

報 文

## 化学発光 HPLC による血漿中パラコート及びジクワットの同時定量

新藤 敬悟<sup>1</sup>, 岸川 直哉<sup>1</sup>, 大山 要<sup>1</sup>, 黒田 直敬<sup>\*1</sup>

パラコート及びジクワットは世界中で広く利用されている除草剤であるが、ヒトに対しても強い毒性を示す化合物である。本研究では、パラコート及びジクワットの同時定量を目的として、これらの毒性発現機構である活性酸素発生能を利用する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 化学発光定量法の開発を行った。本法は、シリカカラムを用いた HPLC により分離したパラコート及びジクワットに、還元剤ジチオスレイトールを混合し、これにより生じる活性酸素をルミノールにより化学発光検出するという方法である。開発した HPLC システムにおいて、パラコート及びジクワットはそれぞれ保持時間 16.0 及び 13.0 分に検出され、その検出下限 ( $S/N=3$ ) はそれぞれ 40 及び 53 nM であった。本法をヒト血漿中のパラコート及びジクワットの測定へと応用した結果、50% トリクロロ酢酸の添加による除タンパク操作のみで、血漿成分の影響を受けることなく選択的にこれらの化合物を定量可能であった。

### 1 緒 言

パラコート (paraquat, PQ) 及びジクワット (diquat, DQ) は除草効果が強く、環境滞留性が低いことから<sup>1)</sup>、世界中で最も広く使われている農薬の一つである。しかしながら、有機リン化合物<sup>2)</sup>といったほかの農薬と比べて生体毒性が強く、かつ有効な治療法が存在しないことから<sup>3,4)</sup>、偶発的あるいは故意の服用による中毒事故が頻発している<sup>4)~6)</sup>。PQ 服用後の経過時間と血漿中 PQ 濃度による生存曲線から中毒患者の生存確率を推定可能であると報告されており<sup>7)</sup>、血中の PQ 及び DQ 濃度の定量は治療方法の選択や予後の予測において重要である。また、現在除草剤として市販されている PQ 及び DQ の混合製剤はその種類により PQ 及び DQ の混合比が異なることから<sup>8)9)</sup>、中毒患者の血中 PQ 及び DQ の存在比の測定により中毒原因となった製剤の推定が可能である。このようなことから、中毒患者の血中 PQ 及び DQ の高感度かつ選択的な同時定量法は臨床化学あるいは裁判化学の分野において非常に重要であると考えられる。

これまでに報告されている血中の PQ 及び DQ の同時定量法として、高速液体クロマトグラフィー-紫外可視吸光検出法 (HPLC-UV)<sup>10)11)</sup>、液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析法 (LC-TOF-MS)<sup>12)</sup> やガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS)<sup>13)14)</sup> といった方法がある。しかしながら、HPLC-UV 法は一般的に感度及び選択性に劣

り、複雑な生体成分が共存する血液試料中の微量化合物の定量には適していない。また、LC-TOF-MS 法は感度及び選択性の高い方法であるが、装置が複雑かつ高価であるため汎用性に欠けるといふ欠点を有する。GC-MS 法もまた複雑で高価な装置を必要とし、さらに PQ 及び DQ は難揮発性の化合物であることから、これらを揮発性化合物へと変換するための誘導体化操作が必要であった。

一方、著者らはこれまでに比較的簡単な装置で高感度かつ選択的に PQ 及び DQ を定量可能な方法として化学発光 (CL) を利用する分析法を報告している<sup>15)</sup>。この方法は PQ 及び DQ の毒性発現機構である活性酸素発生能に基づく方法である。PQ 及び DQ は生体内の酸化還元酵素の作用によりラジカル種へと還元されるが、これらのラジカル種が自動酸化される過程において溶存酸素をスーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) へと変換する。この PQ 及び DQ の酸化還元反応に伴って生成する  $O_2^{\cdot-}$  が生物組織を損傷させることで除草効果や生体毒性を示す<sup>3)16)</sup>。この性質を参考にして、著者らは Fig. 1 に示すように PQ 及び DQ を還元剤であるジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) を用いてラジカル種へと還元し、これに伴って発生する  $O_2^{\cdot-}$  をルミノールにより CL 検出することで PQ 及び DQ を高感度に定量可能な方法を報告している。しかしながら、この方法では CL の測定に簡易なルミノメーターを用いているために PQ 及び DQ の分別定量が不可能であり、また CL 反応が生体成分の影響を受けやすいことから前処理操作によるこれらの除去を行わずに血液試料中の PQ 及び DQ の定量へと応用することは困難と考えられた。そこで、本研究では血液試料中の妨害成分の分離と PQ 及び DQ の同時

