークは近接しており、同時分析は困難である。
- 3) Nova-Pak Phenyl を用いることによりフェノバルビタールとブロムワレリル尿素が完全に分離する。

高速液体クロマトグラフによる尿中フェニトロチオンの定量分析

<前処理>

- 1) 尿 100 μl に 1 mg/ml シアノホス-メタノール溶液 5 μl を加える。
- 2) ヘキサン 500 μl を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌する。
- 3) 12000-g で 5 分間遠心分離する。
- 4) 有機層を分取する。
- 5) 室温水浴中で窒素ガスで乾固する。
- 6) 移動相 100 μl に溶解し、その 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入する。

<分析条件>

ポンプ：Shimadzu LC-10A & SPD-10A

検出器：紫外可視検出器 (270 nm)

カラム：Xterra MS C18 (5 cm x 2.1 mm + 2 cm x 2.1 mm, 3.5 μm , Waters)

移動相：アセトニトリル：水=35：65

流速：0.5 ml/min

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

<定量結果>

フェニトロチオン：12.2 $\mu\text{g/ml}$

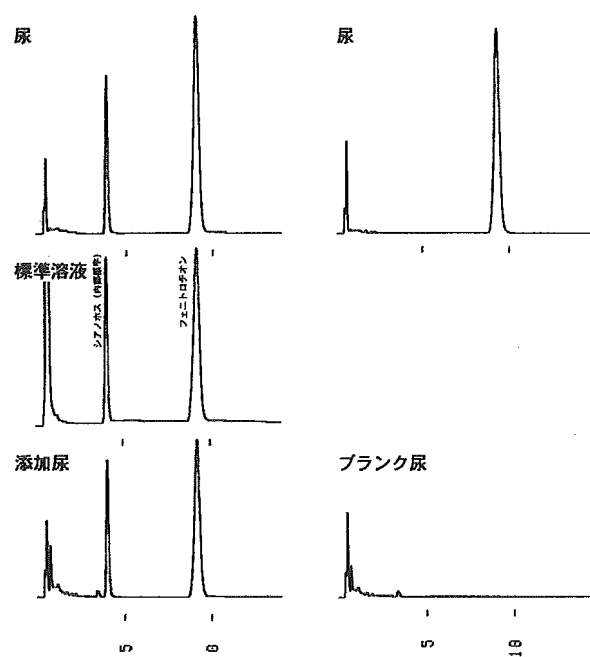


図 13 尿と標準溶液，添加尿のクロマトグラム
(添加濃度：10 $\mu\text{g/ml}$ フェニトロチオン)

【注解】

- 1) 有機リン系農薬でリン酸型のジクロロボスやオクソン体は血液中で急激に分解される。また、マラチオンやフェントエートのように構造中にカルボキシエステル結合を有すると分解されやすく、ディブテレックスも分解されやすい（血液中でジクロロボスに変換される）。これらの有機リン系農薬を正確に定量するためには、採血後直ちに抽出操作

を行う必要がある。その他の有機リン系農薬も血液中で徐々に分解するので早めに分析することを勧める。

- 2) 有機リン系農薬はガスクロマトグラフ、高速液体クロマトグラフのいずれでも分析可能であるが、窒素リン検出器ではテーリングするため（図6）定量分析には適さない。
- 3) ジクロルボスは有機溶媒で抽出後、完全に濃縮乾固すると回収されないので、高速液体クロマトグラフで分析する際はアセトニトリル添加による除蛋白後の上清を直接分析する。
- 4) アセフェート、トリクロルホン、ジメトエートはヘキサンで抽出されにくいので、極性の高い溶媒で抽出する。

(資料 4)

薬毒物分析例 2

血清中のパラコートの分光光度計による分析

紫外可視分光光度計を用いて、パラコートを分析する手法であり¹⁾、比較的短時間で結果を得ることができる分析法である。しかし試料中に高濃度のヘモグロビンやビルピリンが存在するとその影響を受け測定が困難である。

2次微分スペクトル測定を備えた分光光度計であれば、本分析に用いることができる。

1) 試薬と調製

- (1) パラコート標準母液：13.8 mg のパラコート・ジクロライドを 10 ml の水に溶解する (パラコートイオンとして 1 mg/ml)。
- (2) ジクワット標準母液：18.7 mg のジクワット・ジブロマイドを 10 ml の水に溶解する (ジクワットイオンとして 1 mg/ml)。本クロスチェックでは使用せず。
- (3) 除蛋白剤：10 g のスルホサリチル酸を 100 ml の水に溶解する。
- (4) 血漿用発色試薬：87 mg のヒドロサルファイトナトリウムを 10 ml の 5N 水酸化ナトリウム溶液に溶解する。(用時調整し、2 時間以内に使用する)。
- (5) 尿用発色試薬：435 mg のヒドロサルファイトナトリウムを 10 ml の 0.5N 水酸化ナトリウム溶液に溶解する。(用時調整し、2 時間以内に使用する)。本クロスチェックでは使用せず。

