

血清中 Propanil, Carbaryl, 3,4-Dichloroaniline の固相抽出, HPLC-UV 検出による一斉分析法

堀 寧,^{*,a,b} 中嶋真理子,^{a,b} 藤澤真奈美,^{a,b} 嶋田健次,^b 廣田哲也,^c 吉岡敏治^c

Simultaneous Determination of Propanil, Carbaryl and 3,4-Dichloroaniline in Human Serum by HPLC with UV Detector Following Solid Phase Extraction

Yasushi HORI,^{*,a,b} Mariko NAKAJIMA,^{a,b} Manami FUJISAWA,^{a,b} Kenji SHIMADA,^b
Tetsuya HIROTA,^c and Toshiharu YOSHIOKA^c

Department of Hospital Pharmacy, Niigata City General Hospital,^a 2-6-1, Shichikuyama, Niigata 950-8739, Japan, Department of Analytical Chemistry, Niigata College of Pharmacy,^b 5-13-2 Kamishinei-cho, Niigata 950-2081, Japan, and Department of Emergency Medicine, Osaka Prefectural General Hospital,^c 3-1-56 Bandai Higashi, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8558, Japan

(Received October 15, 2001; Accepted December 20, 2001)

In case of poisoning by herbicide compounded with Propanil (DCPA) and Carbaryl (NAC), we attempted simultaneous solid-phase extractions of DCPA, NAC, and 3,4-dichloroaniline (DCA), a metabolite of DCPA, from the patient's serum, and quantitative analytical method using HPLC-UV detection. With this HPLC method, the quantitative detection limits in the serum are 0.005 $\mu\text{g/ml}$ for DCPA and DCA and 0.001 $\mu\text{g/ml}$ for NAC, and the UV spectra of all three compounds could easily be obtained using a diode-array detection limit of 0.05 $\mu\text{g/ml}$. When the three compounds were added to serum at concentrations ranging from 0.1—10.0 $\mu\text{g/ml}$, the recovery rates were satisfactory at between 91.1% and 101.9%. On analysis of the serum of patient who had ingested Kusanon A Emulsion, the ingested substance apparently caused an increase in the DCA concentration, which led to the appearance of methemoglobinemia. The possibility that the DCA concentration might be used for prognostic purposes was suggested.

Key words—propanil, carbaryl, 3,4-dichloroaniline; HPLC; poisoning

緒 言

日本中毒情報センターによると Propanil (以下 DCPA) と Carbaryl (以下 NAC) を配合した除草剤は、生産量が少ないわりに、その中毒に関する問い合わせ件数が多い除草剤とされる。製品別にみると 1993 年から 1995 年に問い合わせのあった 87 件のうちクサノン A 乳剤[®]が 71 件、クサダウン乳剤[®]が 7 件、ネコソギ乳剤[®]が 4 件、ワイダック乳剤[®]が 3 件であり、いずれも 25% の DCPA と 5% の NAC にキシレンなどの芳香族炭化水素と界面活性剤を配合した製剤である。¹⁾

これら配合剤の中毒は酸アミド系除草剤である DCPA の代謝物 3,4-Dichloroaniline (以下 DCA)

を本体としたアニリン系化合物が引き起こすメトヘモグロビン血症と溶血、DCPA の加水分解を抑制して除草効果を高めるために配合されたカーバメート系殺虫剤である NAC が引き起こす縮瞳とコリンエステラーゼの低下、DCPA やキシレンによる意識障害や呼吸抑制、キシレンによると考えられる代謝性アシドーシスなど多彩な症状を呈する。²⁾

このように複数の配合成分からなる中毒の毒性動態を研究するにあたっては、各成分を迅速に分析する方法の確立が必要である。

今回、我々は血清から DCPA, NAC, DCA を同時に固相抽出し、HPLC-UV 検出によって定量する分析法を検討した。我々の知る限り血清から DCPA, NAC, DCA を一斉分析した報告はこれまでに見当たらない。加えてクサノン A 乳剤[®]を服毒した患者血清を経時的に分析したので報告する。

^{a)}新潟市民病院薬剤部, ^{b)}新潟薬科大学薬品分析化学研究室, ^{c)}大阪府立病院救急診療科
e-mail: horiy@xa3.so-net.ne.jp