\* E-mail: n-kuro@nagasaki-u.ac.jp

<sup>1</sup> 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻: 852-8521  
長崎県長崎市文政町 1-14

定量を可能とするために、上記の CL 反応を組み込んだ HPLC システムの構築を新たに行った。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

PQ は東京化成工業 (TCI) より購入し、DQ 及びギ酸は和光純薬工業製を用いた。ルミノール、DTT、過塩素酸及びトリクロロ酢酸はナカライテスクから購入し、ギ酸アンモニウムはキシダ化学製を使用した。水酸化ナトリウム及びアセトニトリル (高速液体クロマトグラフィー用) はそれぞれ Merck 及び関東化学から購入した。本研究では、血漿試料としてコージンバイオより購入したクエン酸処理正常ブール血漿を用いた。PQ 及び DQ は蒸留水に溶解させ、目的濃度に応じて移動相で希釈して標準溶液とした。

### 2.2 装 置

Fig. 2 に本研究で構築した HPLC-CL 装置の概略図を示

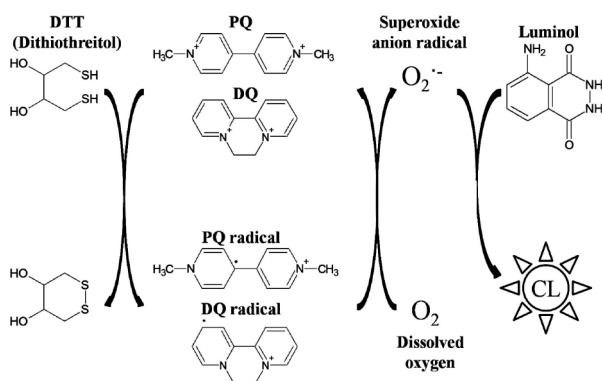


Fig. 1 Mechanism of the CL reaction for PQ and DQ based on the generation of superoxide anion radical through the redox cycle

す。HPLC ポンプは三台とも島津製作所製 LC-9A を使い、マニュアルインジェクターは 5  $\mu$ L のサンプルループを備えた 7125 (Rheodyne 製)、反応コイルは内径 0.5 mm 及び長さ 2.5 m の GL Science 製テフロンチューブを使用した。CL 検出器は島津製作所製 CLD-10A、ノイズクリーナーは UNI-1 (Union 製)、記録計はランタイムインスツルメンツ (ランタイムインスツルメンツ製) を用いた。HPLC カラムは Zorbax Rx-Sil (150 $\times$ 2.1 mm i.d., 5  $\mu$ m, Agilent Technology 製) 及びそのガードカラム (12.5 $\times$ 2.1 mm i.d.) を使用した。移動相は 24 mM ギ酸と 300 mM ギ酸アンモニウムを含む水溶液とアセトニトリルの 60 : 40 (v/v%) 混液を流量 0.2 mL min<sup>-1</sup> で送液した。カラムで分離後の PQ 及び DQ を 4.0 mM DTT のアセトニトリル溶液及び 5.0 mM ルミノールの 1.2 M 水酸化ナトリウム水溶液と混合した後、反応コイルを通過させた後に生じる CL を検出した。このとき、DTT 溶液及びルミノール溶液の流量はそれぞれ 0.05 mL min<sup>-1</sup> に設定した。また、本 CL 法の感度及び選択性を比較するための UV 検出器として島津製作所製 SPD-20A を用いた。

### 2.3 ヒト血漿中 PQ 及び DQ 定量のための前処理操作

ヒト血漿 100  $\mu$ L に 50 % トリクロロ酢酸 10  $\mu$ L を加えて攪拌することにより除タンパクを行った。その後、3000 g で 5 分間遠心分離し、得られた上清を Dismic-3 (孔径 0.50  $\mu$ m PTFE シリンジフィルター, Advantec 製) で濾過後、そのうち 5  $\mu$ L を HPLC システムに注入した。

