

救急医療における中毒起因農薬の迅速・簡便分析法に関する研究

森 博美

Study on the Effectiveness of Rapid and Simple Methods for Analysis of Pesticides Causing Acute Poisoning in Emergency Medicine

Hiromi MORI

Pharmaceutical Division, Ogaki Municipal Hospital, 4-86 Minaminokawa-cho, Ogaki 503-8502, Japan

(Received May 17, 2002)

Quick detection of substances causing acute poisoning is often difficult. There is a need for methods that allow rapid detection of pesticides causing acute poisoning, which is often severe and has a high mortality rate, for quick diagnosis and appropriate treatment. The aim of this study was therefore to develop rapid and simple analytical methods for detecting acute poisoning-inducing substances in samples of stomach contents, returned gastric lavage solution, serum, or urine using an analytical device that can be used in the field as well as in pharmaceutical divisions and emergency medical units. We first examined the effectiveness of a screening method using TLC and then the effectiveness of HPLC equipped with a photo-diode array detector (HPLC-DAD) for qualitative and quantitative measurements. In the former technique, we were able to develop a rapid and simple screening method by adjusting the TLC plate and development solvent. In the latter technique, we were able to establish rapid and accurate methods for qualitative and quantitative measurements by using a column-switching technique in which a sample is injected directly into the column without pretreatment. Results of tests using actual samples obtained from patients with acute poisoning showed that the time required for detection using these techniques (less than 1 h) was much shorter than that required using conventional techniques. The use of these techniques should reduce the mortality rate in cases of acute poisoning, since physicians would be able to receive prompt advice regarding diagnosis, prognosis, and treatment methods. We have also designed a practical system for analysis of acute poisoning-inducing pesticides.

Key words—pesticide analysis; TLC; HPLC-DAD; acute poisoning; biological sample

1. はじめに

大垣市民病院では、以前より小児科外来や併設する救命救急センターに急性中毒患者が来院した時、医師から薬剤部へ、中毒起因物質の毒性、中毒症状及び処置法などに関する問い合わせが多い。¹⁻⁶⁾ このため、これらに関する情報を薬剤部から提供しているが、中毒起因物質が判明している場合には効果を発揮するが、不明な場合には分析を行う手段が全くなかったため、とりあえず一般的な処置法と対症療法を行うことでしか対応できない状況にあった。

そこで、当院を受診した中毒患者を解析してみると、重症化、又は死亡した例の大半が農薬によるものであることがわかった。^{3,7)} 中でも有機リン系殺虫剤は農薬中毒の約半数を占めて最も多く、ついでパ

ラコート含有除草剤、殺鼠剤、含リンアミノ酸系除草剤、カーバメート系殺虫剤などの順であった。このため、これらの中毒発生頻度の高い農薬を対象とした中毒起因農薬のスクリーニング法及び定量法の開発が切望されていた。

特に我が国には、米国やフランスなどと異なり、中毒分析センターが存在しない。したがって、中毒分析が必要なときには、その地域の公的な分析可能施設（公害センター、保健環境研究所、大学の各研究室、科学捜査研究所など）に分析を依頼するしか方法がない。しかし、最も適切な場所は、分析結果がすぐに還元できる救急医療現場やその施設内にある薬剤部であろう。一般に、分析には正確さが要求されるが、救急医療現場などでは、ガスクロマトグラフィー・質量分析装置（GC-MS）などの高価な分析機器は設置されていない。ところが、100%とまではいかないまでも、中毒起因農薬がほぼ何であ

大垣市民病院薬剤部（〒503-8502 大垣市南瀬町 4-86）

*本総説は、平成13年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

るかが迅速に確定できれば、早期の拮抗剤・解毒剤の投与や血液浄化法の施行などの治療を開始でき、中毒患者の救命率を大幅に上げることができる。したがって、本研究はこれらの場所でも使用可能な分析機器の範囲内において、患者から採取した検体（胃内容物・胃洗浄液・血清・尿）のいずれからでも検出できる、迅速でしかも簡便な分析法の開発を目的に行った。

まず最初に、簡便でしかも安価な薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いた2種類のスクリーニング法を検討し、ついでフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-DAD）を用いた4種類の定性・定量法を検討した。

2. TLCを用いたスクリーニング法

TLC・I法⁸⁾——本法は、シリカゲルプレート

に、検体をスポットし、4種の展開溶媒で展開させ風乾後、3種の検出法 [UV照射, 4-p-ニトロベンジルピリジン・テトラエチレンペンタミン (NT) 試薬及びドラーゲンドルフ (DD) 試薬の噴霧] を用いて、それらを検出する方法である。中毒患者の血清の前処理に ODS カートリッジを用い、脂溶性農薬と水溶性農薬の2つのルートで、目的とする農薬の抽出を行った。また、あらかじめ農薬標準品のデータを求めるため、46種のそれらのメタノール溶液を用い、各展開溶媒ごとに設定したマーカー色素のスポットの Rf 値を 100 として、それぞれのスポットの相対 Rf×100 値を求めた。最終的に、実際の中毒患者の検体とこれらのデータとを比較し、スクリーニングを行った。その結果、農薬標準品のデータにおいては、paraquat, diquat, guazatine

