

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590745

研究課題名（和文）体液中パラコート、グリホシネート、有機リンの固相抽出と一斉分析法の確立

研究課題名（英文）Simultaneous analysis of paraquat, glufosinate and organophosphate in biological fluid using solid-phase extraction

研究代表者

斉藤 剛 (SAITO TAKESHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30266465

研究成果の概要（和文）：

農薬中毒時、異なる起因物質の同定が迅速、同時に質量分析計で行える方法の開発を行った。対象とした化合物は、パラコート、ジクワット、グリホシネート、グリホサート、有機リン、カーバメイト系化合物とした。より迅速な抽出を行うため遠心分離機で抽出が行えるモノリススピンカラムを用いた。方法は少量の試料から迅速に抽出が行え、実際例に応用可能であることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a method based on monolithic spin column extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as an analytical method for screening diquat, paraquat, and fenitrothion (MEP) in serum and urine. Then, a rapid, specific, and sensitive method for simultaneous quantitation of organophosphates [MEP, malathion, and phenthoate], glufosinate, and glyphosate in human serum and urine by GC-MS has been developed. Finally, a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed and validated for the simultaneous quantification of sixteen organophosphate and carbamate insecticides in serum. Non-polar and polar pesticides were simultaneously extracted from serum samples by a simple and fast monolithic spin column procedure using mix-mode C-C<sub>18</sub> cartridges. The validated all method was successfully applied to a clinical poisoning case.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：パラコート、グリホサート、有機リン、固相抽出、一斉分析

## 1. 研究開始当初の背景

法医解剖症例あるいは救命センターに搬送される急性中毒症例に対して、中毒起因物質の特定や定量結果が迅速に得られればより早期の診断が可能になる。日本中毒学会では分析が臨床に役立つ中毒起因物質として15品目を選定している。これにはパラコートやグリホシネートなど、しばしば致死的中毒となる農薬が含まれる。特にパラコート中毒は予後を診断するためには定量が必須である。また、有機リンのフェニトロチオンも血中濃度と重症度が相関するため定量分析が有効である。これら農薬に対して各々に簡易検査法が存在するが、陽性の場合には確認検査と定量が必須である。しかし、確認と定量は化合物毎の抽出と分析のため全ての化合物は一度に行えないのが現状である。

そのため、複数の化合物のスクリーニングを行う場合、化合物毎の抽出あるいは分析を行うのが現状であり複数の分析機器を必要としている。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、異なる物性を有する化合物の分析が同時に行えれば、スクリーニング時間の短縮のみならず使用する試料量の節約にも繋がる。結果的に剖検の採取試料が少量の場合においても複数項目の検査が可能となる。

そこで、本研究ではパラコート、グリホシネート、有機リンを同時に抽出する新規農薬用抽出カラムの開発と分析初心者でも容易に操作が行える分析方法の開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)パラコート、ジクワット、フェニトロチオンの同時分析

パラコートとジクワットの標準品をホウ化水素ナトリウムで還元体として再結晶化した。

内部標準物質としてパラコートとジクワットにはエチルピオロゲン、フェニトロチオンにはフェニトロチオン-d6を使用した。

抽出にはモノスピンC18、分析にはガスクロマトグラフ質量分析計を用いて検量線を作成した。

バリデーションを行い方法の再現性評価を行った。

実際の中毒症例の試料に本法を応用して検証した。

### (2)グルホシネート、グリホサート、有機リンの同時分析

有機リン化合物としてフェニトロチオン、マラチオン、フェントエートを使用して、合計5つの異なる極性化合物の同時抽出法に

関して検討を行った。内部標準物質として、DL-2-アミノ-3-ホスホプロピオ酸、フェニトロチオン-d6を使用した。

### ① TiO-C18を用いた抽出

チタニア(Ti)がリン酸を選択的に吸着する特性を利用して水溶性化合物のグルホシネートとグリホサートを吸着させて抽出し、疎水性化合物の有機リンをC18で抽出する方法の検討を行った。

### ② C-C18を用いた抽出

活性炭には多くの化合物を吸着する特性があるため、C18に活性炭を混ぜ込みC-C18モノリスカラムを作成しスピニングカラムとした。活性炭にグルホシネートとグリホサートが吸着し、C18には有機リンが吸着すればこれら化合物は同時に抽出可能と考え抽出方法の検討を行った。

上記分析は、ガスクロマトグラフ質量分析計で行い、2種類のカラムについてバリデーションを行い検証した。バリデーション後は、実際の中毒症例に方法を応用した。

### (3)有機リンとカーバメイト系化合物の同時分析

有機リン中毒と同様の症状を呈するカーバメイト化合物を有機リンと同時に分析する方法の検討を行った。対象化合物として有機リン化合物13種類、カーバメイト化合物3種類の計16化合物を選択した。

選択した16化合物は、親水性、疎水系化合物が共に存在するためこれらの抽出が同時に行える可能性がある、TiO-C18とC-C18モノリススピニングカラムを用いて抽出方法の検討を行った。

分析は液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計で行い、バリデーションを行い検証した。バリデーション後は、実際の中毒症例に方法を応用した。

## 4. 研究成果

### (1)パラコート、ジクワット、フェニトロチオンの同時分析

これまで、パラコートやジクワットの分析は、液体クロマトグラフや分光光度計を用いるのが一般的であった。開発した方法は、汎用機であるガスクロマトグラフ質量分析計を用いる点が画期的である。最近の本邦では、発生頻度が少ない中毒症例ではあるが、発生すれば必ず定量が必要となる。本法の抽出には遠心分離機だけを使い特別な機器は必要としない。分析も汎用機器で行える点は大きいに有意義である。諸外国では、パラコートやジクワットが現在も使用されているこのような地域においても有効な方法である。