## 3 結果と考察

### 3.1 PQ 及び DQ 標準溶液のクロマトグラム

PQ 及び DQ は高極性イオン化合物であり、ODS カラム等に保持されにくいことから逆相 HPLC による分離分析は

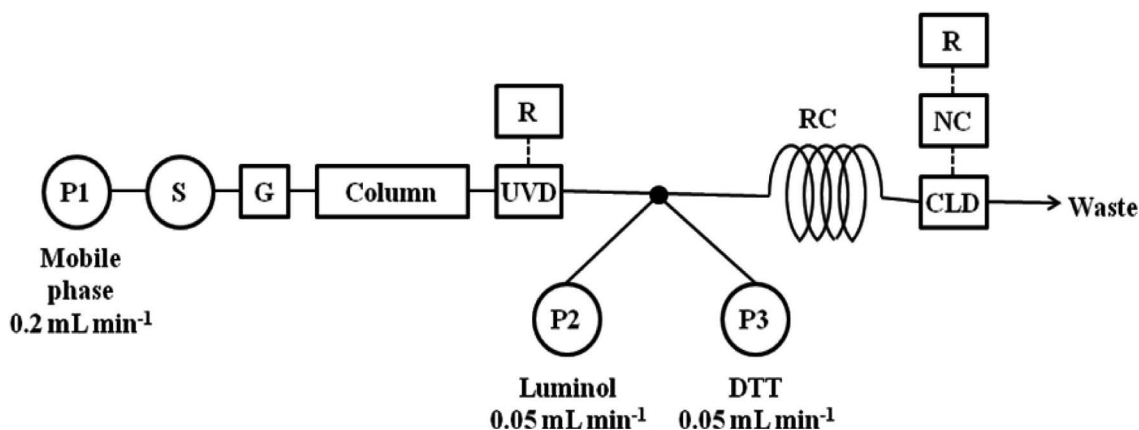


Fig. 2 Schematic diagram of the HPLC-CL system

P1-3, HPLC pump; S, sample injector (5  $\mu$ L); G, Zorbax Rx-Sil guard column (12.5 $\times$ 2.1 mm i.d.); Column, Zorbax Rx-Sil (150 $\times$ 2.1 mm i.d., 5  $\mu$ m); UVD, UV detector (290 nm); RC, reaction coil (2.5 m  $\times$  0.5 mm i.d.); CLD, CL detector; NC, noise cleaner; R, recorder.

困難である。そこで、シリカカラムを用いた分離分析を試みたところ<sup>17)18)</sup>, 上記 HPLC 条件で PQ 及び DQ は分離カラムに保持され、それぞれ 16.0 及び 13.0 分に CL ピークを検出することができた (Fig. 3)。

### 3・2 CL 条件の最適化

より高い感度を得る目的で、PQ 及び DQ の標準溶液を用いて試薬濃度や反応コイル長といった各種 CL 反応条件の最適化を行った。

**3・2・1 ルミノール濃度の最適化** CL 試薬であるルミノールについて、3.0~8.0 mM の範囲で濃度の検討を行った。Fig. 4 (a) に示すように PQ のピーク面積はルミノール濃度が 5.0 mM のとき最大となり、一方で DQ のピーク面積はルミノール濃度の増加とともに緩やかに増加していく傾向が観察された。一方、PQ 及び DQ ともに S/N 比はルミノール濃度が 5.0 mM のとき最大となったことから [Fig. 4 (b)], 最適なルミノール濃度は 5.0 mM とした。

**3・2・2 水酸化ナトリウム濃度の最適化** ルミノールの溶媒として用いた水酸化ナトリウム水溶液について、0.9~1.5 M の範囲で濃度の検討を行った (Fig. 5)。その結果、PQ では水酸化ナトリウム濃度が 1.2 M のときピーク面積が最大となり、DQ では水酸化ナトリウム濃度が増加するとピーク面積は減少する傾向にあった。一方、S/N 比は PQ 及び DQ ともに 1.2 M のときに最大となったため、最適な水酸化ナトリウム濃度として 1.2 M を選択した。

**3・2・3 DTT 濃度の最適化** 還元剤 DTT について 2.0

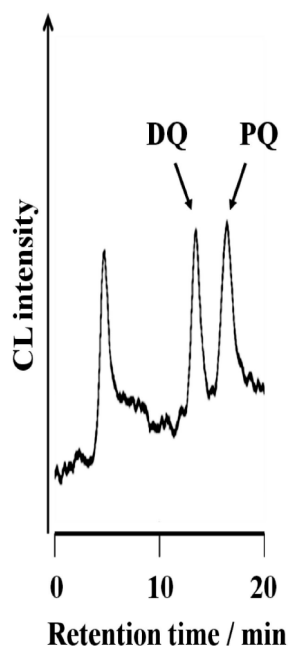


Fig. 3 Chromatogram for standard mixture of 0.3  $\mu$ M PQ and DQ obtained by the proposed HPLC-CL method