Table 1. Relative Rf Values of Organophosphates and Carbamates

No.	Compound	Maker ^{a)}	Group ^{b)}	D.M. ^{c)}	Relative Rf×100 values developing solvent system ^{d)}			
					I	II	III	IV
1	Vamidotion	Sh	P	NT	3	25	68	124
2	Acephate	Wa	P	NT	4	13	4	28
3	Benomyl	Du	C	UV	5	9	107	127
4	Trichlorfon (DEP)	Wa	P	NT	7	32	12	89
5	Dimethoate	Su	P	NT	13	62	56	133
6	Methomyl	Du	C	UV	14	88	65	141
7	Formothion	Wa	P	NT	35	133	0	140
8	Pyridaphenthion	Wa	P	UV	35	134	104	145
9	Carbaryl (NAC)	Wa	C	UV	38	129	84	168
10	Dichlorvos (DDVP)	Wa	P	NT	47	135	91 ^{e)}	114 ^{e)}
11	Fenobucarb (BPMC)	Ch	C	UV	55	138	87 ^{f)}	144 ^{f)}
12	Methidathion (DMTP)	Ci	P	NT	58	173	136	183
13	Cyanophos (CYAP)	Su	P	NT	58	185	108	148
14	Edifenphos (EDDP)	Wa	P	UV	59	159	114	168
15	Iprofenfos (IBP)	Wa	P	UV	59	146	100 ^{f)}	118 ^{f)}
16	Pirimicarb	Ic	C	UV	60	94	94	147
17	Malathion	Wa	P	NT	65	185	119	149
18	Salithion	Su	P	NT	68	191	110	169
19	Fenitrothion (MEP)	Wa	P	UV	71	194	134	165
20	Phenthoate (PAP)	Wa	P	NT	76	183	105 ^{f)}	188
21	Isoxathion	Wa	P	UV	77	188	122	148
22	EPN	Ch	P	UV	80	190	123	171
23	Fenthion (MPP)	Wa	P	UV	82	185	171	188
24	Diazinon	Ch	P	UV	89	158	119	170
25	Chlorpyrifos methyl	Wa	P	NT	108	185	140	188

a) Sh: SHIONOGI, Wa: WAKO, Du: DUPONT, Su: SUMITOMO, Ch: CHUGAI, Ci: CIBA, Ic: ICI. b) P: organophosphate, C: carbamate. c) Detection method: NT: 4-(p-nitrobenzyl) pyridine-tetraethylenepentamin, UV: 254 nm radiation. d) Developing solvent system, I: n-hexane: acetone (4: 1), II: chloroform: acetone (9: 1), III: chloroform: acetone: 28% ammonia liq. (9: 1: 0.5), IV: chloroform: dioxane: ethylacetate: 28% ammonia liq. (25: 60: 10: 5). marker: methyl yellow (Rf=0.52); methyl red (Rf=0.51); malachite green (Rf=0.85); rhodamine B (Rf=0.67). Detection quantity, e): 20 µg, f): 5 µg, the others: 1 µg.

は、いずれの展開溶媒でも原点にとどまったままであったが、その他の農薬は、良く分離し、良好なスポットが得られた (Tables 1 及び 2)。なお、本法の各農薬の検出限界は 0.01—30 μg であった。各農薬の相対 $R_f \times 100$ 値のばらつきは少なく、農薬標準品を添加した血清の前処理における回収率は平均 87.2% と良好であった。

本法を実際の中毒患者 4 例の検体に応用したところ、胃洗浄液及び血清から中毒起因農薬のスクリーニングができた。なお、1 検体の分析所要時間はいずれも 2 時間前後であった。ただし、死亡率の高いパラコート含有除草剤 (paraquat と diquat の合剤) の確認には、発色試薬を用いた呈色反応がある。⁹⁾ この方法は高感度でしかも迅速であり、さらにその呈色の程度を分光光度計で測定すれば定量もできる。したがって、TLC・I 法では paraquat 及び diquat を分析の対象農薬としたが、それ以降の実験ではこれらを除外した。なお、TLC・I 法において、原点にとどまっていた 3 つの農薬の最終的な鑑

別には、この呈色反応を用いることが必要であると思われる。また、有機リン系殺虫剤である malathion, fenitrothion, isoxathion の 3 者は相対 $R_f \times 100$ 値が、いずれの展開溶媒においても近似しているため、これらの鑑別が若干困難であった。

TLC・II 法¹⁰⁾——本法は、TLC・I 法をより迅速にするため、展開溶媒を 2 種類のみとし、噴霧試薬を使用しなくてもすむ、混合蛍光剤入りシリカゲルプレート (FM プレート[®]) を用いた方法である。このプレートは広域の UV を照射することにより、スポットが各化合物特有の色調を示すように工夫されたものである。¹¹⁾ なお、検体としては農薬の含有量が高く、かつ代謝物を含んでいない胃内容物又は胃洗浄液を用いた。これらの検体の前処理法は、TLC・I 法と基本的には同じであるが、回収率をさらに上げるため洗浄液は水のみとした。30 種の農薬標準品のメタノール溶液を FM プレート[®] にそれぞれスポットし、展開させ風乾後、TLC・I 法と同様に、各農薬の相対 $R_f \times 100$ 値を算出し、スポッ

