

図2 パラコート標準品及びエチルパラコート標準品のクロマトグラム
(濃度はパラコート 4 $\mu\text{g/ml}$ 、エチルパラコート 2 $\mu\text{g/ml}$)

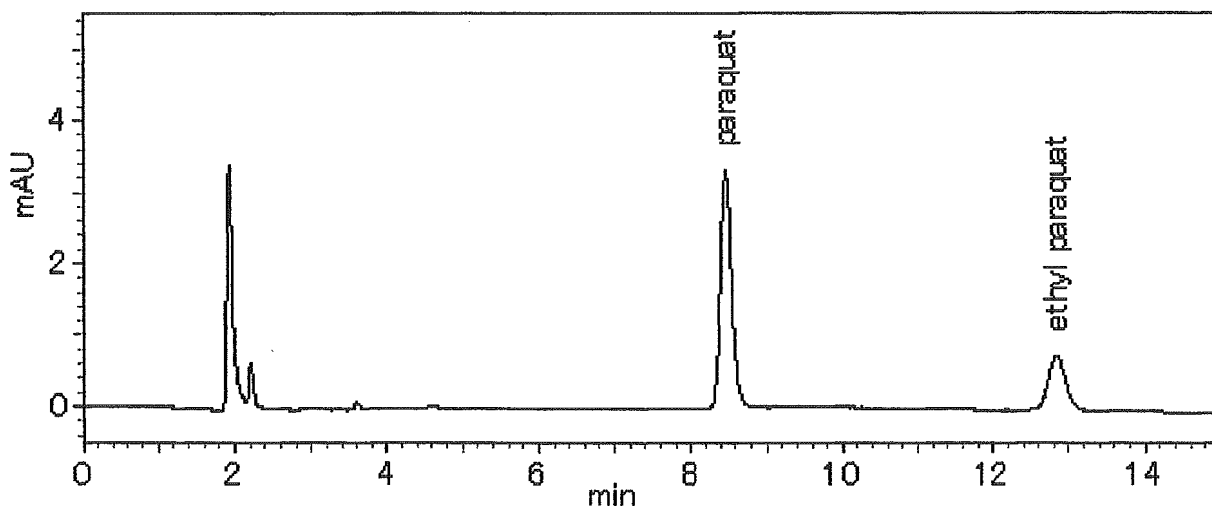


図3 血清中のパラコート及びエチルパラコートのクロマトグラム
(血清試料中のエチルパラコート 2 $\mu\text{g/ml}$ 、パラコート濃度は、定性・定量の項を参照のこと)

定性・定量

- (1) 本分析条件でパラコートは 8.5 分、エチルパラコートは 12.8 分に出現した (ジクワットは 9.5 分)。分析装置、分析カラムなどの違いや、カラムの履歴などにより分離状態や保持時間は変動する。そのため、事前にパラコート及びジクワット単品の標準液で、溶出位置をおさえておくこと。溶出時間は、移動相中のアセトニトリルの添加量によりコントロールできる
- (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。絶対検量線法では、パラコート 4 $\mu\text{g/ml}$ の一点検量線にて定量を行った。内部標準品のエチルパラコートは、標準溶液、血清試料とも 2 $\mu\text{g/ml}$ を添加した。

表 1. 血清中のパラコートの定量結果

	血清中のパラコート濃度
絶対検量線法	3.2 $\mu\text{g/ml}$
内部標準法	2.8 $\mu\text{g/ml}$

- (3) 標準溶液を移動相で希釈し、検量線を作成したところ、パラコートは 0.1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性が得られた (ジクワットも同様である)。
- (4) パラコートとジクワットの検出下限は注入量で 0.5 ng である。
- (5) 本固相抽出によるパラコート、ジクワット、エチルパラコートの回収率は 80 %以上である。

<参考文献>

- 1) 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及び臓器・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 1992; 5: 387 - 393.
- 2) Phillips AP, Mentha J: Synthetic hypotensive agents. III. Some 4,4'-bipiperidenes. J Am Chem Soc 1955; 77, 6393-6395.

GC/MS 法による血中パラコート分析

【目的】

血清に含まれるパラコートを GC/MS を用いて分析することを目的とする。パラコート分析に関する報告はすでに数多く行われており、特に HPLC を用いる方法が多い。また、環境庁告示法も HPLC を用いる方法を採用している^{1,2)}。本検討の目的である GC/MS を用いる方法に関しては、測定を行うために誘導体化処理が必要で困難であるためか報告は少ないが、GC を用い生体試料を実試料として選択した報告^{3,4)}を参考に検討を行った。

【参考文献】

1. 荘村 多加志, 農薬残留分析法研究班.: 最新農薬の残留分析法, 467-469
2. 上路 雅子, 小林 裕子, 中村 幸二.: 2002 年版 残留農薬分析法, 183-186
3. Draffan, G. H., Clare, R. A., Davies, D. L., Hawksworth, G., Murray, S., Davies D. S.: Quantitative determination of the herbicide paraquat in human plasma by gas chromatographic and mass spectrometric methods. *J. Chromatogr.*, 139: 311-320 (1977)
4. Kawase, S., Kanno, S., Ukai, S.: Determination of the herbicide paraquat and diquat in blood and urine by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 283: 231-240 (1984)

【GC-MS 分析条件】

<GC 部条件>

使用機器 : 島津製作所製 GCMS-QP5050A
カラム : J&W社 DB-5MS (I.D. 0.25mm×L.30m,df. 0.25 μ m)
カラムオープン温度 : 50°C(1min) → 200°C → 300°C (5min)
10°C/min 20°C/min
インターフェイス温度 : 270°C
注入口温度 : 240°C
キャリアーガス : He 52.8 kPa
導入法 : スプリット (1:20)
注入液量 : 1 μ l

<MS 部条件 (SCAN)>

イオン化法 : EI
イオン化電圧 : 70 eV
スキャンレンジ : m/z 40 — 600
モニターイオン

測定物質名	測定イオン(m/z)	参照イオン(m/z)
パラコート誘導体化物 ① (MW 192)	192	96
パラコート誘導体化物 ② (MW 194)	194	96
パラコート誘導体化物 ③ (MW 196)	196	96