~8.0 mM の範囲で濃度の検討を行った (Fig. 6)。PQ のピーク面積は DTT 濃度の増加に伴って増加していったが、DQ のピーク面積は DTT 濃度の変化による顕著な影響は見られなかった。一方、PQ 及び DQ ともに S/N 比は 4.0 mM の DTT を用いたときに最大となったことから、DTT 濃度として 4.0 mM を用いることにした。

**3・2・4 反応コイルの長さの最適化** 本 CL 反応は、PQ あるいは DQ 溶液にルミノール及び DTT 溶液を添加した後、時間とともに緩やかに CL 強度が上昇していくという性質を示す<sup>15)</sup>。そこで、検出器で最も効率よく CL を検出できるように反応コイル長の最適化を行った (Fig. 7)。反応コイル長について 1.0~5.0 m の範囲で検討を行ったところ、ピーク面積及び S/N 比ともに PQ は 2.5 m 以上のコイル長ではほぼ一定となり、DQ は 2.5 m のときに最大となった。この結果から、最適な反応コイル長は 2.5 m とした。

### 3・3 検量線、検出下限及び再現性

最適条件下で、PQ 及び DQ 標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、PQ は 0.13~20  $\mu$ M、DQ は 0.17~20  $\mu$ M の範囲で濃度と CL 強度の間に相関係数  $r=0.998$  及

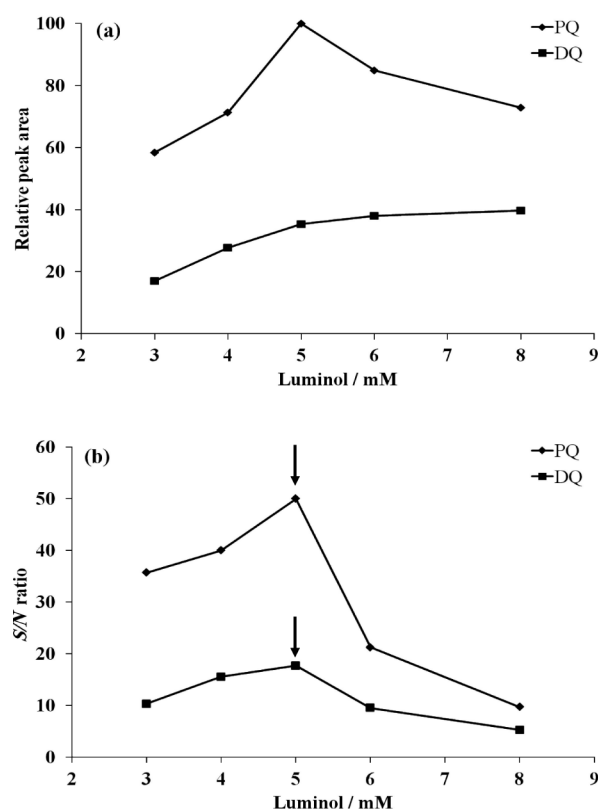


Fig. 4 Effects of the luminol concentration on (a) relative peak area and (b) S/N ratio

The concentrations of PQ, DQ, DTT and NaOH are 2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4.0 mM and 1.2 M, respectively. The reaction coil length is 2.5 m.

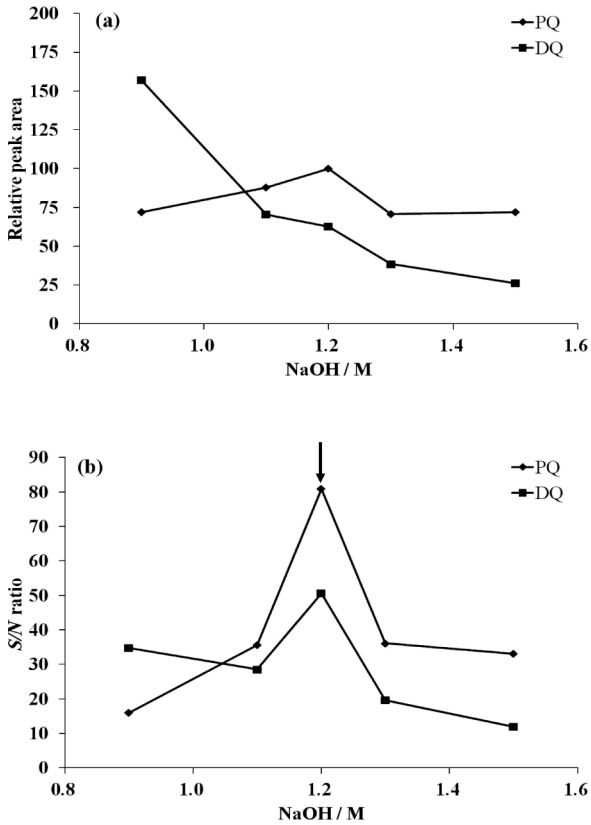


Fig. 5 Effects of the NaOH concentration on (a) relative peak area and (b) S/N ratio

The concentrations of PQ, DQ, DTT and luminol are 2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4.0 mM and 5.0 mM, respectively. The reaction coil length is 2.5 m.