Table 2. Relative R_f Values of Other Pesticides

No.	Compound	Maker ^{a)}	Group ^{b)}	D.M. ^{c)}	Relative $R_f \times 100$ values developing solvent system ^{d)}			
					I	II	III	IV
26	Paraquat	Ic	H	DD	0	0	0	0
27	Diquat	Ic	H	DD	0	0	0	0
28	Guazatine	Da	F	DD	0	0	0	0
29	Cartap	Ta	I	DD	1	0	83 ^{e)}	133 ^{e)}
30	Asulam	Sh	H	UV	1	20	0	0
31	Mecoprop (MCP)	Wa	H	UV	5	4	0	0
32	Thiophanate methyl	Wa	F	UV	8	103	49	138
33	Bensultap	Ta	I	UV	28	152	0	0
34	Warfarin	Ei	R	UV	29	110	3	16
35	Simazine (CAT)	Wa	H	UV	44	84	84	145
36	Pyrazolate	Sa	H	UV	46	163	107	148
37	Propanil (DCPA)	Wa	H	UV	51	124	80	136
38	Isoprothiolane	Wa	F	UV	58	183	101	148
39	Thiocyclam	Wa	I	UV	58	51	83 ^{f)}	148 ^{f)}
40	Napropamide	Ic	H	UV	58	123	94	68 ^{f)}
41	Dicofol (Keltthane)	To	I	UV	83	140 ^{g)}	100	180
42	Fthalide	Wa	F	UV	85	180	99	137
43	Ioxynil	Sh	H	UV	95	204	133	150
44	Pendimethalin	Nc	H	UV	110	193	114	157
45	Amitraz	Wa	I	UV	123	170	98	169
46	Quintozene (PCNB)	Wa	F	UV	157	198	104	184

a) Ic: ICI, Da: DAINIPPON-CHEMICAL, Sh: SHIONOGI, Wa: WAKO, Ta: TAKEDA, Ei: EISAI, Sa: SANKYO, To: TOKYO-YUKIKAGAKU, Nc: NIPPON-CYANAMIDE, He: HOECHST, Ch: CHUGAI. b) H: herbicide, F: fungicide, I: other insecticide, R: rodenticide. c) Detection method: DD, dragendorff. d) For the developing solvent system, see Table 1. Detection quantity, e): 2 μg , f): 5 μg , g): 3 μg , the others: 1 μg .

トの色調も併せてデータとした。そして、実際の中毒患者の検体とこれらのデータとを比較し、スクリーニングを行った。農薬標準品のデータにおいては、30種のそれらは良く分離し、良好なスポットが得られた。相対 $R_f \times 100$ 値のばらつきも少なく、広域 UV ランプで検出されたスポットは、各農薬ごとに特徴的な色調を示した (Table 3)。なお、本法の各農薬の検出限界は $0.25-25 \mu\text{g}$ であった。農薬標準品を添加した血清の前処理における回収率は平均 90.6% と良好であった。

本法を実際の中毒患者 5 例の検体に応用したとこ

ろ、胃内容物及び胃洗浄液から中毒起因農薬のスクリーニングができた。なお、1 検体の分析所要時間は TLC・I 法より 1—1.5 時間短縮した。本法は、噴霧試薬を用いないためドラフトチャンバーを必要とせず、どこでも操作ができる。また、TLC・I 法で鑑別が若干困難であった malathion, fenitrothion, isoxathion の 3 者においては、広域の UV 照射による呈色がそれぞれ異なるため、これらの鑑別が容易となった。このため、低毒性の malathion, fenitrothion と、強毒性の isoxathion とを区別することができ、本法は臨床的により有用となった。これらの

Table 3. Relative R_f Values and Color of Pesticides

($n=3$)

No.	Compound	Maker ^{a)}	Group ^{b)}	Relative $R_f \times 100$ value developing solvent system ^{c)}		Color ^{d)}
				I	II	
1	Glyphosate	Wa	H	0	0	Royal purple ^{e)}
2	Glufosinate	He	H	0	0	Royal purple ^{e)}
3	Asulam	Sh	H	2	21	Brown
4	Vamidothion	Sh	P	5	38	Pink
5	Thiophanate methyl	Wa	F	5	98	Purple
6	Methomyl	Wa	C	10	97	Strong pink
7	Warfarin	Ei	R	10	105	Indigo
8	Dimethoate	Su	P	12	80	Pale pink
9	Amitraz	Wa	I	24	87	Strong pink
10	Cyanophos (CYAP)	Su	P	32	186	Strong pink
11	Mecoprop (MCP)	Wa	H	34	109	Pale purple
12	Pyridaphenthion	Wa	P	35	140	Indigo
13	Pyrazolate	Sa	H	36	147	Royal purple
14	Propanil (DCPA)	Wa	H	42	123	Strong pink
15	Benomyl	Du	C	44	31	Pink
16	EPN	Ch	P	47	192	Maroon
17	Edifenphos (EDDP)	Wa	P	48	163	Maroon
18	Napropamide	Ic	H	53	140	Royal purple
19	Iprofenfos (IBP)	Wa	P	53	152	Pale pink
20	Isoprothiolane	Wa	F	53	171	Indigo
21	Methidathion (DMTP)	Ci	P	53	184	Strong pink
22	Fenobucarb (BPMC)	Ch	C	54	159	Pale pink
23	Malathion	Wa	P	65	185	Pale pink
24	Salithion	Su	P	67	193	Pale purple
25	Fenitrothion (MEP)	Wa	P	69	187	Royal purple
26	Isoxathion	Wa	P	76	192	Strong pink
27	Diazinon	Ch	P	95	167	Strong pink
28	Chlorpyrifos methyl	Wa	P	108	187	Light blue
29	Pendimethalin	Nc	H	124	189	Greenish brown
30	Quintozone (PCNB)	Wa	F	149	189	Purple

a) Wa: Wako, He: Hoechst, Sh: Shionogi, Ei: Eisai, Su: Sumitomo, Sa: Sankyo, Ch: Chugai, Du: DuPont, Ic: ICI, Ci: Cibe, Nc: Nippon-Cyanamide. b) H: herbicide, P: organophosphate, F: fungicide, C: carbamate, R: rodenticide, I: other insecticide. c) Developing solvent system, I: *n*-hexane-acetone (4: 1), II: chloroform-acetone (9: 1). Marker: methyl yellow ($R_f=0.60$), methyl red ($R_f=0.51$). d) Detection method: UV (254—600 nm). e) Ninhydrin reaction.