方 法

1. 試薬及び材料

DCPA, NAC, DCA は和光純薬工業より購入し、標準試料として用いた。添加回収用の血清は、ヒト標準血清 (Sigma Chemical Co., USA) を用いた。

血清中 DCPA, NAC, DCA の安定性試験には 5 名の健常成人 (男性 3 名, 女性 2 名) より承諾を得て採取した新鮮な血清を迅速に用いた。

その他の溶媒は、HPLC グレード及び特級試薬を用いた。

2. UV スペクトルの測定 pH 2.5, 4.0, 6.0, 7.4, 8.5 に調製した 10 mM リン酸緩衝液 2 ml のそれぞれに最終濃度が 10 µg/ml となるように DCPA, NAC, DCA 標準メタノール溶液を添加、紫外分光光度計 (UV mini 1240; 島津製作所) で UV 強度及びスペクトルを測定し DCPA, NAC, DCA のモル吸光係数を計算した。さらに同一試料について室温、室内散光下で 12, 24, 48 時間放置した後の吸光度 (DCPA は 250 nm, NAC は 220 nm, DCA は 245 nm) を測定して安定性を確認した。

3. 抽出 1 ml の血清に 10 mM リン酸緩衝液 (pH 4) 3 ml を添加、3 ml のメタノールを 2 回、3 ml の蒸留水を 2 回、1 ml/min の流速で平衡化した Isolute® C18 500 mg/3 ml リザーバーカートリッジ (International Sorbent Technology LTD., UK) に導入、3 ml の蒸留水で洗浄後に 0.2M 酒石酸 (pH 2.6) /メタノール (1/5) 3 ml で DCPA, NAC, DCA を溶出した。50°C に設定した遠心エバポレーターで減圧乾燥した試料を 100 µl のメタノールで再溶解し、その 10 µl を HPLC に注入した。

4. HPLC 条件 アセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.0) (65 : 35) の移動相を 1.0 ml/min に調節した HPLC (SCL-10A VP; 島津製作所) に注入した試料を 40°C の恒温槽中逆相カラム (Inertsil®, ODS-2, 4.6 mm×150 mm, 5 µm particle size; GL Sciences Inc.) にて分離、ダイオードアレイ検出器 (SPD-M10A VP; 島津製作所) で検出、DCPA は 250 nm, NAC は 220 nm, DCA は 245 nm を用いて解析ソフト (Class VP; 島津製作所) にて絶対検量線法にて定量した。

5. 添加回収実験 10 µl の DCPA, NAC, DCA

標準メタノール溶液を添加して最終濃度 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml になるように調製した標準血清 1 ml を抽出し、HPLC にて定量した。あらかじめ、コントロール血清では DCPA, NAC, DCA それぞれの保持時間にピークが検出されないことを確認したうえで、同条件に調節した DCPA, NAC, DCA 標準メタノール溶液 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml の測定値に対する回収率 (% , $n=5$) を計算した。

6. 血清中 DCPA, NAC, DCA の安定性 血清検体の保存に際して DCPA, NAC, DCA の安定性を検討した。5 名のボランティアより採取した新鮮な血清それぞれに 10 µl の DCPA, NAC, DCA 標準メタノール溶液を添加して 3 化合物の最終濃度が 1 µg/ml となるよう調製した。この血清を -20°C で 1 週間, 2 週間, 1 ヶ月間凍結保存した試料の定量値を調製時定量値を 100% として計算して 5 名の血清における平均値で評価した。

7. 症例 67 歳, 女性, 現病歴 平成 12 年 9 月 24 日, 自殺目的にクサノン A 乳剤® を 1 瓶 (100 ml) 服毒, 自宅居間で倒れているのを家人が発見し, 服毒から約 2 時間後に救急搬送された。

入院時所見: 意識レベル JCS II-30, 血圧 120/64 mmHg, 脈拍 92/min, 体温 35°C. 瞳孔は左右共に 3 mm で対光反射は正常であった。呼気の石油様刺激臭が著明であったがチアノーゼ及び咽頭の発赤, びらんは認められなかった。コリンエステラーゼ値は 83 IU/L と軽度低下していた。気管内挿管により気道を確保し, 胃洗浄及び小腸洗浄を施行した。

血清 DCPA, NAC, DCA 濃度とメトヘモグロビン値を測定する目的で来院時, 第 2 病日, 第 3 病日, 第 4 病日の血清を採取, 迅速に分析に供した。