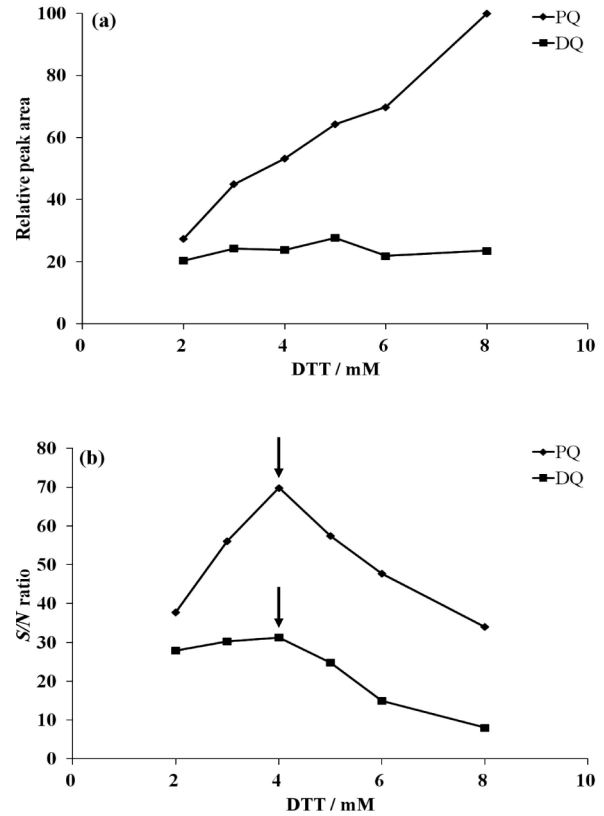


Fig. 6 Effects of the DTT concentration on (a) relative peak area and (b) S/N ratio

The concentrations of PQ, DQ, luminol and NaOH are 2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5.0 mM and 1.2 M, respectively. The reaction coil length is 2.5 m.

び  $r=0.993$  の良好な直線関係が得られた。このとき、PQ 及び DQ の検量線の直線回帰式はそれぞれ  $y=61.7 \times 10^3 x + 1.3 \times 10^3$  及び  $y=46.6 \times 10^3 x + 1.4 \times 10^3$  であった [y はピーク面積, x は PQ 及び DQ の濃度 ( $\mu$ M)]。また、ノイズの 3 倍の CL 強度を与える PQ 及び DQ 濃度 ( $S/N=3$ ) を検出下限と定義したとき、その値はそれぞれ 40 及び 53 nM であった。本法の感度をこれまでに報告されている PQ 及び DQ の同時定量法と比較したところ (Table 1), HPLC-UV 法<sup>(10)(11)</sup> と比べて 5~7 倍, GC-MS 法<sup>(4)</sup> と比較して 3~10 倍程度高感度であった。また、本法は比較的簡便かつ安価な装置から構成されているが、LC-TOF-MS<sup>(12)</sup> に匹敵する感度を有していた。

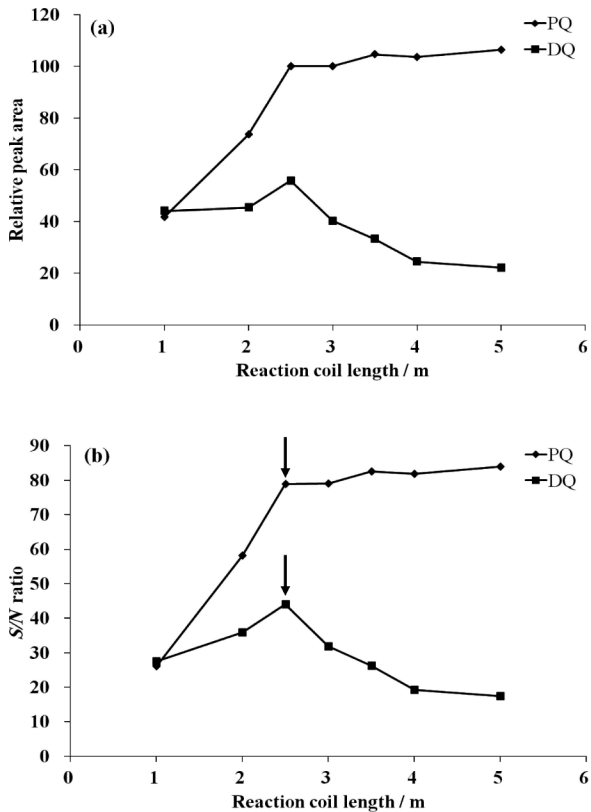
次に、日内及び日間において繰り返し測定したときの PQ 及び DQ のピーク面積の精度 ( $n=5$ ) を検量線範囲内における 3 点の濃度 (0.6, 5 及び 20  $\mu$ M) で調査したところ、日内の精度は相対標準偏差 (RSD) で 7.0 % 以下、日間の精度は 6.5 % 以下と良好な結果が得られた (Table 2)。