TLC法は、検出感度が低いことや正確な定量ができないことなどの欠点はあるが、高価な機器を必要とせず、どこでも、だれでも、迅速でしかも簡便な測定ができ、救急医療現場や病院の薬剤部で行うスクリーニングには、非常に適していることがわかった。

3. HPLC-DADを用いた方法

HPLC-DAD・I法^{12,13)}——本法は、TLCよりも検出感度が高く、定性にも適していると考えられるHPLC-DADを用いた、有機リン系殺虫剤を中心とした脂溶性農薬の分析法である。

実験装置は島津製作所製で、ポンプはLC-10A、フォトダイオードアレイ検出器はSPD-M10Aを用いた。カラムはODS、移動相はアセトニトリル：水（50：50）を用い、流速は1.0 ml/分、カラム温度は40°Cで測定を行った。

分析手順は、血清をTLC・II法（脂溶性農薬用ルート）と同様に前処理し、得られた溶液をHPLCに注入する。そして、あらかじめ測定しておいた26種の農薬標準品の保持時間とUV吸収スペクトルのデータを検体のそれと比較し、中毒起因

農薬を同定するものである。また、同時に定量可能かどうかとも4点検量線を作成し検討した。その結果、農薬標準品26種の混合液をHPLCに注入したとき、すべてのピークは35分以内に出現した（Fig. 1）。それぞれの農薬のピークは完全には分離していなかった。しかし、農薬標準品の波長200—300 nmにおけるUV吸収スペクトルは各農薬ごとに波形が大きく異なっている。このうちの12種のUV吸収スペクトルを示す（Fig. 2）。このため、例えば保持時間が酷似していても、同定には支障がなかった。本法の各農薬の検出限界は0.14—9.37 ngと高感度であった。また、検量線は、いずれの農薬も100 µg/ml以下において、濃度とピーク面積が良好な直線性を示し、定量には支障がなかった。

本法を実際の中毒患者5例の検体に応用したところ、保持時間とUV吸収スペクトルのデータから、1検体につき2—3時間で中毒起因農薬が同定でき、同時に定量もできた。一方、本法は、前述したTLC・I及びII法よりかなり高感度であるため、農薬が極微量にしか含まれていない血清を用いた定性にも適している。また、血清中の農薬の定量が可能

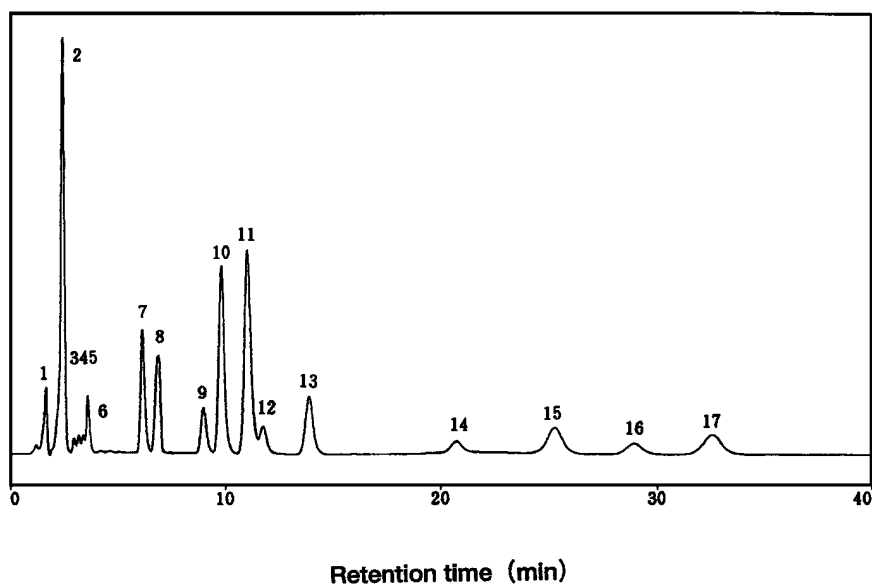


Fig. 1. Chromatogram of 26 Standard Pesticides by HPLC-DAD

Twenty µl methanol containing 38 µg/ml of each pesticide was injected. Peak: 1: asulam (tR. 1.5±0.08 min), 2: vamidothion (tR. 1.9±0.06 min), methomyl (tR. 2.1±0.02 min), benomyl (tR. 2.2±0.02 min), dimethoate (tR. 2.3±0.01 min), 3: amitraz (tR. 2.9±0.02 min), 4: thiophanate methyl (tR. 3.1±0.03 min), 5: dichlorvos (DDVP) (tR. 3.3±0.01 min), 6: propanil (DCPA) (tR. 6.0±0.11 min), 7: cyanophos (CYAP) (tR. 6.6±0.04 min), fenobucarb (BPMC) (tR. 6.6±0.05 min), salithion (tR. 6.8±0.05 min), 8: methidathion (DMTP) (tR. 6.9±0.14 min), 9: pyridaphenthion (tR. 8.8±0.40 min), 10: napropamide (tR. 9.5±0.03 min), 11: iprofenfos (IBP) (tR. 10.5±0.13 min), isoprothiolane (tR. 10.9±0.04 min), malathion (tR. 10.9±0.30 min), 12: fenitrothion (MEP) (tR. 11.5±0.21 min), 13: edifenfos (EDDP) (tR. 13.6±0.34 min), 14: diazinon (tR. 20.3±0.42 min), 15: pyrazolate (tR. 24.1±0.34 min), chlorpyrifos methyl (tR. 25.1±0.22 min), quintozene (PCNB) (tR. 26.4±0.20 min), 16: isoxathion (tR. 29.1±0.56 min), 17: EPN (tR. 32.6±0.60 min). HPLC conditions: column: Shim Pack CLC-ODS (M) 150 mm×4.6 mm i.d., column temp.: 40°C, mobile phase: acetonitrile—water (50 : 50, v/v), flow-rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 220 nm.