結 果

1. 分離条件 移動相にアセトニトリル/10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.0) (65 : 35) を用いた DCPA, NAC, DCA のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。移動相のリン酸緩衝液 pH を 2.5, 4.0, 6.0, 7.4 と変えて検討した予備実験において pH 4.0 が 3 化合物を最も良好に保持, 分離することを確認した。そしてこの移動相に溶解した DCPA の λ_{max} は 250 nm, NAC の λ_{max} は 220 nm, DCA の λ_{max} は 245 nm であった。また移動相中で各化合物

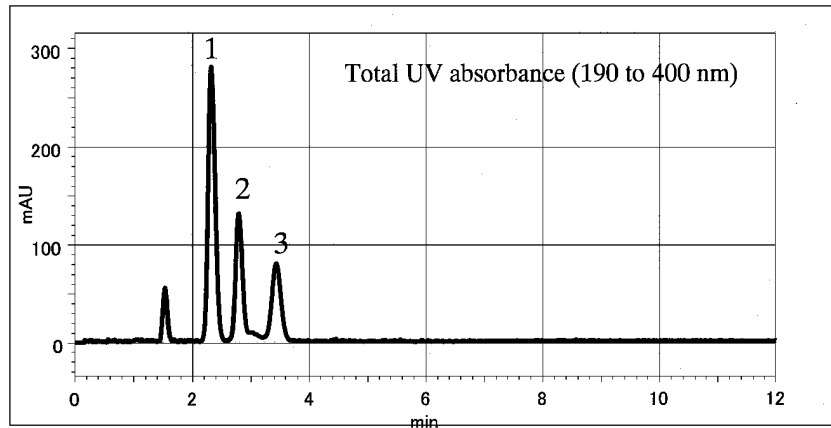


Fig. 1. HPLC Diode-Array UV Chromatograms of the Standard Solution Containing DCPA, NAC and DCA SCL-10 A VP (Shimadzu). Column: Inertsil ODS-2 (4.6 mm ID×150 mm, 5 μm). Mobile phase: Acetonitrile-10 mM phosphate buffer (pH 4) (65 : 35), Oven temp.: 40°C. Flow rate: 1.0 ml/min. The concentrations of DCPA, NAC and DCA are 10 μg/ml. 1=NAC, 2=DCA, 3=DCPA.

の λ max における測定値は 24 時間安定であった。

250 nm による DCPA の検量線は 0.5, 1, 10, 20, 40, 100 ng の間で良好な直線 $y=55707.2x+469.3$ (相関係数 $r=0.999$) が得られ定量下限は 0.5 ng, Signal Noise 比を 5 とすれば検出限界は 0.1 ng, UV スペクトルによる確認限界は 5 ng であった。

220 nm による NAC の検量線は 0.1, 1, 10, 20, 40, 100 ng の間で良好な直線 $y=8088.1x+56.7$ (相関係数 $r=0.999$) が得られ定量下限は 0.1 ng, Signal Noise 比を 5 とすれば検出限界は 0.05 ng, UV スペクトルによる確認限界は 5 ng であった。

245 nm による DCA の検量線は 0.5, 1, 10, 20, 40, 100 ng の間で良好な直線 $y=29954.5x-67.9$ (相関係数 $r=0.999$) が得られ、定量下限は 0.5 ng, Signal Noise 比を 5 とすれば検出限界は 0.1 ng, UV スペクトルによる確認限界は 5 ng であった。

2. 抽出条件と回収率 標準血清に 0.1, 1.0, 10.0 μg/ml となるよう添加した DCPA, NAC, DCA の回収率を Table 1 に示す。本法は絶対検量線法ではあるが、良好な回収率と再現性が得られた。

3. 血清検体中 DCPA, NAC, DCA の安定性 -20°C で 1 週間, 2 週間, 1 ヶ月間凍結保存した血清中 DCPA, NAC, DCA の測定値の変化を Table 2 に示す。各化合物について調製時の測定値を 100% としたとき -20°C で 1 ヶ月凍結保存していた血清の測定値では DCPA は 3.8%, NAC が 5.9%, DCA が 0.8% 低下していた。

4. 症例の分析 クサノン A 乳剤®を約 100 ml

Table 1. Recovery Rates of DCPA, NAC and DCA from Serum

Added ¹⁾	Recovery (%) ²⁾	C.V. (%)
DCPA		
10	101.3 ± 3.7	3.7
1	98.0 ± 5.3	5.4
0.1	91.1 ± 9.3	10.2
NAC		
10	98.7 ± 3.3	3.3
1	95.8 ± 6.7	6.7
0.1	91.9 ± 10.2	11.1
DCA		
10	101.9 ± 3.4	3.3
1	99.2 ± 5.1	5.1
0.1	94.5 ± 8.5	9.0

¹⁾ Amounts are expressed as μg/ml of serum.