【検討結果と考察】

1. 標準品誘導体化の検討

標準品を用いて誘導体化の確認を行った。標準品の誘導体化から分析までの操作手順を図 1 に示した。

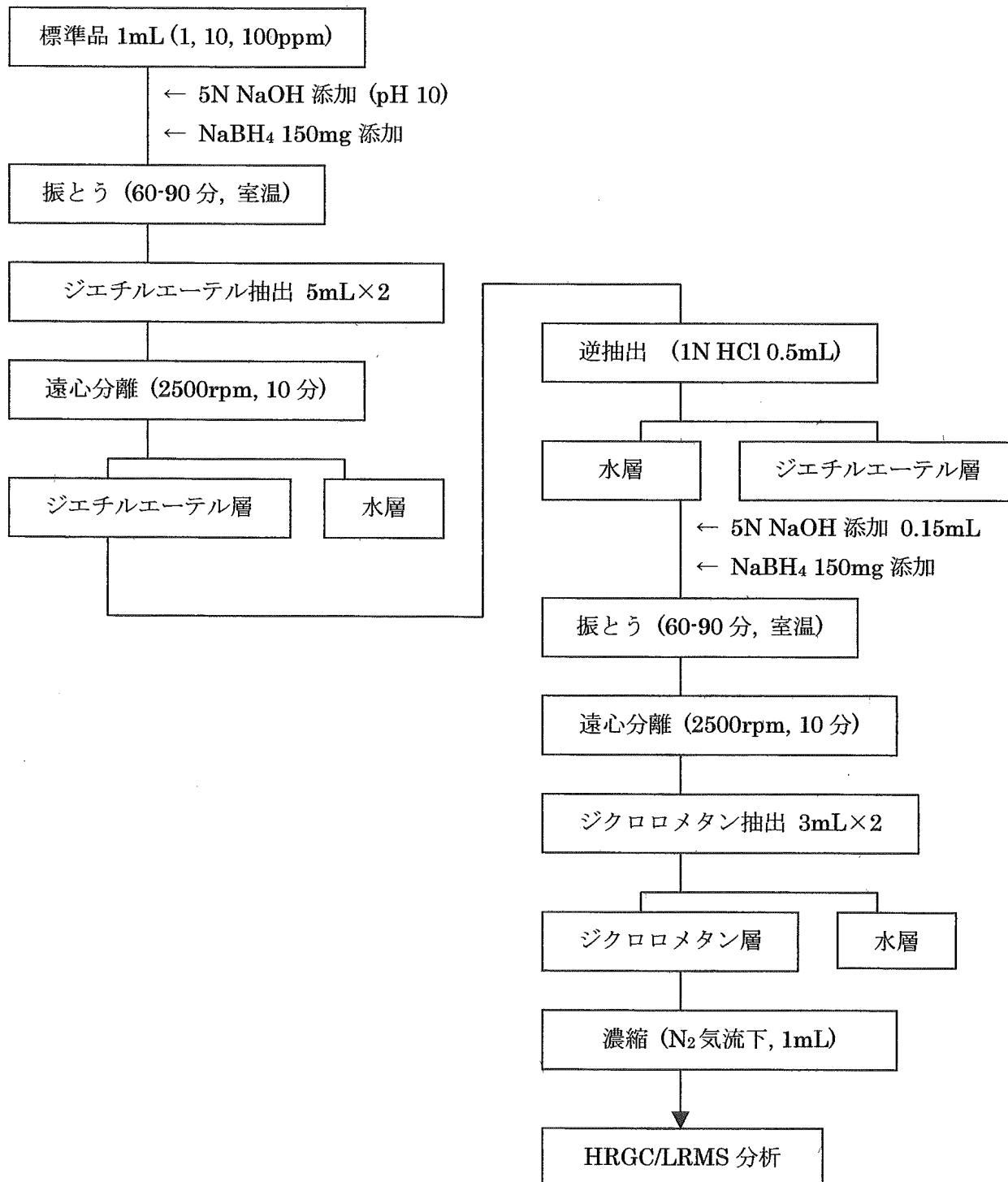
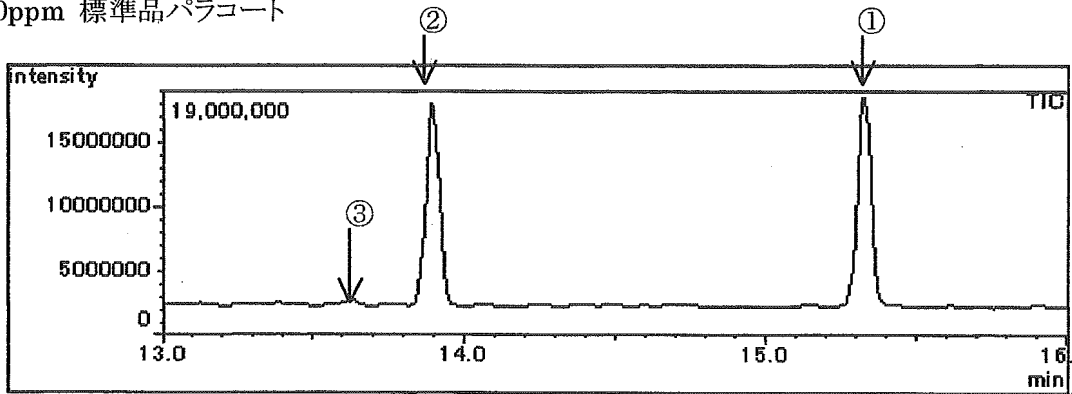


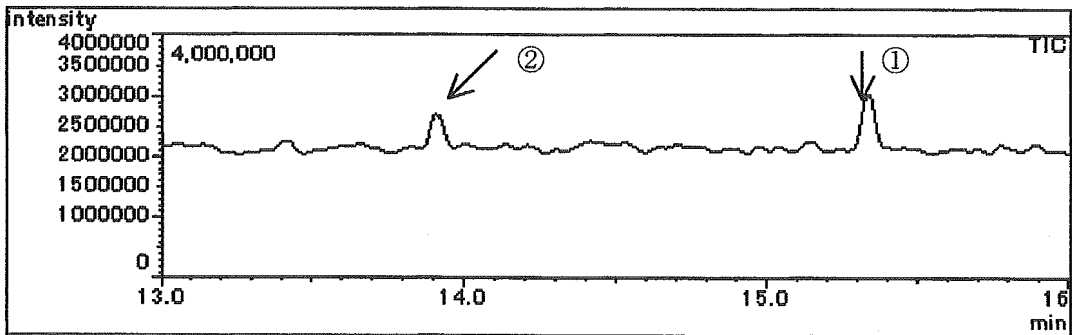
図 1. パラコート誘導体化確認用操作手順

図1の操作で得られた最終濃縮液を HRGC/LRMS に 1 μ l 注入し SCAN 分析を行った。結果を 図 2, 3 に示した。

100ppm 標準品パラコート



10ppm 標準品パラコート



1ppm 標準品パラコート

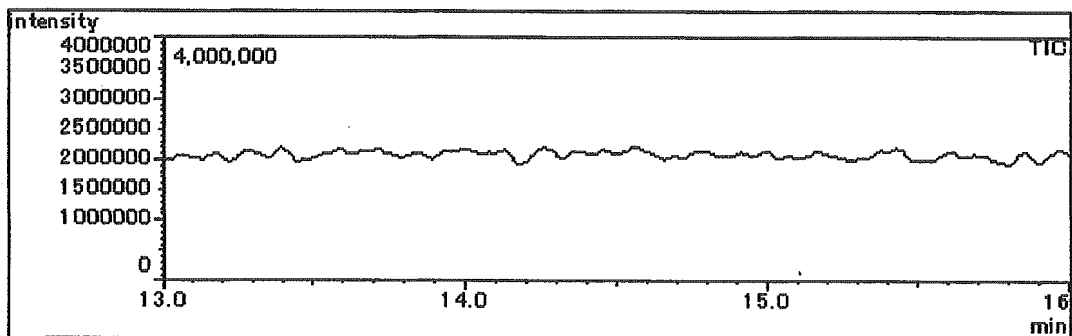
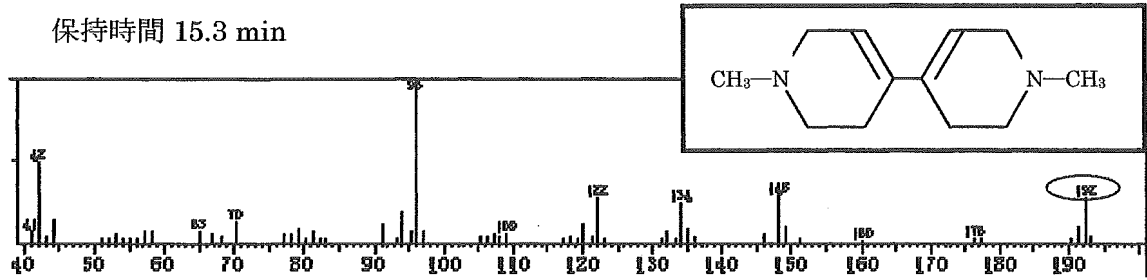


図 2. 各濃度の標準品の TIC クロマトグラム(SCAN)

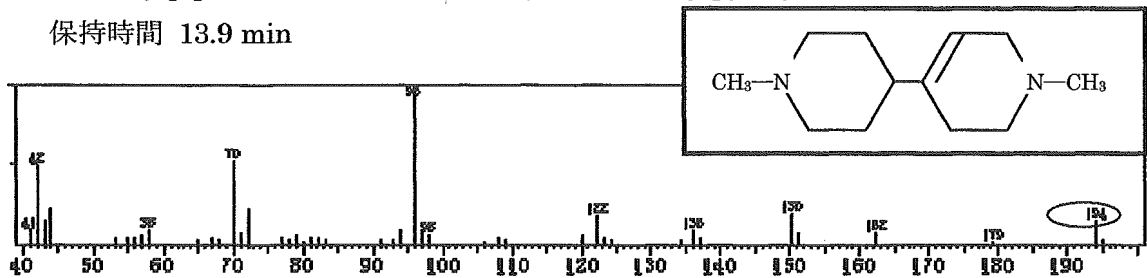
① 4,4'-Bi-(1,2,3,6-tetrahydro-1-methylpyridyl)