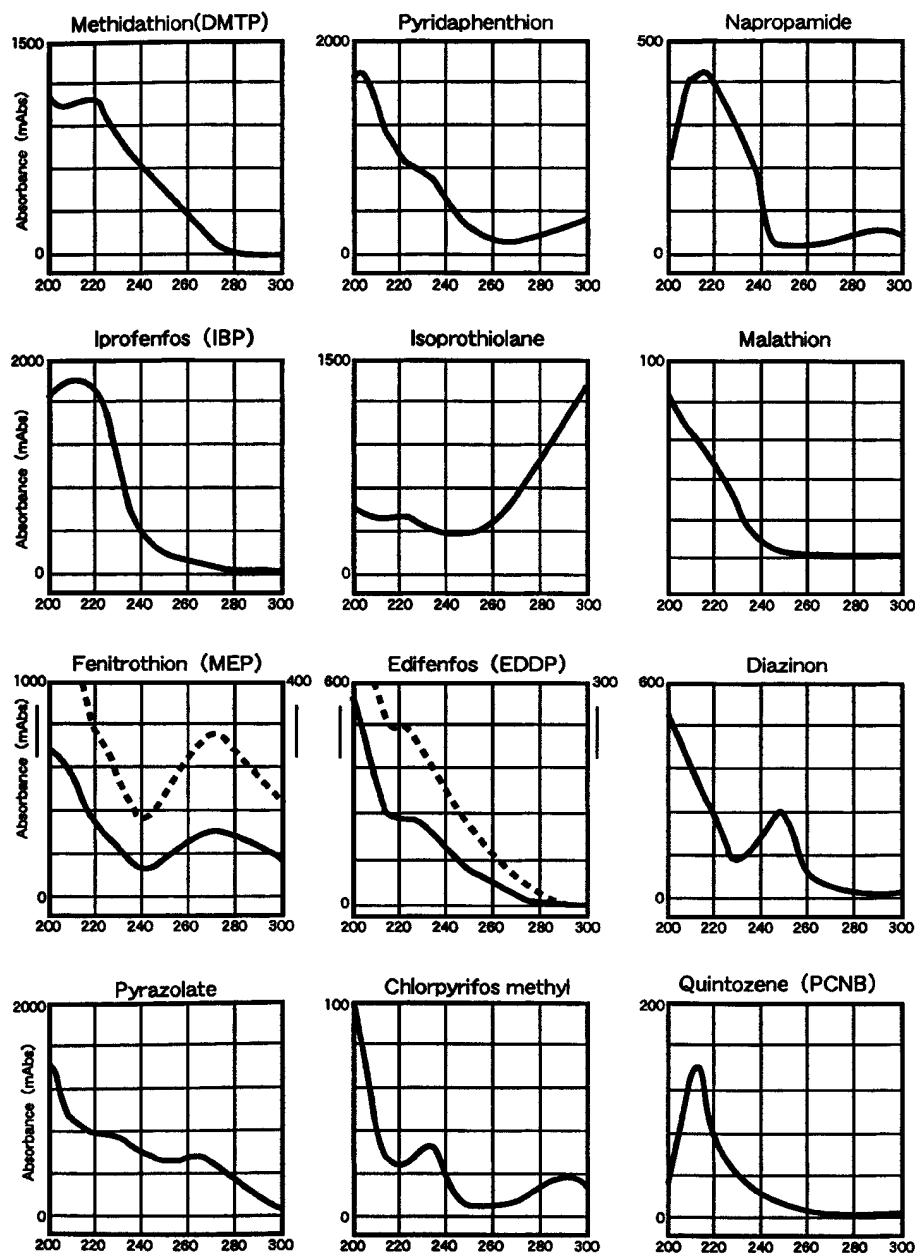


Fig. 2. UV Spectra of 12 Pesticides (Abbreviated Other Pesticides)
 —: standard spectrum, ----: magnified spectrum.

となったため、重症度の判定や治療法の選択にも有用である。さらに、有機リン系殺虫剤やカーバメート系殺虫剤中毒の場合、初期に血清中のコリンエステラーゼ値の低下が起きるが、これが正常域へ戻るには、中毒症状が消失してからかなりの時間を要する。したがって、経時的な農薬の血清中濃度の測定は、予後の推定のために有力な武器となる。

HPLC-DAD・II法¹⁴⁾——本法は、水溶性農薬である含リンアミノ酸系除草剤3種の分析法である。glyphosate, glufosinate, bialaphosはいずれも水溶

性であり、しかもこれらの化合物はUV吸収をもたないため、HPLC-DAD・I法では分析が不可能である。そこで、Tomita et al.¹⁵⁾の方法に準じ、UV吸収をもつこれらの誘導体を作り、分析可能かどうかを検討した。