2) 血漿及び尿の前処理操作法

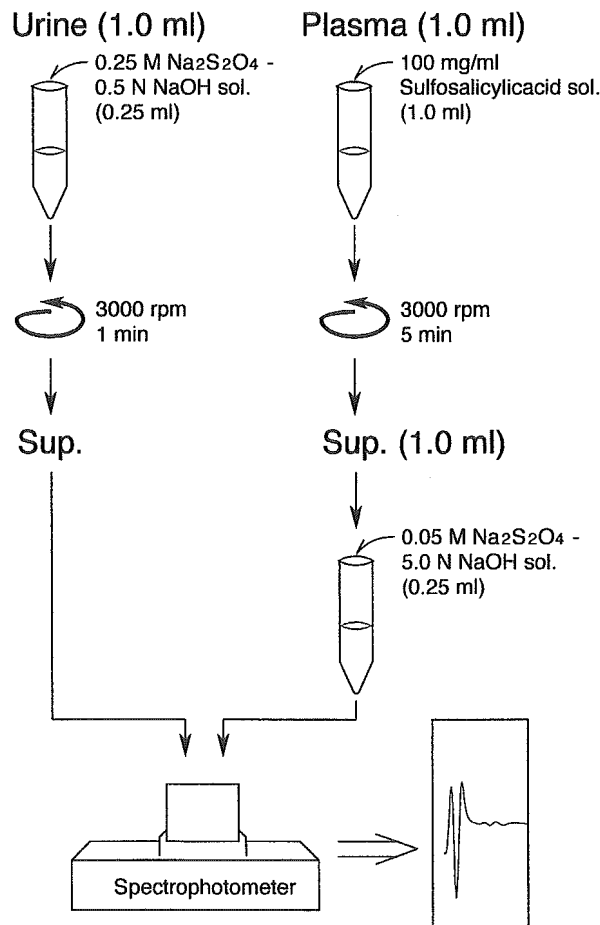


図1 パラコートとジクワットの分光光度計による定量分析のための前処理方法

- (1) 血清試料 1mL にスルホサリチル酸を添加した後、軽くボルテックスミキサーで攪拌する。
- (2) 遠心分離後の上清を 1mL 違う試験管に取り、これに発色試薬を加えボルテックスミキサーで攪拌する。
- (3) 試料をセルに入れ測定する。

3) 分光光度計の条件

装置 : 紫外可視分光光度計 UV-2450 (島津製作所製)
 セル : セミマイクロセル
 測定 : 0 次スペクトル (360~500nm ; 波長間隔 $\Delta \lambda = 0.5\text{nm}$) を測定する。
 このスペクトルを 2 次微分 (微分波長間隔 $\Delta \lambda = 4\text{nm}$) する。