²⁾ Values are means (S.D.) n=5.

服毒した患者の初診時, 第 2 病日, 第 3 病日に採取した血清から得られたクロマトグラム (250 nm 検出) と DCPA, NAC, DCA の定量値, 血中メトヘモグロビン値 (%) を Fig. 2 に示す。

DCPA は初診時から第 3 病日にかけて減少, 第 4 病日以降は検出限界以下となった。DCPA の代謝物である DCA は初診時 0.94 μg/ml, 第 2 病日 29.85 μg/ml と増加した後, 第 3 病日に 3.48 μg/ml へと減少, 第 4 病日以降は検出限界以下となった。NAC は初診時より第 3 病日にかけて減少, 第 4 病日以降は検出限界以下となった。一方血中メトヘモ

グロビン値は初診時 0.8%と正常であったが、第2病日の血中 DCA 濃度の増加の後から急激な増加を示し、60 時間後には 24.2%に達した。その後 72 時間後には 14.9%と減少し始め、改善へと向かった。

考 察

これまでに血中 DCPA は HPLC 法や GC/MS 法で測定がなされてきた。³⁾しかし DCPA とその代謝物の DCA、そして同時に配合される NAC の一斉分析法は我々が知る限り報告されていない。

アセトニトリル/リン酸緩衝液を用いた逆相クロマトグラフィーで、3 化合物を良好に保持、分離するにはリン酸緩衝液の pH は 4.0 が適していた。ところで DCPA は酸・アルカリで加水分解されやすく、光によっても分解される。⁴⁾NAC は中—弱酸性溶液中で安定、アルカリや熱によって分解・異性化が起こり、光には安定⁵⁾であるが DCA⁶⁾の安定性

は不明である。この移動相中で DCPA, NAC, DCA の λ max における吸光度を測定したとき各化合物は 48 時間安定であり、分離の過程での分解はないと考えられる。

検出に λ max を用いた DCPA と DCA の検量線は 0.5 ng—100 ng, NAC は 0.1—100 ng の間で良好な直線性を示し、抽出により 10 倍濃縮される結果、血中濃度の定量下限は DCPA と DCA が 0.005 μ g/ml, NAC は 0.001 μ g/ml と微量域まで可能であった。また、ダイオードアレイ検出器を用いた UV スペクトルによる化合物の確認限界は 3 化合物ともに 5 ng (血中濃度では 0.05 μ g/ml) と、DCPA, NAC 合剤の服毒が明らかでない場合のスクリーニングとしても有用である。さらに血清に 0.1 μ g/ml となるよう添加した 3 化合物の回収率は 91.1—94.5 %と良好であった。

血清中の DCPA, NAC, DCA は -20°C で凍結保存した場合、1 ヶ月後には 0.8—5.9%の濃度低下が見られる。したがって検体採取後、速やかに分析することが望ましく、凍結保存後に分析する場合は微量域における定量値の解釈には注意が必要であろう。

クサノン A 乳剤[®]に代表される DCPA, NAC 合剤による中毒では、服毒よりやや遅れて出現する傾向にあるメトヘモグロビン血症が特徴であり、中毒の診断や治療経過・判定において DCPA の血中濃度測定が重要であると言われている。³⁾しかしメトヘモグロビン血症は DCPA の代謝・分解物である

Table 2. Stability of DCPA, NAC and DCA in Frozen Serum

	Preparation time	1 week	2 week	4 week
DCPA (%)	100.0	99.9	8.4	96.2
NAC (%)	100.0	97.4	95.8	94.1
DCA (%)	100.0	100.1	99.9	99.2

Each 1 μ g of DCPA, NAC and DCA was added to 1 ml of serum obtained from 5 healthy human subjects. Samples were stored at -20°C for 4 weeks. The concentrations at the time of preparation are expressed as 100 %. Values are means, $n=5$.