また、パラコートやジクワットの他に、有機リンの中で最も頻度の高いフェニトロチ

オンが同時に分析可能な点は分析依頼者と分析者双方にとって有意義な結果をもたらす。

#### (2) グルホシネート、グリホサート、有機リンの同時分析

これまで報告されているグルホシネート、グリホサートの前処理方法は、1 時間以上を要する。今回開発した方法は、10 分程度で行えるため大幅な時間短縮に繋がった。更に、有機リン化合物の中でも中毒症例の発生頻度の高い化合物 3 種類も同時に分析が行えるため分析者にとって非常に有意義である。

今回、TiO-C18 と C-C18 のモノリスを用いた。双方共、同じような結果が得られた。グルホシネート、グリホサートの回収率が低かったものの、実際の中毒症例には十分応用が可能であり有効性が確認できた。

今回、TiO-C18 と C-C18 のモノリスは、極性の異なる化合物の同時抽出が行えることを示した。他に多くの化合物へ応用可能であると考えられる。

#### (3) 有機リンとカーバメイト系化合物の同時分析

今回、TiO-C では十分な抽出が行えなかったが、C-C18 で抽出の有効性が確認できた。

これまで、極性の異なるこれらの化合物を同時に抽出した方法は無い。抽出から分析終了まで 30 分程度で行えるため、中毒治療の現場、分析者の双方に有意義な結果が得られる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Saito T, Miura N, Namera A, Oikawa H, Miyazaki S, Nakamoto A and Inokuchi S. Mix-mode C-C18 monolithic spin column extraction and GC-MS for simultaneous assay of organophosphorus compounds, glyphosate, and glufosinate in human serum and urine. *Forensic Toxicol* 30, 1-10, 2012. 査読有
2. Saito T, Aoki H, Namera A, Oikawa H, Miyazaki S, Nakamoto A and Inokuchi S. Mix-mode TiO-C18 monolith spin column extraction and GC-MS for the simultaneous assay of organophosphorus compounds and glufosinate, and glyphosate in human serum and urine. *Anal Sci* 27, 999-1005, 2011. 査読有
3. Saito T, Fukushima T, Yui Y, Miyazaki S, Nakamoto A, Namera A and Inokuchi S. Monolithic spin column

extraction and GC-MS for the simultaneous assay of diquat, paraquat, and fenitrothion in human serum and urine. *Anal Bioanal Chem* 400 (1), 25-31, 2011. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Saito T, Namera A, Oikawa H, Miyazaki S, Nakamoto A and Inokuchi S. Mix-mode TiO-C18 monolith spin column extraction and GC-MS analysis for the simultaneous assay of organophosphorus compounds, glufosinate and glyphosate in human serum and urine. Joint meeting of the society of forensic toxicologists & the international association of forensic toxicologists, San Francisco, 2011. Marriot Marquis Hotel (San Francisco) 2011.9.28.
2. 齊藤 剛, 奈女良 昭, 宮崎将太, 及川博史, 中本晃弘, 猪口貞樹. ミックスモードモノスピンの抽出と GC-MS による血清、尿中有機リン、グリホサート、グルホシネートの一斉分析, 第 33 回日本中毒学会総会・学術総会. 講演抄録, pp90, 大垣, 2011. ソフトピアジャパン(大垣市) 2011.7.31.
3. 齊藤 剛, 奈女良 昭. モノリススピнкаラムと GC-MS による体液中有機リン、グリホサート、グルホシネートの同時分析, 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 講演抄録, pp74, 福島, 2011. コラッセ福島 (福島市) 2011. 6. 16.
4. 齊藤 剛, 奈女良 昭, 及川 博史, 宮崎将太, 中本晃弘, 猪口貞樹. ミックスモード C-C18 モノリススピнкаラムと GC-MS による血清、尿中有機リン、グルホシネート、グリホサートの一斉分析, 日本法中毒学会第 30 年会, 講演要旨集, pp62, 長崎, 2011. 長崎大学 (長崎市) 2011.6.10
5. Saito T, Namera A., Yui Y., Miyazaki S., Nakamoto, A. and Inokuchi, S. Monolithic spin-column extraction and gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous assay of diquat, paraquat, and fenitrothion in human serum and urine. The International Association of Forensic Toxicologists 48th International Meeting, Bonn, Germany, 2010. Bonn Castle (Bonn) 2010.9.30.
6. 齊藤 剛, 奈女良 昭, 由井夕湖, 宮崎将太, 中本晃弘, 猪口貞樹. モノリススピнкаラムによる体液中ジクワット、パラコート、フェニトロチオンの抽出と

GC-MSの同時分析, 第 32 回日本中毒学会  
総会・学術集会, 講演要旨集, pp59, 岡  
山, 2010. 川崎学園 (倉敷市)  
2010. 7. 23.

7. 齊藤 剛, 奈女良 昭. モノリススピン  
カラムとGC-MSによる体液中ジクワット,  
パラコート, フェニトロチオンの同時分  
析, 第 94 次日本法医学会学術全国集会.  
講演抄録, pp75, 東京, 2010. タワーホ  
ール船堀 (江戸川区) 2010. 6. 24.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 剛 (SAITO TAKESHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 30266465