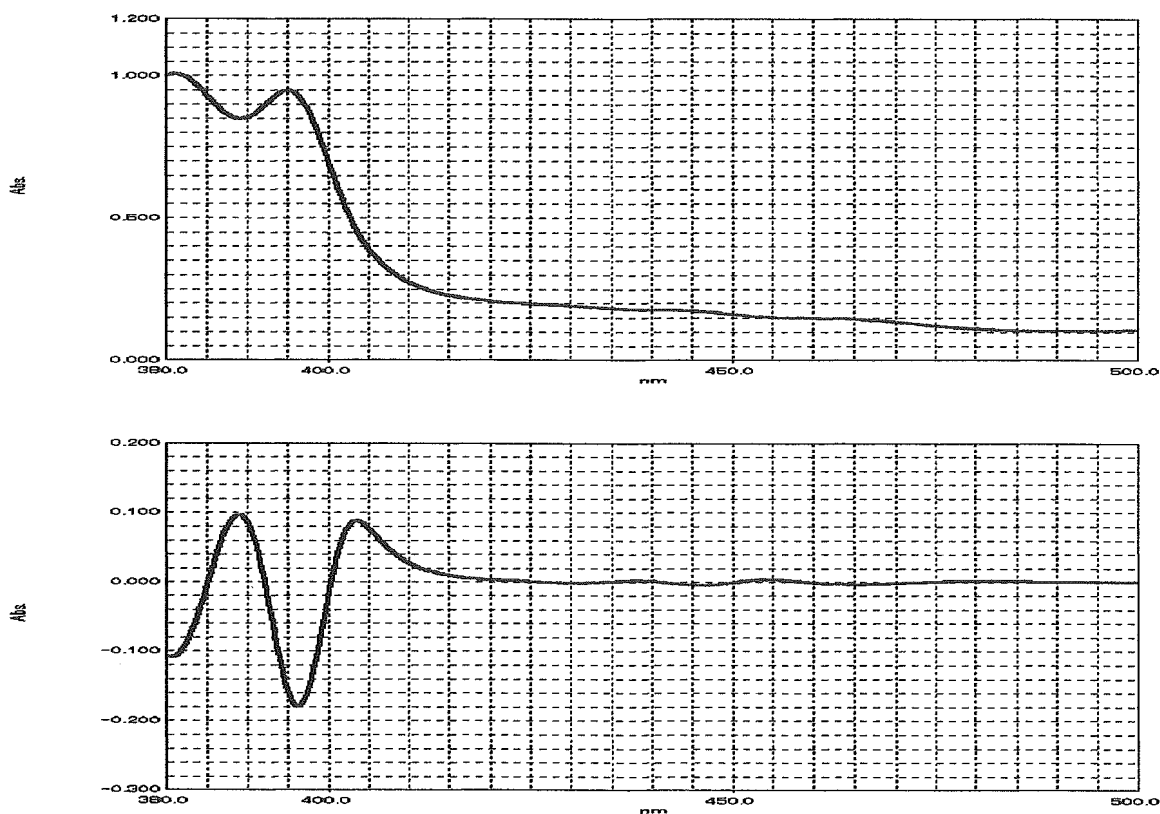


図 2 : 血清中パラコートの 0 次スペクトルと 2 次微分スペクトル
 (濃度はパラコート 10 $\mu\text{g/ml}$ 、ジクワット 10 $\mu\text{g/ml}$)

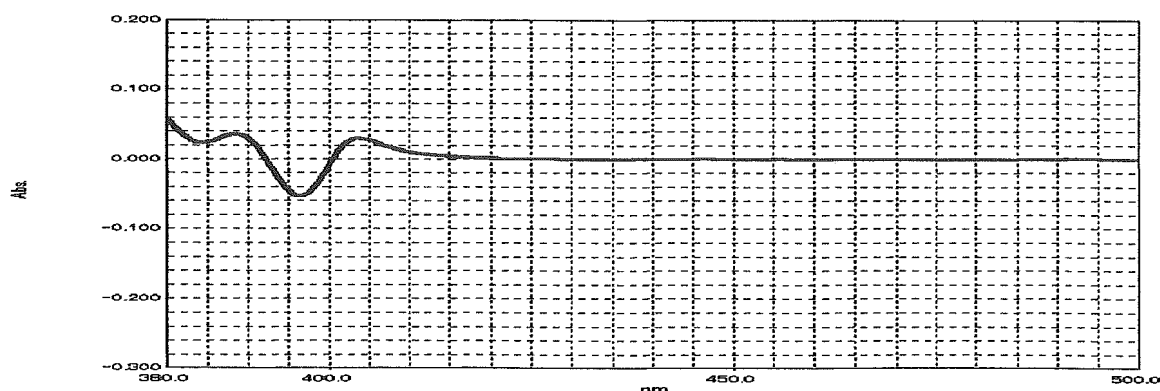


図 3 : 血清中パラコートの 2 次微分スペクトル
 (濃度は定性・定量の項参照のこと)

定性・定量

- (1) パラコートの定性は、定量は 398nm 付近と 403nm 付近の変曲点で定性し、その振幅幅で定量する。
(ジクワットは 437、445、454、464nm の変曲点の有無にて定性し、454 と 464nm の間の振幅幅で定量する。)
- (2) 本クロスチェック試料での血清中のパラコート濃度は下の表のように算出された。
検量線は 0～10.0 μ g/mL の多点検量線法で定量を行った。

表 1. 血清中のパラコートの定量結果

血清中パラコート濃度
3.1mg/mL

- (3) 検量線はブランク試料にパラコート (、ジクワット) を添加したものを試料と同様に処理して作成する。
- (4) 定量範囲 血漿 ; パラコート : 0.5～10.0 μ g/mL (、ジクワット : 1.0～10.0 μ g/mL)
尿 ; パラコート : 0.25～5.0 μ g/mL (、ジクワット : 0.5～5.0 μ g/mL)

<参考文献>

- 1) 福家千昭、飴野清、飴野節子他 : 二次微分分光分析法による血清中および尿中パラコートとジクワットの同時分析法. 医学の歩み 19987 ; 143 : 657 – 658.