保持時間 15.3 min



② 1-methylpiperidine-4-(1,2,3,6-tetrahydro-1-methylpyridyl)

保持時間 13.9 min



③ 1,1'-dimethyl-4,4'-bipiperidine

保持時間 13.6 min

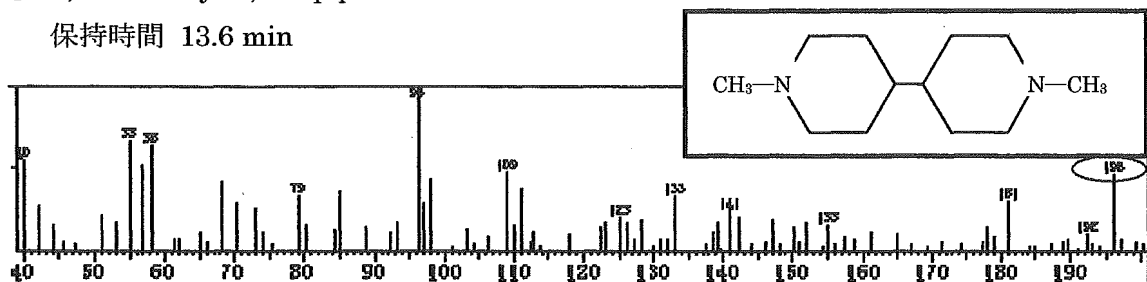


図 3. 各ピークのマスペクトル

SCAN 分析結果から、主に次の 3 種の誘導体化物が生成されていることが考えられた。

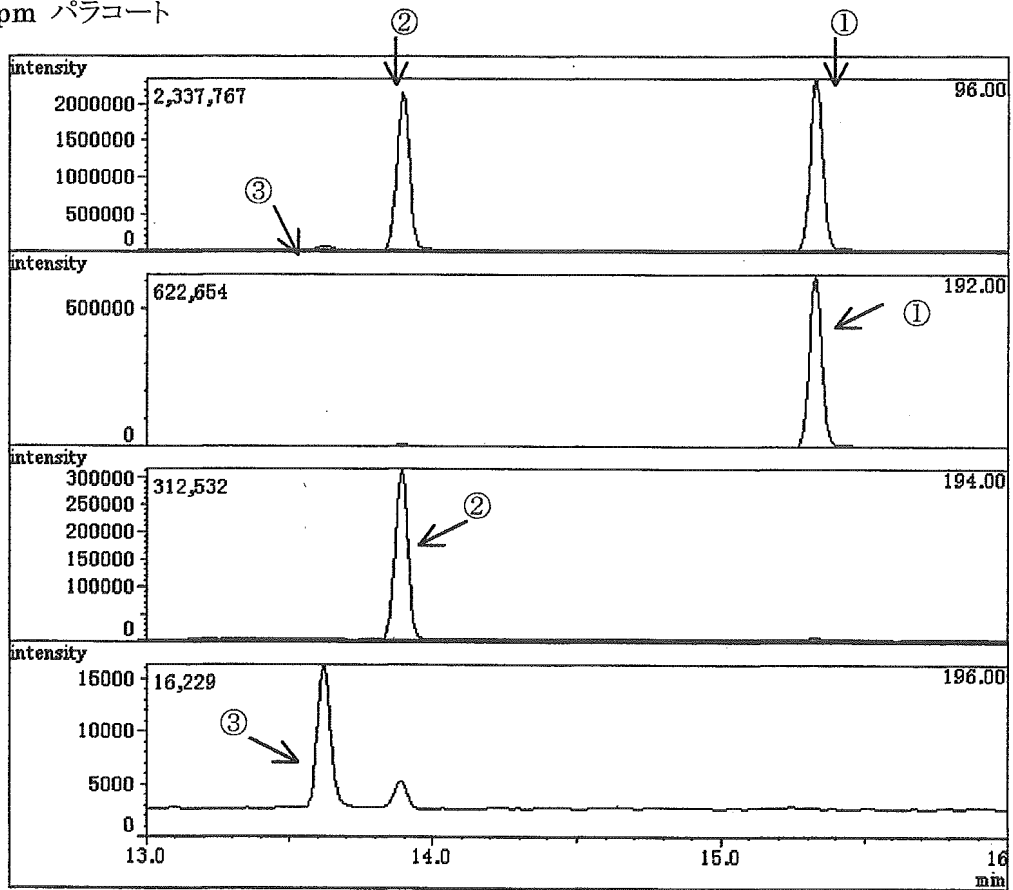
① 4,4'-Bi-(1,2,3,6-tetrahydro-1-methylpyridyl)

② 1-methylpiperidine-4-(1,2,3,6-tetrahydro-1-methylpyridyl)

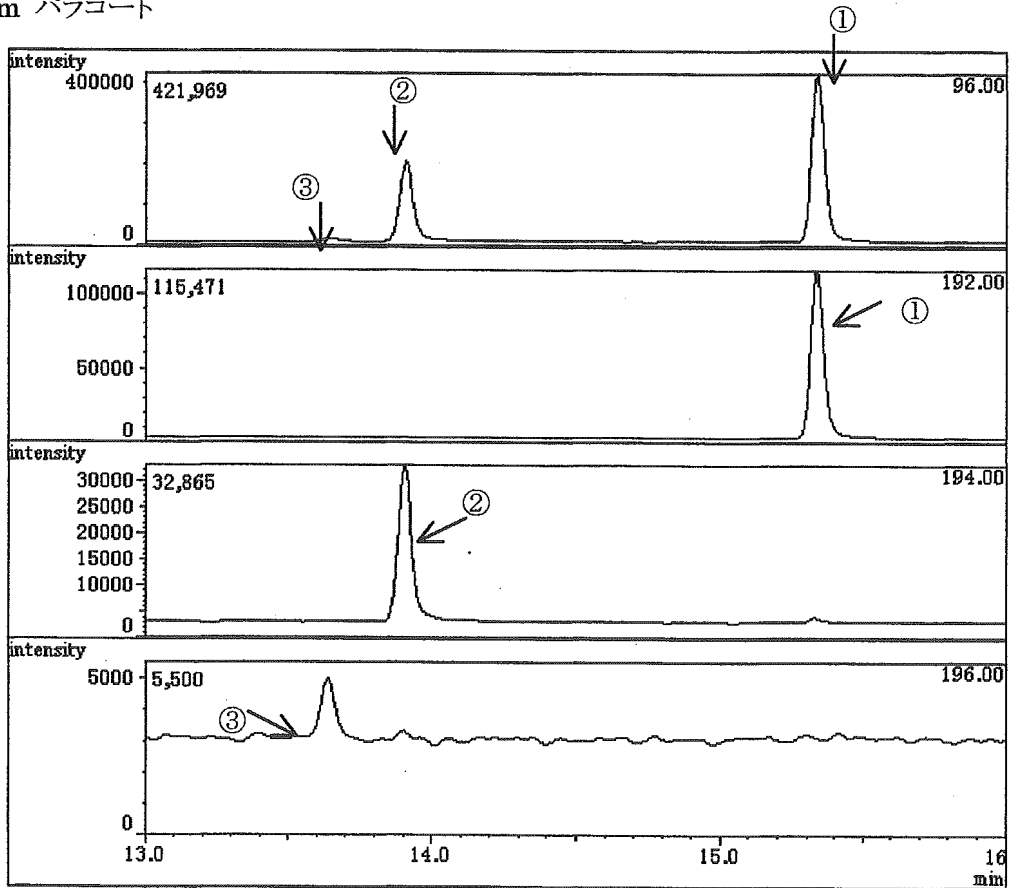
③ 1,1'-dimethyl-4,4'-bipiperidine

次に図 1 の操作手順に従って 1, 10, 100ppm の標準品を処理し、各濃度の標準品からの誘導体化物の SIM 分析を行った。測定イオンとして選択したモニターイオンはそれぞれの誘導体化物の分子量である 192, 194, 196 を選択した。また、参照イオンとしてはそれぞれのマスペクトルのベースピークである 96 を選択した。各濃度の標準品を分析したときのクロマトグラムを図 4 に示した。また、3 種の誘導体化物の測定イオンから得られたピーク面積値を合計した総ピーク面積値をパラコート誘導体化物のピーク面積値としたときの標準品の各濃度とピーク面積の検量線を図 5 に示した。