### 3・4 血漿試料中 PQ 及び DQ の同時定量

#### 3・4・1 血漿の前処理操作 開発した HPLC-CL シス

テムを PQ 及び DQ を添加した血漿試料へと応用することでその実用性を評価した。ここでは、単純な前処理法である除タンパク操作のみで簡便かつ迅速に測定することを試みた<sup>(9)</sup>。最初に、有機溶媒の添加による除タンパクを試みたが、十分に除タンパクを行うためには比較的少量の有機溶媒の添加が必要であり、結果として試料の希釈による感度の低下が懸念された。そこで、少量の酸の添加による除タンパクを検討した。除タンパクに広く用いられている酸である過塩素酸及びトリクロロ酢酸を用いて検討を行った。その結果、過塩素酸を用いて試料を処理した場合には、PQ 及び DQ のピーク形状の悪化が認められたことから、除タンパクに用いる酸としてトリクロロ酢酸を選択した。添加するトリクロロ酢酸の濃度が PQ 及び DQ の回収率へ与える影響を調査したところ、50 % トリクロロ酢酸を添加したときに PQ 及び DQ とともに回収率が最大となった (Fig. 8)。そこで、血漿試料の前処理には 50 % トリクロロ酢酸を用いることにした。

Table 3 に血漿中 PQ 及び DQ の回収率、日内及び日間の再現性を示している。回収率は血漿に添加した PQ 及び DQ のピーク面積と PQ 及び DQ 標準溶液のピーク面積を



**Fig. 7** Effects of the reaction coil length on (a) relative peak area and (b) *S/N* ratio

The concentrations of PQ, DQ, DTT, luminol, and NaOH are 2  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4.0 mM, 5.0 mM, and 1.2 M, respectively.

比較して算出した. PQは92~106%, DQは100~106%と良好な回収率を得られた. また, 血漿中PQ及びDQの繰り返し測定精度 ( $n=5$ )を調査したところ, 日内精度はRSD 7.1%以下, 日間精度はRSD 5.9%以下と良好な結果であった.

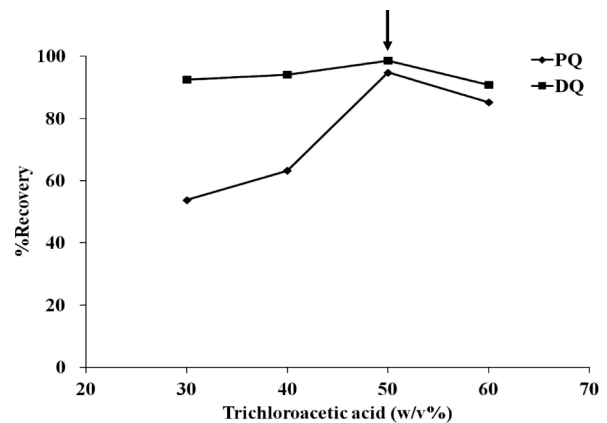
**3.4.2 血漿試料中PQ及びDQの同時定量** Fig. 9 (a)にPQ及びDQを添加していない血漿, Fig. 9 (b)にPQ及びDQ添加血漿について本HPLC-CL法で得られたクロマトグラムを示している. これらの図に示すように, 共存する血漿成分の影響を受けることなく血漿中のPQ及びDQを検出することができた. このように, 本HPLC-CL法は除タンパクという簡便な前処理操作のみで, 生存曲線における低濃度域である0.3  $\mu\text{M}$ の血漿中PQ及びDQ<sup>7)</sup>を選択的に同時定量可能であることが確認された. 一方で, 同一の試料をHPLC-UV法により測定したところ, 血漿成分に由来すると考えられる妨害ピークの影響によりPQ及びDQを定量することが非常に困難であった [Fig. 9 (c)]. このことから, 本HPLC-CL法の優れた感度と選択性が実証された.