血清中のパラコートの HPLC による分析

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、パラコートを分析する手法であり¹⁾、定性能や検出感度は、分光光度計を用いた吸光度法より優れる。イオンペア試薬を用いた移動相と逆相カラムの組み合わせで分離を行い、吸光度検出器 (UV 検出器) で検出する。

吸光度検出器 (UV 検出器) が装備された HPLC であれば、本分析に用いることができる。

1) 試薬と調製

- (1) パラコート標準母液：13.8 mg のパラコート・ジクロライドを 10 ml の水に溶解する (パラコートイオンとして 1 mg/ml)。
- (2) ジクワット標準母液：18.7 mg のジクワット・ジブロマイドを 10 ml の水に溶解する (ジクワットイオンとして 1 mg/ml)。本クロスチェック試験では使用せず。
- (3) 内部標準母液：内部標準法で定量する場合に使用する。10mg のエチルパラコート・ジブロマイド (1,1'-diethyl-4,4'-bipyridinium dibromide : Ethyl viologen dibromide) を 10 ml の水に溶解する (1 mg/ml)。エチルパラコートは、Phillips らの方法²⁾により合成するか、試薬メーカー (Fluka) にて入手できる。
- (4) 除蛋白剤：10 g のトリクロロ酢酸を 100 ml の水に溶解する。

2) 抽出操作法

抽出操作のフローは、図 1 を参照のこと。下記に操作上の注意点を列挙する。

- (1) 内部標準法で定量する場合、血清試料に内部標準物質を添加しておくこと、前処理過程での回収ロスを補正できる。本クロスチェック試験では、血清試料 1mL に、移動相で希釈した内部標準溶液 20 μ g/mL を 0.1mL 添加し (血清中 2 μ g/mL 相当)、図 3 の処理を行った。
- (2) トリクロロ酢酸を添加した後、軽くボルテックスミキサーで攪拌する。
- (3) 遠心分離後の上清の pH を 11 に合わせる際、pH の確認は pH 試験紙程度でよい。pH を 11 に調整後は、特にジクワットが分解する可能性があるため、速やかにカートリッジカラムに注入すること。そのため、カートリッジの活性化 (Preactivate) 作業は、遠心分離作業中などに行っておくこと。
- (4) カートリッジは、Sep-Pak Plus C18 (Waters 社製) が使用できる。
- (5) カートリッジへの通液速度は、液滴で落ちる程度の流速で行う。
- (6) 最後の濃縮過程では、希塩酸をとばすため、真空度が十分に確保されたロータリーエバポレータでないと乾固できない。ロータリーエバポレータを使用する場合は、希塩酸を濃縮できるか、事前に確認しておくこと。凍結乾燥機などを持ちいることができる。
- (7) 本法では、1mL の血清試料が、最終的には 100 μ L の溶液となるため、10 倍濃縮されることになる。本クロスチェック試験では、パラコート濃度が比較的濃いため最終液量を 3mL とした (血清中のパラコートは、前処理後の最終溶液では、3 倍希釈されたことになる)。
- (8) 濃縮操作を省略し、カートリッジから溶出した希塩酸溶液を HPLC に注入することもでき、迅速分析には向いているといえる。ただし、1mL の血清試料が最終的には 4mL の希塩酸となるため、4 倍希釈されることになり、低濃度試料での定量は難しい。