100ppm パラコート



10ppm パラコート



1ppm パラコート

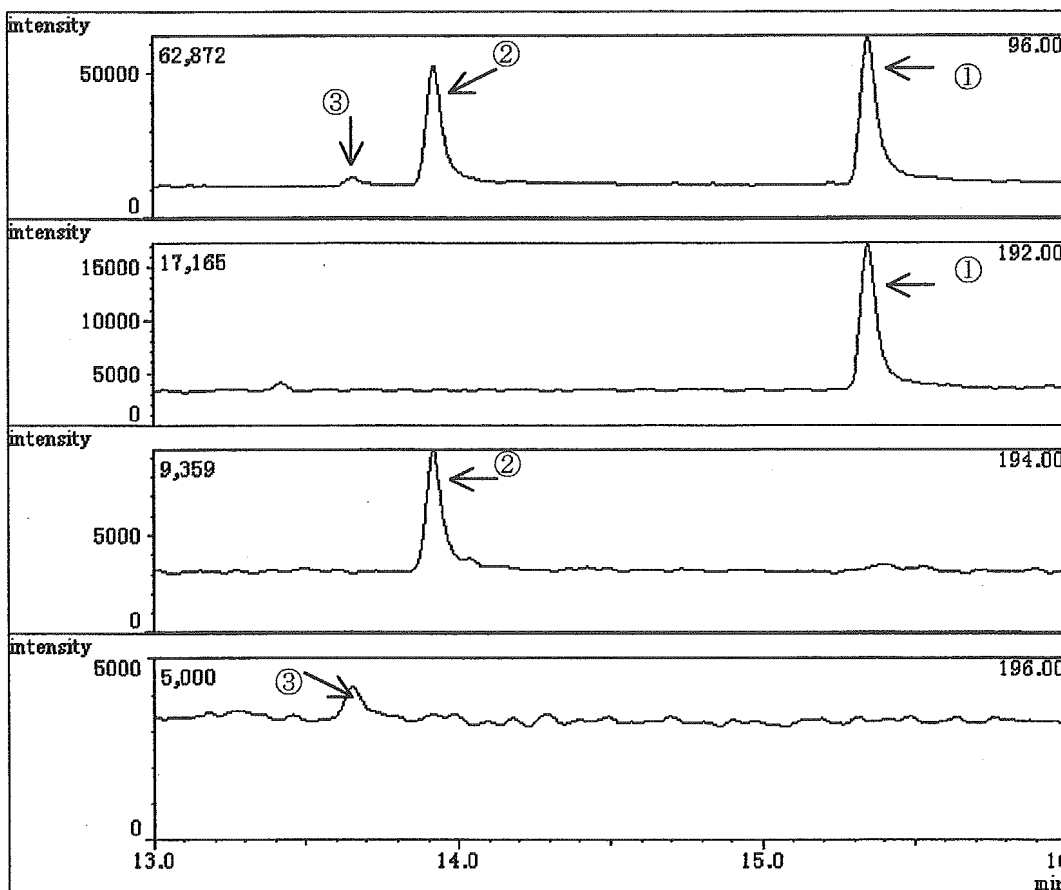


図 4. パラコート誘導体化物のクロマトグラム

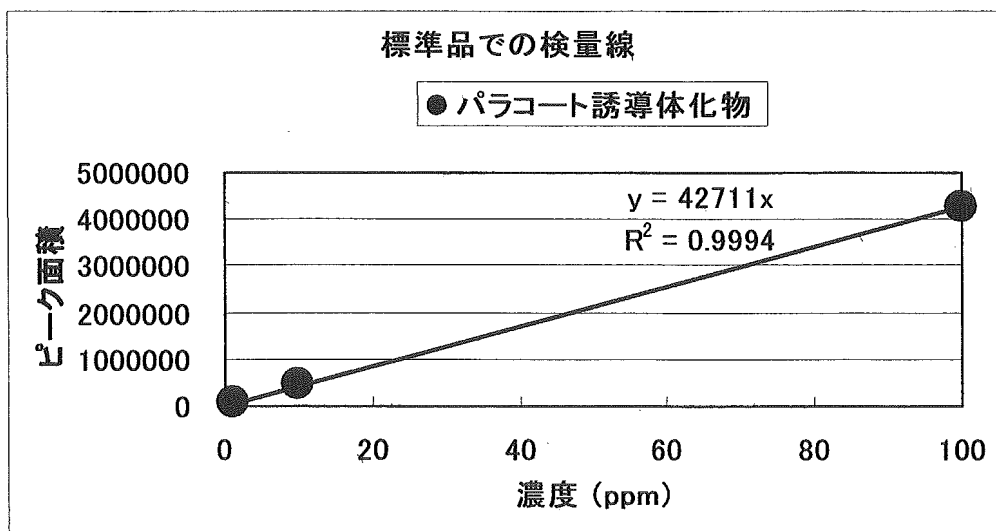


図 5. 標準品でのパラコート誘導体化物の検量線

パラコートの誘導体化物については、3 種類の生成された化合物が確認された。この 3 種の誘導体化物の測定イオンから得られたピーク面積値の合計した総ピーク面積値をパラコート誘導体化物のピーク面積値と濃度との検量線を作製し、良好な相関が得られた。

2. 標準品添加血清での検討

コントロール血清 1mL に標準品 100ul を添加し分析を行った。標準品添加血清での操作を図 6 に示し、結果を表 2 に示した。また、10ug 相当の標準品パラコートを追加した血清を図 6 に示す操作で処理したときのクロマトグラムを図 7 に示した。