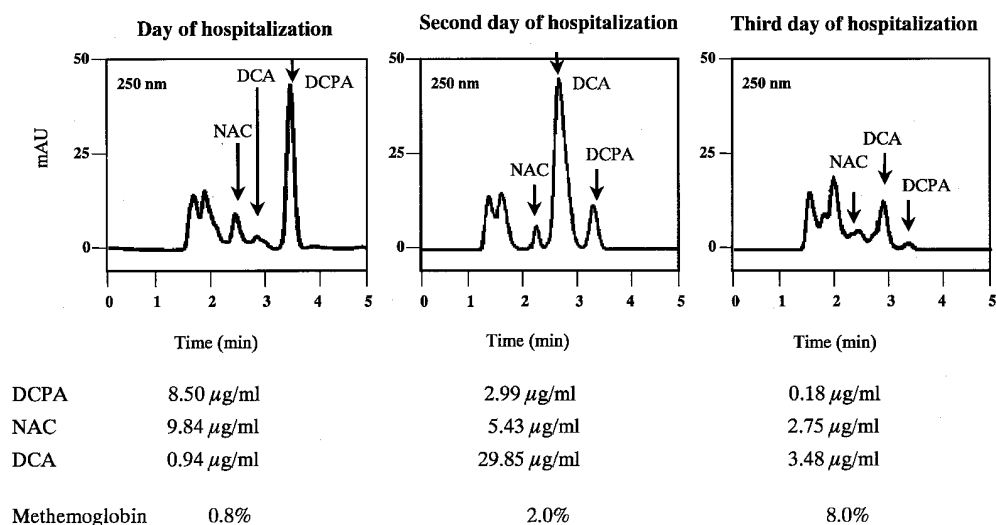


Fig. 2. Changes in Serum DCPA, NAC and DCA Concentrations and Serum Methemoglobin (%) of a Patient with Acute Kusanon A[®] Poisoning

DCA, さらに DCA から生ずる複数のアニリン化合物が引き起こす⁷⁾ことから DCA の測定がより適切と考えられる。今回, 経時的に血中濃度を測定した症例においても DCPA の血中濃度は比較的速やかに消失しており, DCPA の代謝・分解によって血中に増加してくる DCA と血中メトヘモグロビンとの関係の方がより直接的であった。

服毒物が不明の場合に DCPA, NAC 合剤を疑う所見としては①有機溶剤特有の呼気臭, ②カーバメート(NAC)中毒による縮瞳やコリンエステラーゼの低下, ③メトヘモグロビン血症が挙げられ, 詳しい病歴の聴取や臨床症状・検査結果からメトヘモグロビン血症を見つけ出す臨床医の観察力がポイントと言われる。³⁾ 今後は本分析法を併用することによって DCPA, NAC, DCA の迅速な一斉スクリーニングが可能となり, メトヘモグロビン血症が出現する前の段階で DCPA, NAC 合剤中毒を判定する材料が提供されるであろう。さらに分析症例の蓄積によっては, DCA の血中濃度一時間曲線下面積(AUC)よりメトヘモグロビン血症や溶血の重症度が予測されたり, 治療に関する新しい知見が得られるかもしれない。

謝辞 本研究は平成 13 年度厚生科学研究費による研究助成金によるものであり, 深く感謝の意を

表します。

REFERENCES

- 1) Ishizawa J., Ohashi N., Kuroki Y., Tsujikawa A., Mizutani T., "Poisoning Accidents Reported by the Victims, and Countermeasures," Revised ed. by Jiho., Inc., Tokyo, 2000, pp. 229-232.
- 2) Ohashi N., Ishizawa J., Tsujihashi A., Kuroki Y., Numata M., Araya S., *Jpn. J. Toxicol.*, **9**, 437-440 (1996).
- 3) Okabayashi K., Iwasaki K., Yamanoue T., Yashiki M., *Jap. J. Acute Medicine*, **25**, 138-140 (2001).
- 4) The Merck Index Twelfth Edition. MERCK & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 1996, p. 7989.
- 5) The Merck Index Twelfth Edition. MERCK & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 1996, p. 1826.
- 6) The Merck Index Twelfth Edition. MERCK & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 1996, p. 3109.
- 7) Ambrose A.-M., Larson P.-S., Borzelleca J.-F., Hennigar G.-R., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 650-659 (1972).