**Table 1** Comparison of the sensitivity of the proposed CL method with previously reported methods

Method	Limits of detection/nM	
	PQ	DQ
Proposed CL method	40	53
HPLC-UV <sup>10)</sup>	270	270
GC-MS <sup>14)</sup>	540	140
LC-TOF-MS <sup>12)</sup>	27	33
LC-MS/MS <sup>18)</sup>	3.3	0.7

**Table 2** Precision of the proposed HPLC-CL method using standard solution of PQ and DQ

Concentration/ $\mu\text{M}$	% RSD		
	Within-day ( $n=5$ )	Between-day ( $n=5$ )	
PQ	0.6	5.4	2.4
	5	3.8	5.6
	20	4.8	4.2
DQ	1.2	6.3	4.9
	5	7.0	6.5
	20	1.9	5.7



**Fig. 8** Effects of the trichloroacetic acid concentration on the recovery of PQ and DQ from human plasma

The concentrations of PQ and DQ are 0.5  $\mu\text{M}$  and 0.5  $\mu\text{M}$ , respectively.

**Table 3** Recovery and precision of the proposed HPLC-CL method using human plasma spiked with PQ and DQ

Spiked concentration/ $\mu\text{M}$	% Recovery	% RSD		
		Within-day ( $n=5$ )	Between-day ( $n=5$ )	
PQ	0.6	92	5.1	5.6
	5	106	7.1	4.5
	20	100	3.6	3.6
DQ	1.2	100	5.8	5.9
	5	106	2.9	3.1
	20	100	4.3	1.5

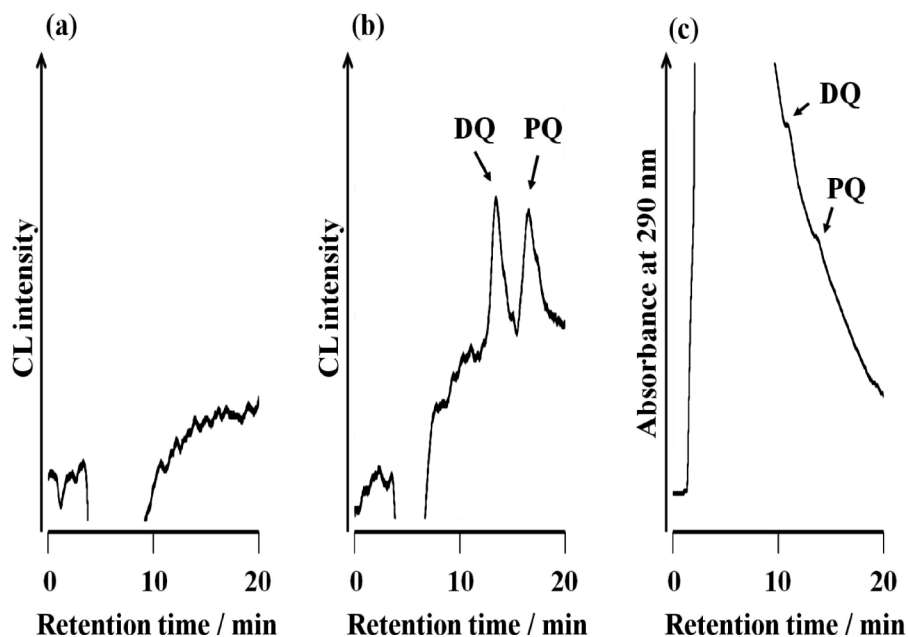


Fig. 9 Chromatograms for (a) blank plasma and (b) plasma spiked with 0.3  $\mu\text{M}$  PQ and DQ obtained by CL detection and (c) plasma spiked with 0.3  $\mu\text{M}$  PQ and DQ obtained by UV detection at 290 nm

#### 4 結 言

血漿中 PQ 及び DQ の高感度かつ選択的な HPLC-CL 同時定量法を開発した。本法は血漿のような複雑な生体試料中に存在する PQ 及び DQ を生体成分による妨害を受けることなく選択的に定量可能であった。したがって、本法は中毒患者の血漿中 PQ 及び DQ の同時定量に有用であり、患者の予後予測や事故原因となった製剤の推定に有益な情報を提供できると考えられる。