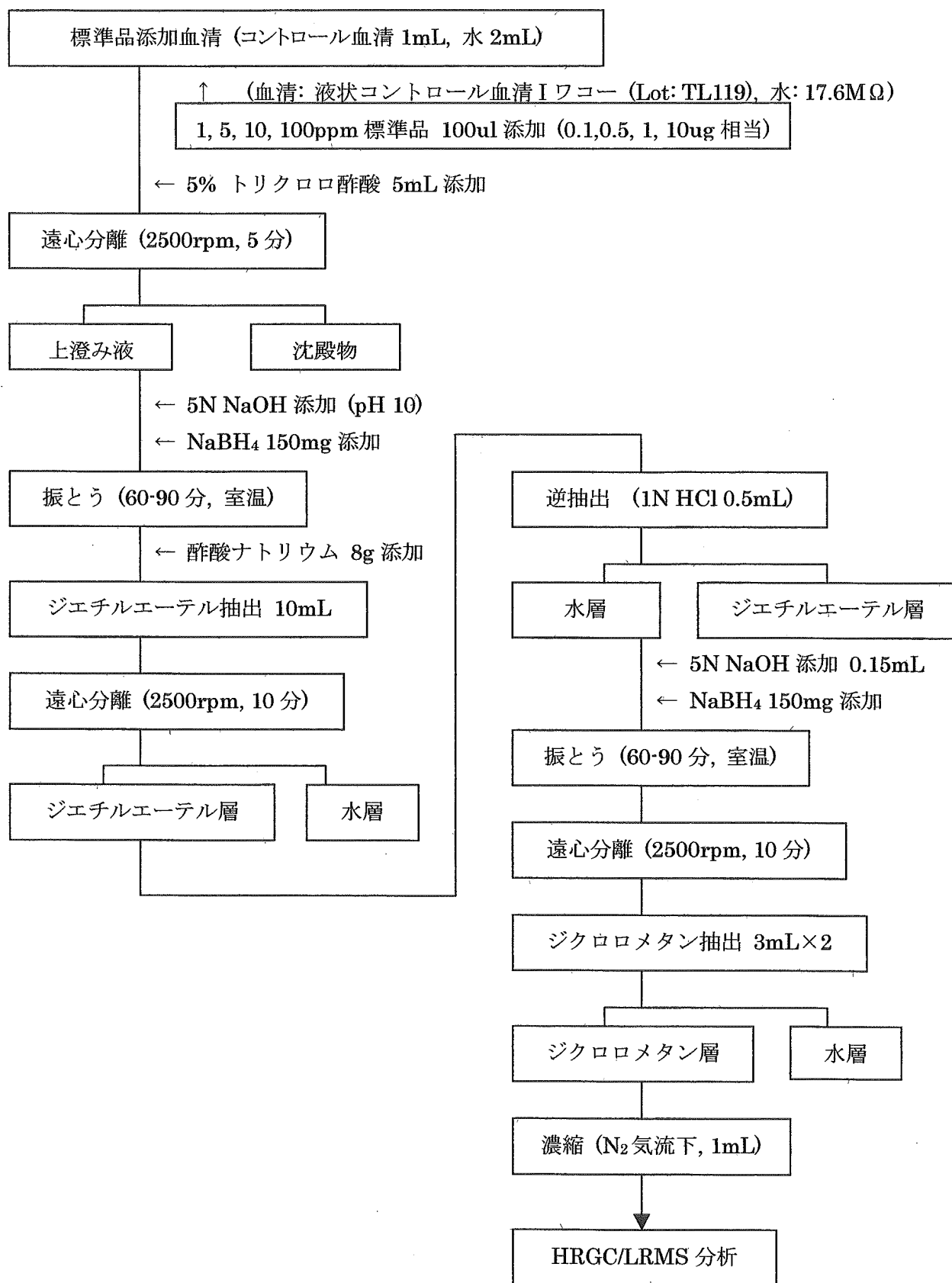


図 6. 標準品添加血清での除タンパク及びパラコート誘導体化処理の操作手順

表 2.標準品添加血清での試験結果

標準品添加絶対量	実測バイアル中絶対量	回収率
0 ug (コントロール血清ブランク)	ND	—
0.1 ug	0.087 ug	87 %
0.5 ug	0.48 ug	96 %
1.0 ug	0.94 ug	94 %
10.0 ug	9.9 ug	99 %

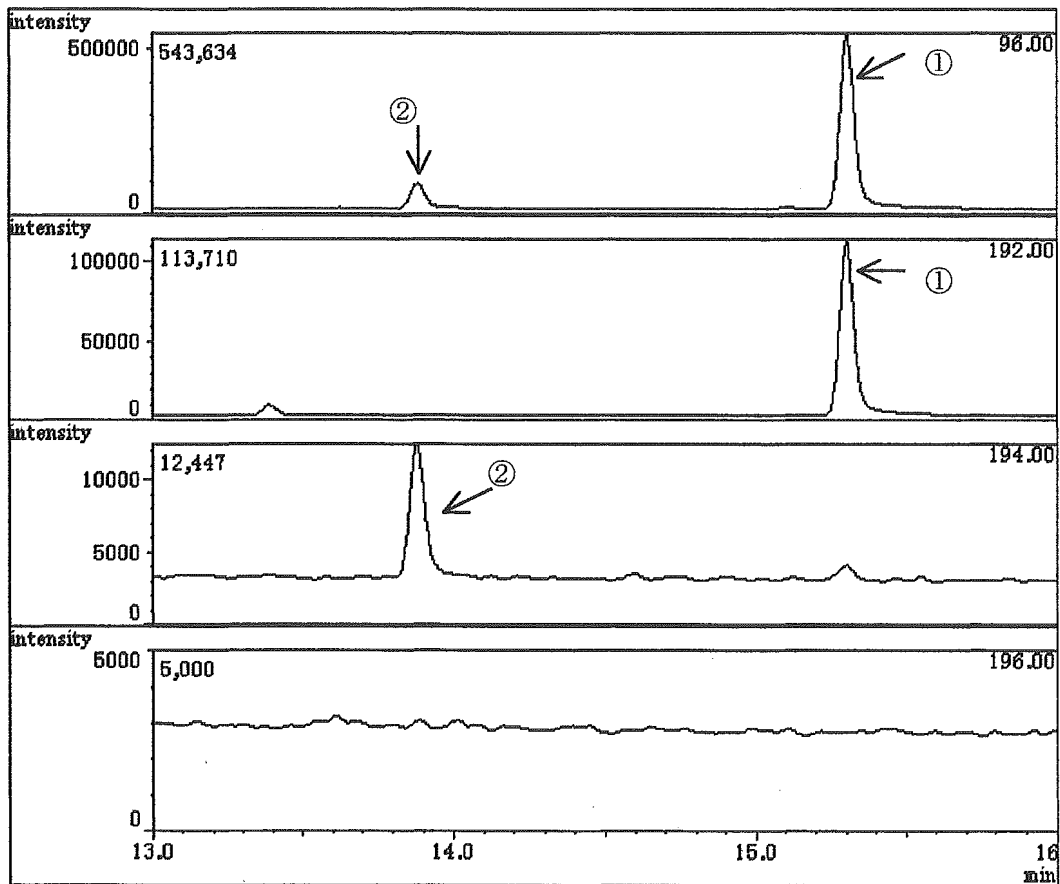


図 7. コントロール血清に標準品を 10ug 相当添加したときのクロマトグラム

コントロール血清に標準品を添加し回収率を調査したところ、すべての標準品添加血清において 85%以上の良好な回収が得られた。また、分析対象成分を妨害する成分も見られず、除タンパク処理及び誘導体化条件も適当であることが確認された。