実験装置とカラムはHPLC-DAD・I法と同様で、移動相はpH 2.30のリン酸緩衝液：アセトニトリル(85：15)を用い、カラム温度は50℃で測定を行った。また、血清の前処理には、液性を変化させない限外ろ過フィルター(ウルトラフリー®4)を

用いた。

分析手順は、血清をウルトラフリー[®]4に注入し、30分間遠心後、得られたろ液にリン酸緩衝液を加え攪拌し、誘導化剤である *p*-toluenesulfonyl chloride を添加し反応させる。その溶液を HPLC に注入し、あらかじめ測定しておいた農薬標準品 3 種の誘導体の保持時間と UV 吸収スペクトルのデータと検体のそれとを比較し、中毒起因農薬を同定するものである。また、同時に定量可能かどうか 5 点検量線を作成し検討した。その結果、含リンアミノ酸系除草剤 3 種の誘導体の混合液を HPLC に注入したとき、すべてのピークは 10 分以内に出現した (Fig. 3)。3 つのピークは完全に分離し、誘導化により HPLC-DAD での検出が可能となった。本法の各農薬の検出限界は 0.6—6.8 ng と高感度であった。なお、検量線はいずれの農薬も 500 μ g/ml 以下において濃度とピーク面積が良好な直線性を示し、定量には支障がなかった。また、農薬標準品を添加した血清の前処理における回収率は平均 66.5% であった。

本法を実際の中毒患者 3 例の検体 (血清) に応用したところ、保持時間と UV 吸収スペクトルのデータから、1 検体につき約 1 時間で中毒起因農薬が同定でき、同時に定量もできた。本法は、水溶性農薬であるにもかかわらず HPLC-DAD・I 法で用いたカラムや検出器をそのまま使用でき、新たな機器を

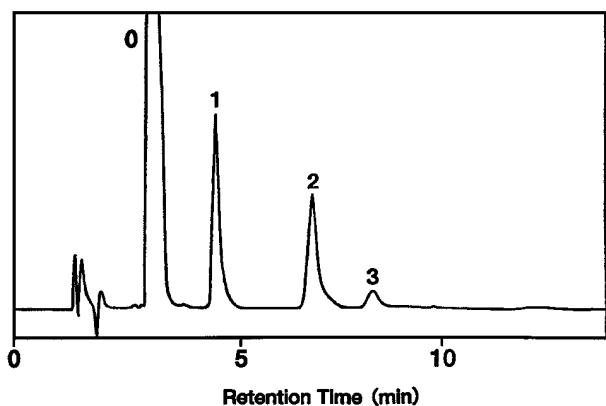


Fig. 3. Chromatogram of 3 Standard Derivatives by HPLC-DAD

Twenty μ l of derivatized solution containing 19.6 μ g/ml of each pesticide was injected. Peak: 0: *p*-toluenesulfonyl chloride, 1: derivative of glyphosate, 2: derivative of glufosinate, 3: derivative of bialaphos. HPLC conditions: column: Shim Pack CLC-ODS (M) 150 mm \times 4.6 mm i.d., column temp.: 50°C, mobile phase: 0.2 M phosphate buffer (pH 2.30): acetonitrile-water (85 : 15, v/v), flow-rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 230 nm.

購入する必要がないため開発にコストがほとんどかからなかった。また、含リンアミノ酸系除草剤を誘導化すると、血清中の成分も同様に誘導化するため、それらのピークの UV 吸収スペクトルは類似するが、保持時間が異なるため同定には支障がなかった。一般に、血清の除蛋白にはトリクロル酢酸などを用いるが、誘導化のためには pH の変動をさけることが必要であることから、この限外ろ過法を用いた。前処理にこの方法を導入することにより、誘導化反応が安定したため、本法を完成させることができた。

4. カラムスイッチング法

HPLC-DAD・III 法¹⁶⁾——本法は、HPLC-DAD・I 法をより迅速にするために、検体を前処理なしで、直接 HPLC に注入することができるカラムスイッチング法を用い、分析時間の短縮を目的とした方法である。

実験装置は HPLC-DAD・I 法で用いたものに、ポンプと手動式の 6 方スイッチングバルブを加えた。カラムスイッチング装置の構成と流路を示す (Fig. 4)。(a)は試料を注入する段階での流路図であり、注入された試料はまず前処理用移動相によって前処理用カラムに運ばれる。ここで目的成分である農薬が保持され、血清タンパクやその他の夾雑物のほとんどは系外に流される。4 分後にスイッチングバルブを手動で切り換えると (b) の分析用流路になる。前処理用カラムに保持されていた農薬が、分析用移動相によって逆方向に溶出し分析用カラムへと送られ、そこで分離される。その後、再びスイッチングバルブを (a) に戻すと、前処理用カラムは洗浄され、次の分析への待機状態となる。前処理用カラムは Sumi Bio Trap[®] 500 C18、移動相は 4% プロパノール・リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、流速は 2.5 ml/分で行った。また、分析用カラムの条件は HPLC-DAD・I 法と同様である。なお、農薬標準品としては主要なもの 10 種を用いた。また、検体としては胃内容物、胃洗浄液、血清、尿のすべてを用いた。その結果、主要な農薬標準品 10 種の混合液を HPLC に注入したときの、すべてのピークは 30 分以内に出現した (Fig. 5)。本法の各農薬の検出限界は 10 ng 以下と高感度であった。検量線は、いずれの農薬も、人工胃液では 250 μ g/ml 以下、血清及び尿では 50 μ g/ml 以下において、濃度とピー