#### 文 献

- 石丸 剛, 井上貴博: “血液・尿化学検査 免疫化学的検査”, 第7版 (2), p. 581 (2010).
- T. Saito, N. Miura, A. Namera, H. Oikawa, S. Miyazaki, A. Nakamoto, S. Inokuchi: *Forensic Toxicol.*, **30**, 1 (2012).
- R. J. Dinis-Oliveira, J. A. Duarte, A. Sanchez-Navarro, F. Remiao, M. L. Bastos, F. Carvalho: *Crit. Rev. Toxicol.*, **38**, 13 (2008).
- Z. E. Suntres: *Toxicol.*, **180**, 65 (2002).
- K. Kudo, T. Ishida, W. Hikiji, Y. Usumoto, T. Umehara, K. Nagamatsu, A. Tsuji, N. Ikeda: *Forensic Toxicol.*, **28**, 25 (2010).
- H. Nagami, Y. Nishigaki, S. Matsushima, T. Matsushita, S. Asanuma, N. Yajima, M. Usuda, M. Hirose: *Int. J. Occup. Environ. Health*, **11**, 180 (2005).
- A. T. Proudfoot, M. S. Stewart, T. Levitt, B. Widdop: *Lancet*, **ii**, 330 (1979).
- 西田憲市, 成原政治, 堤 一博, 伊東晋治: 日本法科学技術学会誌, **10**, 31 (2005).
- シンジェンタジャパン: “レグロックスの農薬情報”, <<http://www.syngenta.co.jp/cp/items/reglox/view/>>, (accessed 2015-03-12).
- M. Ito, Y. Hori, M. Fujisawa, A. Oda, S. Katsuyama, Y. Hirose, T. Yoshioka: *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 725 (2005).
- C. Fuke, T. Arao, Y. Morinaga, H. Takaesu, K. Ameno, T. Miyazaki: *Leg. Med.*, **4**, 156 (2002).
- N. Yoshioka, M. Asano, A. Kuse, T. Mastuoka, Y. Akiyama, T. Mitsuhashi, Y. Nagasaki, Y. Ueno: *Forensic Toxicol.*, **30**, 135 (2012).
- R. M. Almeida, Y. Mauricio: *J. Chromatogr. B*, **853**, 260 (2007).
- T. Saito, T. Fukushima, Y. Yui, S. Miyazaki, A. Nakamoto, A. Namera, S. Inokuchi: *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 25 (2011).
- N. Kishikawa, S. Higuchi, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda: *Forensic Toxicol.*, **31**, 301 (2013).
- K. C. Fussell, R. G. Udasin, J. P. Gray, V. Mishin, P. J. S. Smith, D. E. Heck, J. D. Laskin: *Free Radic. Biol. Med.*, **50**, 874 (2011).
- Agilent Technologies: “Agilent 6410 によるジクワット, パラコートの高感度分析”, <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/LCMS-200907TK-002.pdf>>, (accessed 2015-03-05).
- R. D. Whitehead, Jr., M. A. Montesano, N. K. Jayatilaka, B. Buckley, B. Winnik, L. L. Needham, D. B. Barr: *J. Chromatogr. B*, **878**, 2548 (2010).
- 日本分析化学会編: “分析化学便覧”, 改訂五版, p. 128 (2001).

## Simultaneous Determination of Paraquat and Diquat in Human Plasma Using HPLC with Chemiluminescence Detection

Keigo SHINDO<sup>1</sup>, Naoya KISHIKAWA<sup>1</sup>, Kaname OHYAMA<sup>1</sup> and Naotaka KURODA<sup>\*1</sup>

\* E-mail : n-kuro@nagasaki-u.ac.jp

<sup>1</sup> Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8521

(Received March 13, 2015; Accepted April 22, 2015)

Paraquat and diquat are most widely used herbicides, but they have significant acute toxicity to humans. The aim of the present study is to develop a high-performance liquid chromatography (HPLC)-chemiluminescence (CL) detection system that allows simultaneous determinations of paraquat and diquat. The proposed HPLC-CL method is useful to evaluate health risk and origin of paraquat and diquat. Paraquat and diquat are separated by silica-gel HPLC, and CL detection is based on the luminol-detecting CL of superoxide anion radicals, which are generated by the redox cycle reaction between paraquat or diquat and dithiothreitol. Under the optimum conditions, paraquat and diquat were detected at 16.0 and 13.0 min, respectively, and the limit of detection ( $S/N=3$ ) was 40 nM for paraquat and 53 nM for diquat. Using the proposed HPLC-CL method, the peaks corresponding to paraquat and diquat in human plasma could be selectively detected on chromatograms without any interference from plasma components by simple deproteinization with 50 % trichloroacetic acid.

**Keywords:** paraquat; diquat; chemiluminescence; HPLC; human plasma.