また、これらの結果を用いて標準品添加血清での検量線を作成した。検量線の作成方法は図 5 と同様であり、得られた結果を 図 8 に示した。

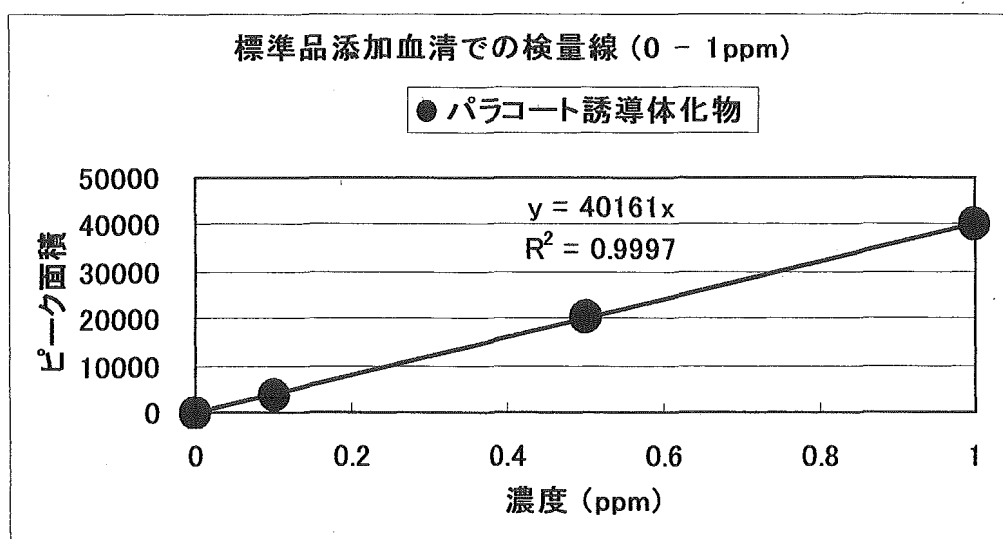
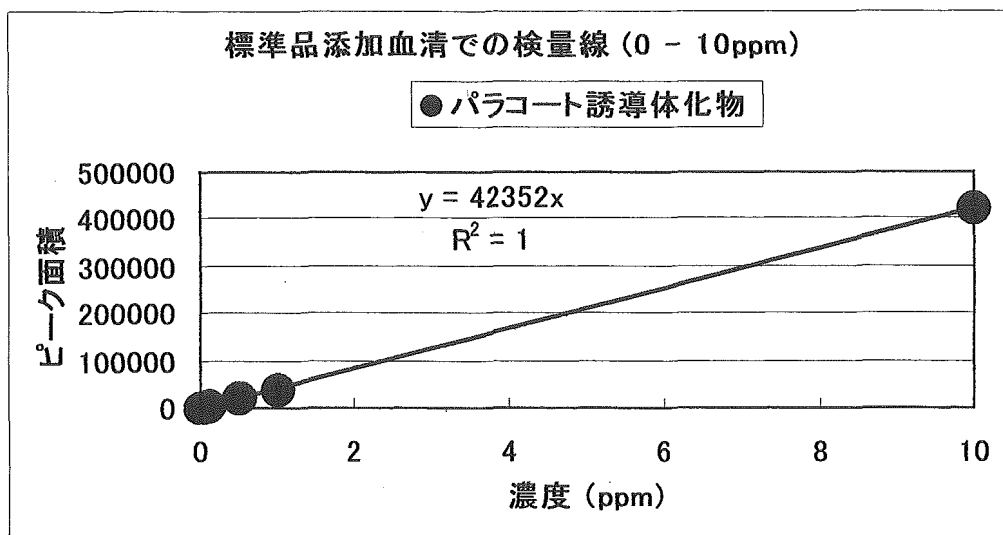
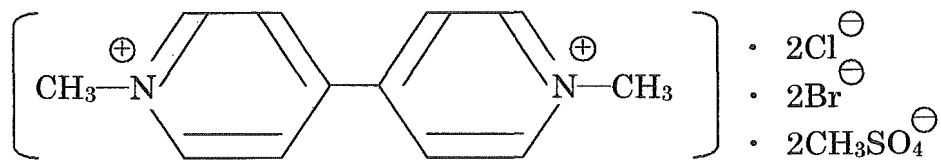


図 8. 標準品添加血清での検量線

図 8 より明らかなように、標準品を添加した血清においても図 5 と同様に良好な検量線が得られた。また、本検討で得られた検出限界は最終 GC/MS 分析用バイアル中濃度で 0.1ppm であり、定量下限値は 0.5ppm であった。

なお、本検討では採用しなかったが、1 つの誘導体化物のみを生成する誘導体化法も報告されている⁴⁾。参考までにこの方法の概略を図 9(参考資料)に示した。

Paraquat dichloride

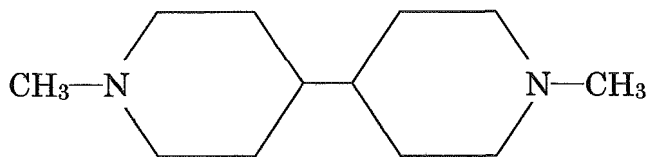


Add 1ml of 1.0% Reinecke reagent ($\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$).
Stand for 1h at room temperature.
Centrifuge at 1200g.

Reineckate complex



Add 2 ml of 0.3 M HCl.
Add 1 ml of 0.2 M nickel (II) chloride solution.
Add 0.5 ml of Toluene.
Add 1 ml of 2.6 M sodium borohydride solution at 15°C.
Stand for 1h at room temperature.



Extract four times with 2 ml of diethyl ether.
Dry over anhydrous potassium carbonate.
Acidify with a few drops of trifluoroacetic acid.
Concentrate.

GC/HFID or MS

図9. 誘導体化例

【サンプル血清中のパラコート確認検討】

図 10 に示す操作を行い、コントロール血清 1mL に提供されたサンプル 100ul を添加して n=2 で測定を行った。得られた結果を表 3 に示した。また、サンプル血清及びコントロール血清ブランクの SCAN 及び SIM クロマトグラムをそれぞれ図 11, 12 に示した。

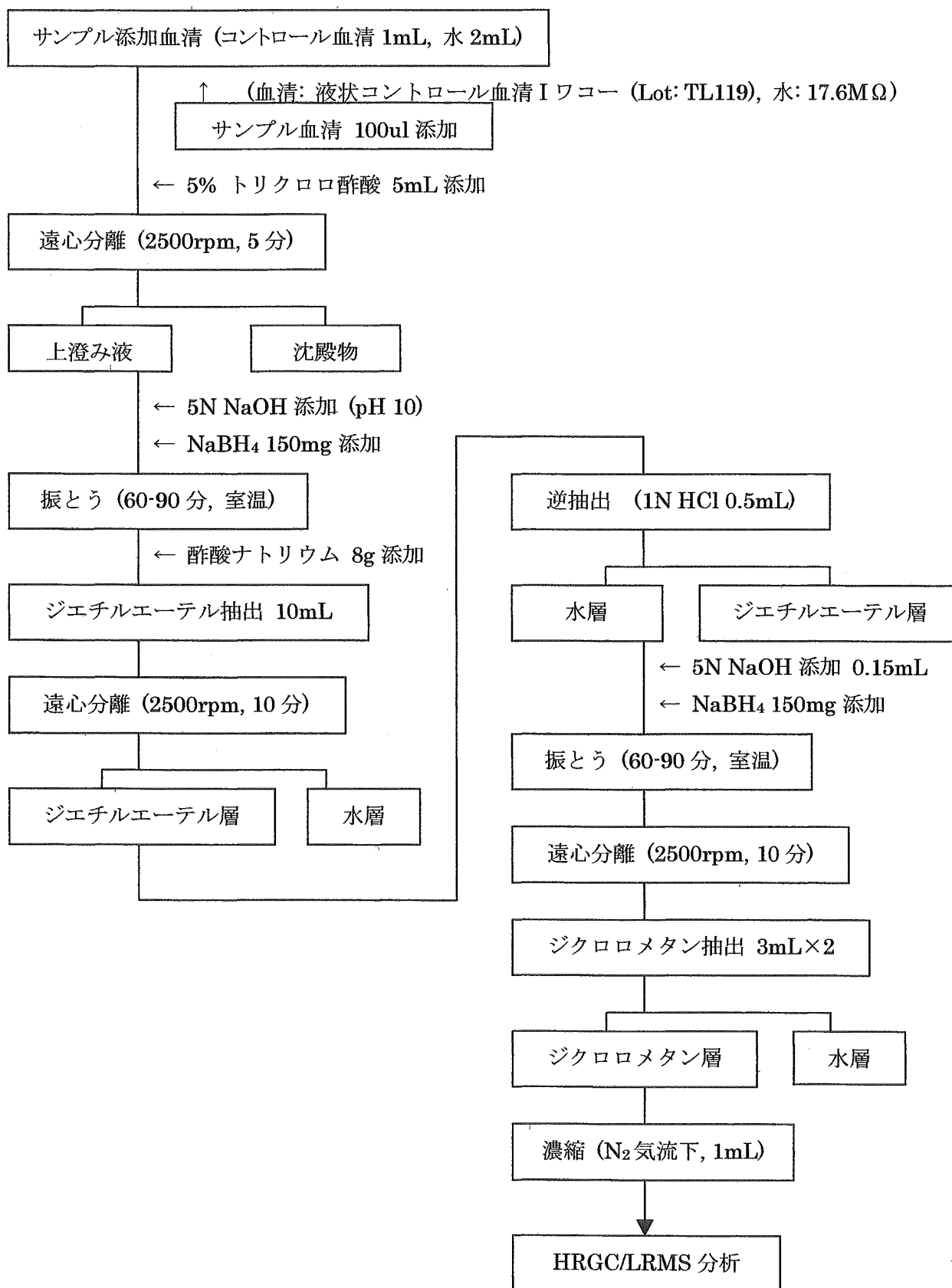
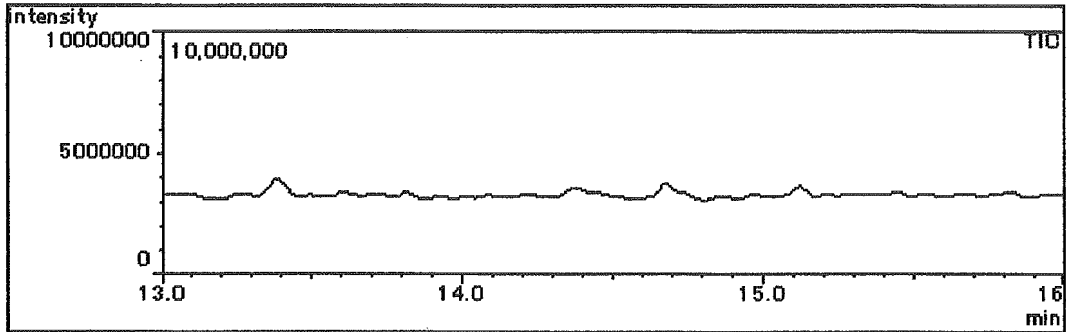