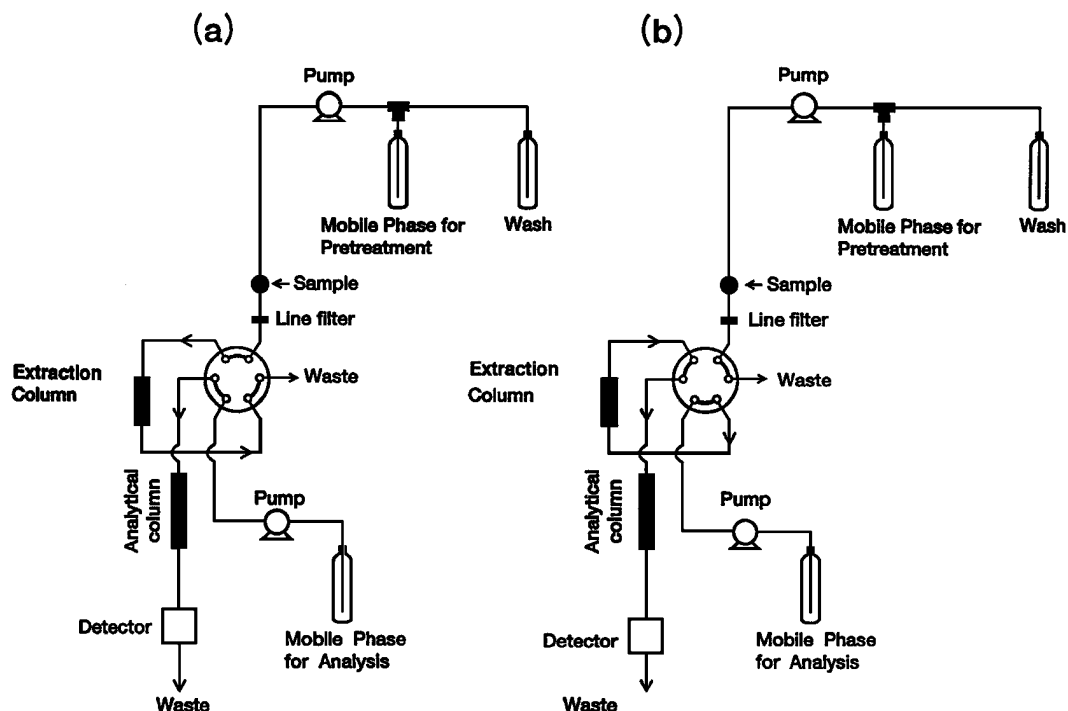


Fig. 4. Schematic Flow Diagram of HPLC System
(a) Extraction position, (b) Elution position.

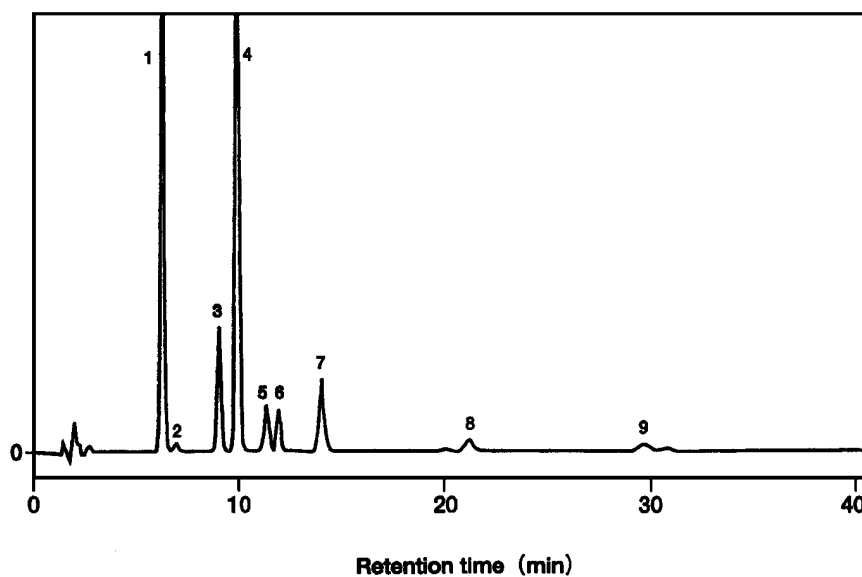


Fig. 5. Chromatogram of Standard Solutions of Important Pesticides by Column-Switching HPLC-DAD

One hundred μ l saline containing 10 μ g/ml of each pesticide was injected. Peak: 1: propanil (tR. 6.1 ± 0.11 min), 2: fenobucarb (tR. 6.8 ± 0.33 min), 3: pyridaphenthion (tR. 8.9 ± 0.04 min), 4: napropamide (tR. 10.1 ± 0.18 min), 5: isoprothiolane (tR. 11.3 ± 0.09 min) and malathion (tR. 11.3 ± 0.07 min), 6: fenitrothion (tR. 11.9 ± 0.09 min), 7: edifenfos (tR. 13.7 ± 0.06 min), 8: diazinon (tR. 22.0 ± 0.18 min), 9: isoxathion (tR. 29.4 ± 0.81 min), HPLC pretreatment conditions: column: Sumi Bio Trap 500 C18 (13 mm \times 4.0 mm i.d.), mobile phase: 4% 2-propanol in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), flow rate: 2.5 ml/min, pretreatment time: 4 min, wash: acetonitrile-water (50 : 50, v/v). HPLC analytical conditions: column: Shim Pack CLC-ODS (M) (150 mm \times 4.6 mm i.d.), column temp.: 40°C, mobile phase: acetonitrile-water (50 : 50, v/v), flow rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 235 nm.