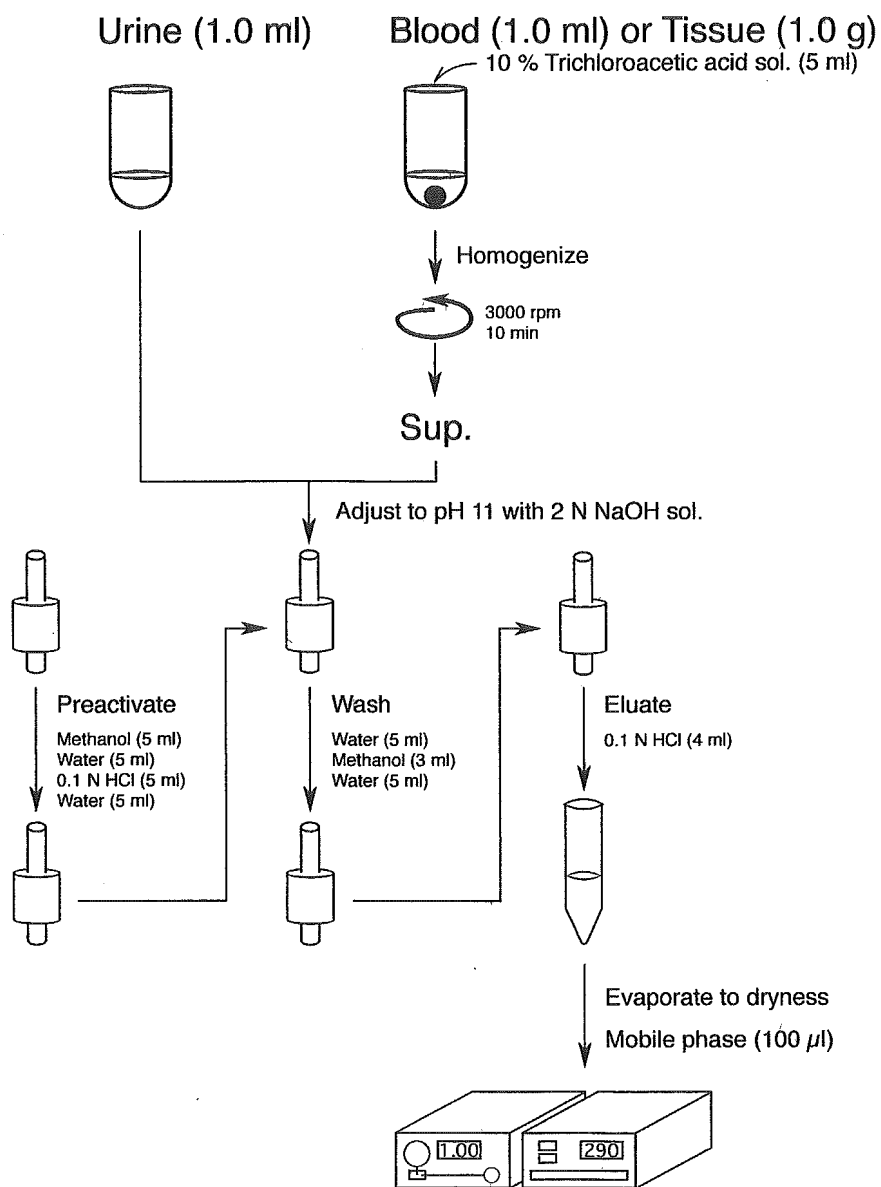


図1 固相抽出によるパラコートとジクワットの前処理操作
 (本クロスチェック試験では、最終の移動相溶解液量を3mLとした)

3) HPLC の条件

装置	: 液体クロマトグラフ LC-2010 with CLASS-VP システム (島津製作所製)
検出波長	: 290nm
カラム	: Zorbax C ₈ (4.6 ID x 250 mm, 5 μm)
オープン温度	: 40 °C
移動相	: 7.5 mM オクタンスルホン酸ナトリウム、0.1 M ジエチルアミン、0.2 M リン酸を含む 12%アセトニトリル溶液*
流速	: 1 ml/min
注入量	: 20 μl
リンス液	: 水/アセニト=9/1(v/v)。水でも可。

*カラムの履歴や状態により、パラコートの溶出時間は変動する。そのため、事前に溶出時間を抑えておくこと。溶出が遅い場合は、アセトニトリルの量を若干増やし、早い場合はその逆となる。

<移動相の調整方法>

1. オクタンスルホン酸ナトリウム 7.5mmol (MW. 216.28g. 1.62g) を 1L メスフラスコにとり純水 800mL に溶解させる。
2. ジエチルアミン 0.1mol (MW 73.14、比重=0.705g/mL、10.37mL) を加え、溶解させる。
3. リン酸 0.2mol (MW.98.00、比重=1.685g/mL、85%りん酸を 13.68mL) を加え溶解させる。
4. アセトニトリル 120mL を加えよく混ぜる。
5. 純水で 1L にメスアップする。
6. よく振り混ぜたのち、超音波洗浄器にかけながら、アスピレータで減圧脱気する。20秒程度で良い。

<検量線用標準試料調整方法>

1. 「1.試薬と調整」の項で作成したパラコート及びジクワットの母液を順次希釈し、標準品の希釈系列を作成する。希釈液は移動相を使用する。直線性は良いため、本クロスチェック試験では、4 μg/mL の一点検量で定量を行った。
2. 内部標準法で定量を行う場合は、標準品希釈系列にエチルパラコートも含めること。希釈系列の各標準溶液において同一の内部標準濃度になるようにする。本クロスチェック試験では、検量線用標準液、血清試料とも 2 μg/mL とした。