図 10. サンプル血清の除タンパク及びパラコート誘導体化処理の操作手順

表 3. サンプル血清及びコントロール血清の測定結果

	コントロール血清ブランク	サンプル (n-1)	サンプル (n-2)
単位	ppm	ppm	ppm
パラコート	ND	9.0	7.4

SCAN TIC クロマトグラム (サンプル)



SIM クロマトグラム (サンプル)

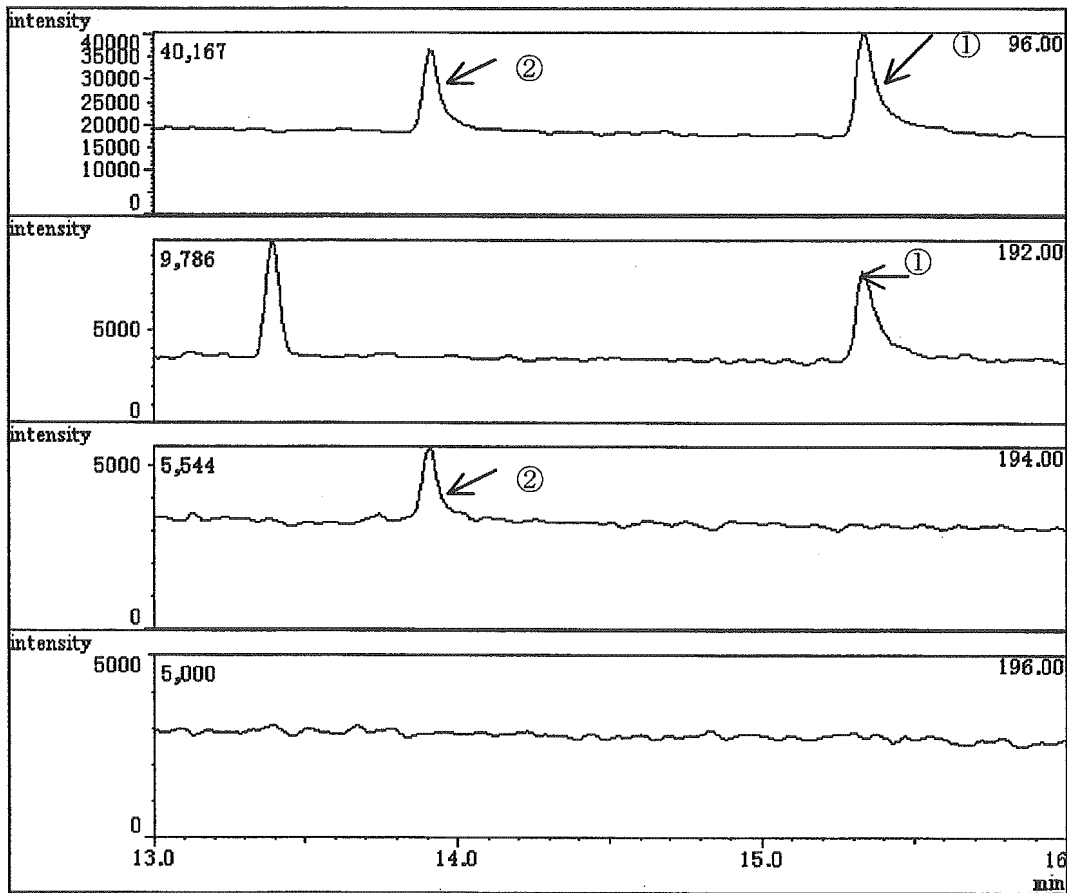
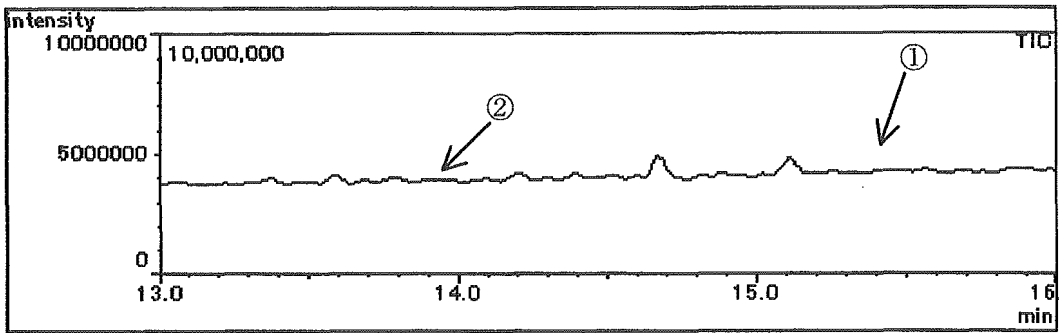


図 11. サンプル血清の SCAN 及び SIM クロマトグラム

SCAN TIC クロマトグラム (コントロール血清ブランク)



SIM クロマトグラム (コントロール血清ブランク)

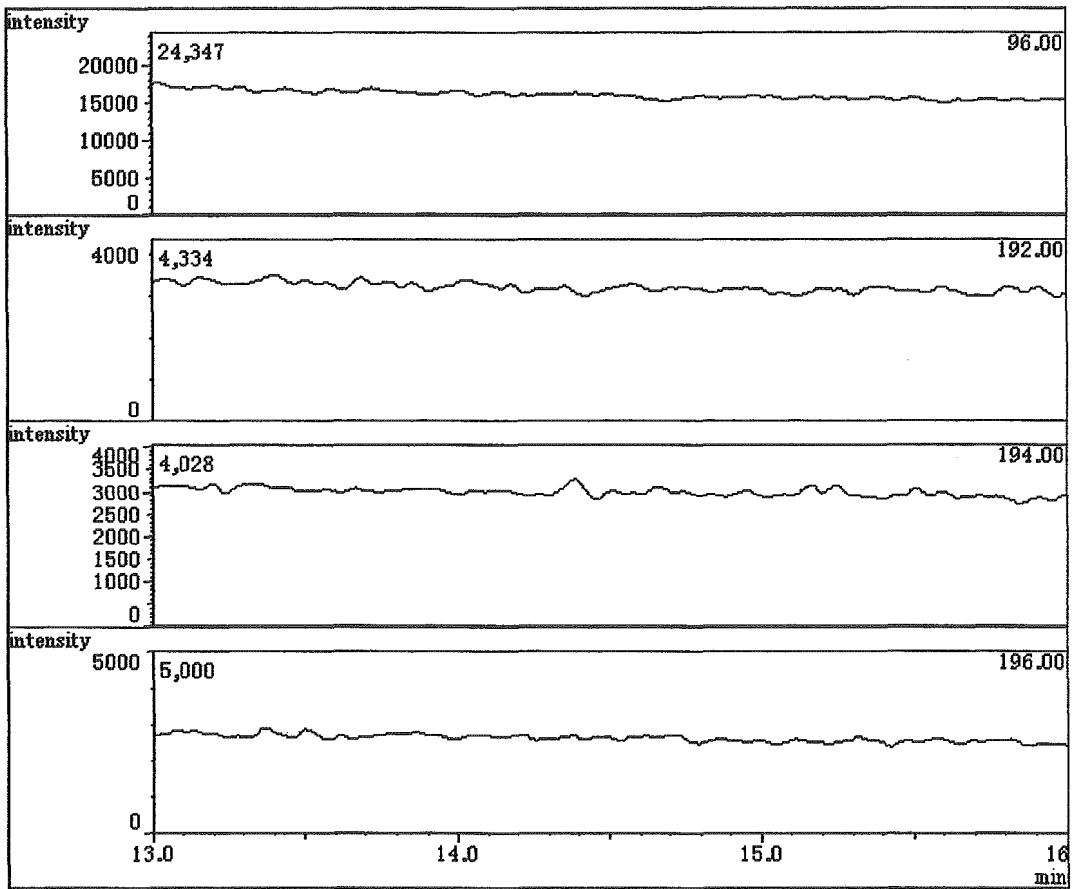
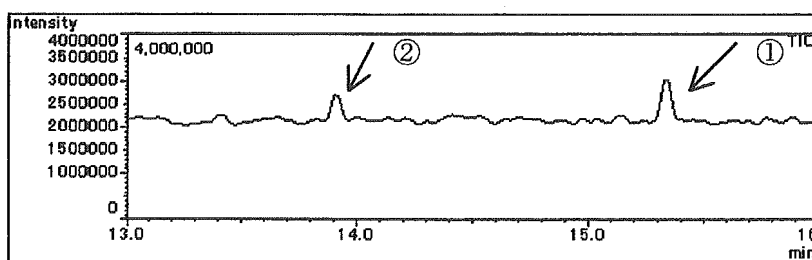


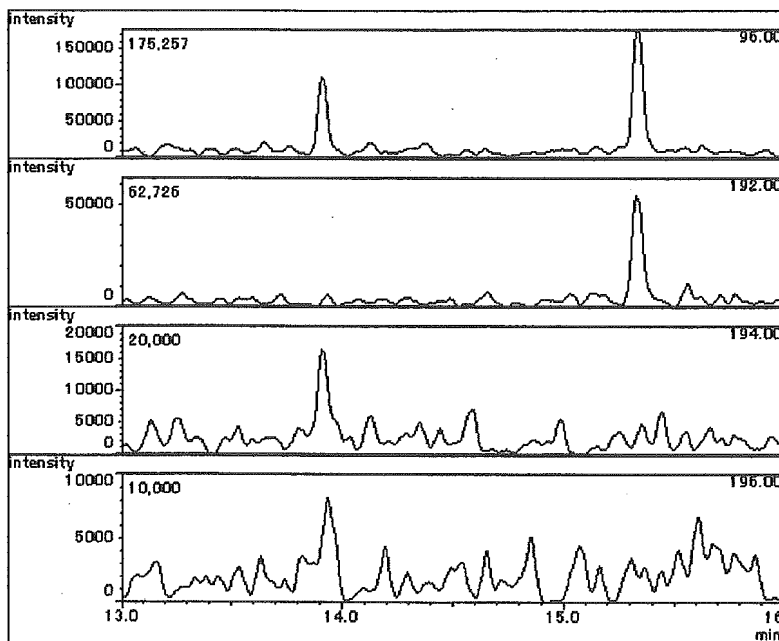
図 12. コントロール血清ブランクの SCAN 及び SIM クロマトグラム

分析結果から、サンプル血清中にはパラコートが確認された。なお、ブランクとして用いたコントロール血清中にはパラコートの存在は確認されなかった。

SCAN—TIC クロマトグラム 10ppm 標準品



SCAN—マスクロマトグラム 10ppm 標準品



SIM—クロマトグラム 10ppm 標準品

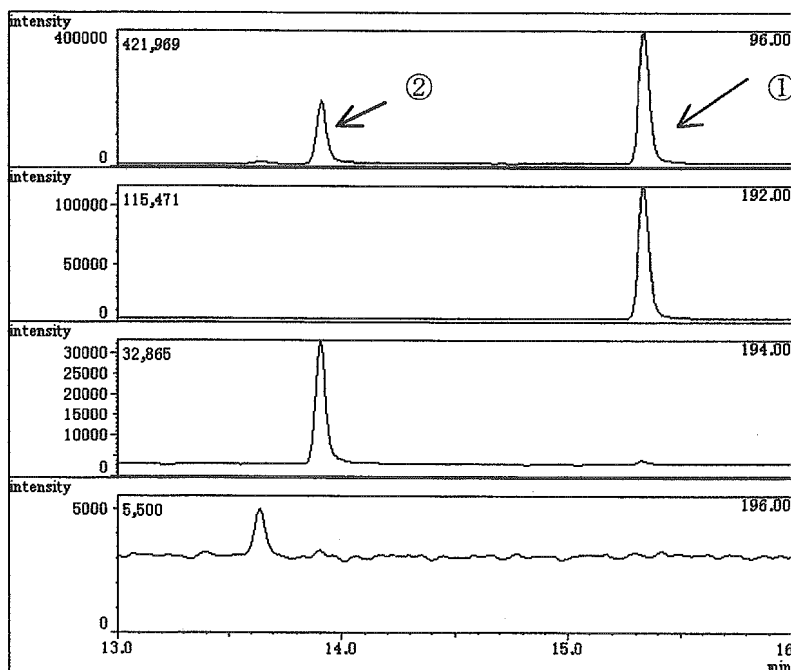


図 13. SCAN 分析での TIC クロマトグラム及びマスクロマトグラムと SIM 分析でのクロマトグラム

図 13 から明らかなように標準品では SCAN 分析での定性は可能であるが、血清または血漿サンプルではマトリックス成分の影響によりベースラインの上昇や妨害ピークの出現等の問題もあり、血中 10ppm 程度のパラコートで SCAN 分析で定性・定量することは困難であると考えられる。一方、SIM 分析では同定するモニターイオンに限りはあるが、検出感度が SCAN 分析とくらべて高く、図 11 のような良好なピークが確認され、血中 1ppm 程度のパラコートの存在が確認可能であった。

簡易試験法による血中ヒ素分析

1. 【目的】

人体に取り込まれた重金属の定性試験

<尿中から検出を想定すると>

砒素、水銀が考えられる。

<胃液から検出を想定すると>

砒素、水銀の他、鉛、銅、亜鉛などの重金属も考えられる。

2. 【重金属定性】

試験液(As50ppm)を5mlを試験管に取り、硝酸 0.5ml および 0.5%硫化ナトリウム(Na_2S)溶液 0.1mlを加えて激しく振りまぜる。

3. 【結果】

As:明瞭に黄濁色を呈し、多い場合は沈殿を生じる。

Hg:黒色沈殿または黒濁色を呈する。

4. 【砒素の定性Ⅱ】

砒素を含む試験液5mlを試験管に取り、0.5%モリブデン酸アンモン溶液 0.2ml および 0.5%硫酸ヒドラジン 0.2mlを加え激しく振りまぜ、試験管をお湯に漬け数分間加温する。

つぎに、試験管を冷水で冷やし、酢酸ブチル:n-ブチルアルコール(1+1)を約 2ml 加え試験管を振りまぜる。

5. 【結果】

酢酸ブチル/n-ブチルアルコール(有機層)に鮮やかな青色を呈する。

妨害反応としてリン酸の存在が同じ反応をするが、リン酸は、硫化ナトリウムの反応が無いため、両方の試験で砒素の確認ができる。

重金属定性試験

重金属(As) 50ppm溶液酸中
硫化ソーダー溶液反応