ク面積が良好な直線性を示し定量には支障がなかった。また、農業標準品を添加した人工胃液、血清、尿の前処理における回収率はそれぞれ平均 87.9%

100.4%, 90.6%と良好であった。

本法を実際の中毒患者 3 例の検体（胃洗浄液・血清・尿）に応用したところ、中毒起因農薬の同定及

び定量を同時に行うことができた (Table 4).

症例 3 は来院時の症状から有機リン系殺虫剤を服毒したことが疑われた患者である。服毒して約 30 分後の胃洗浄液、血液及び尿を用いて分析を行った。それぞれのクロマトグラムと血清中のピーク BS の UV 吸収スペクトルを示す (Fig. 6)。胃洗浄液、血液及び尿において、保持時間と UV 吸収スペクトルの波形の類似性から、中毒起因農薬が isoxathion であることが同定できた。Isoxathion 中毒には、特にプラリドキシムヨウ化メチル (パム®) が解毒剤として有効¹⁷⁾であるため、その大量投与を医師にアドバイスしたところ、投与後、急速に症状が改善した。

カラムスイッチング法を用いることで従来の HPLC-DAD・I 法に比べ、1 検体の分析所要時間は飛躍的に短縮し、50—55 分となった。HPLC-DAD・I 法は、前処理法に ODS カートリッジを用いているため、得られた溶液を蒸発乾固させ、その後、再溶解させる必要があることから長時間を要す。本法は、これが省略でき分析時間が短縮したため、救急医療現場での有用性が非常に高まった。

5. Fenitrothion 及びその代謝物の同時定量法

HPLC-DAD・IV 法¹⁸⁾——本法は、我が国で最も急性中毒の発生頻度の高い有機リン系殺虫剤^{19,20)}である fenitrothion (以下, FNT), 及びその活性代謝物 fenitrooxon (以下, FN-OX), リン酸基が外れた代謝物 3-Methyl-4-nitrophenol (以下, MNP) の 3 者の同時定量法である。

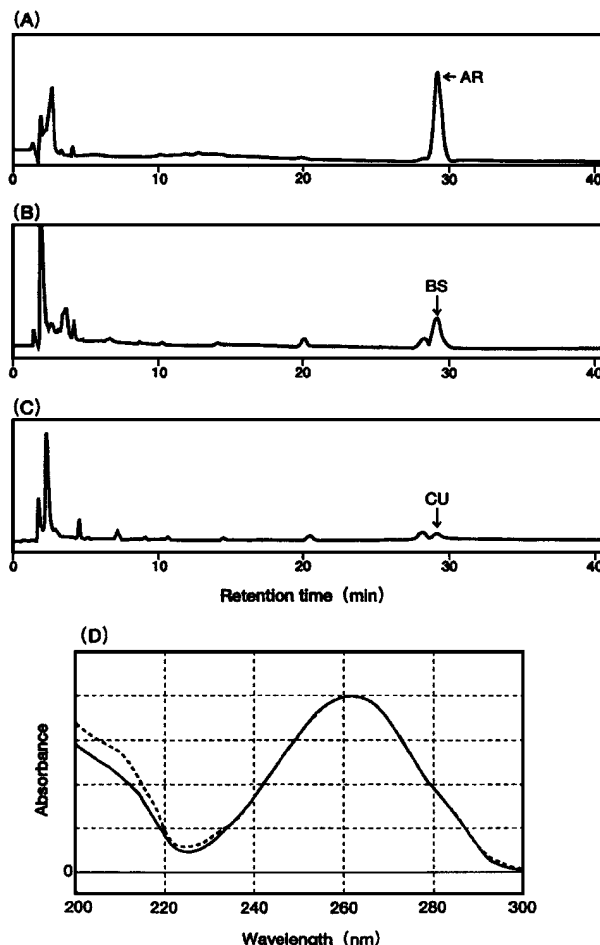


Fig. 6 HPLC Chromatograms of Case 3 and UV Spectra of Isoxathion and Peak BS

(A): returned gastric lavage solution, (B): serum, (C): urine, (D): Spectra of isoxathion (----) and peak BS (—).

(A) (B) (C) HPLC conditions: see Fig. 5. Peaks AR, BS and CU coincided with isoxathion on retention time and UV spectrum. Detection wavelength: 235 nm.

Table 4. Cases in which this Method was Applied (Analyzed Data)

Case	Patient	Suspected poison and dose	Sample	Retention time (min)	Similarity ^{b)} of UV spectrum	Confirmed poison	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Analyzing time (min)
1	72 ♀ Suicide	Sumithion® (fenitrothion) unclear	R.g.l. ^{a)}	12.0	1.000	Fenitrothion	638 ^{c)}	50
			Serum	12.0	1.000	Fenitrothion	15.1	55
			Urine	—	—	—	—	50
2	61 ♂ Suicide	Malathion® (malathion) unclear	R.g.l.	11.3	1.000	Malathion	110.9	50
			Serum	11.4	0.999	Malathion	0.5	55
			Urine	—	—	—	—	50
3	62 ♀ Suicide	Organo phosphorus insecticide unclear	R.g.l.	29.2	0.991	Isoxathion	201.4 ^{d)}	50
			Serum	29.3	0.997	Isoxathion	9.1	55
			Urine	29.6	0.972	Isoxathion	2.6	50

^{a)} Returned gastric lavage solution. ^{b)} Similarity of the UV spectrum was calculated by the method described in our previous paper³⁾. ^{c, d)} The concentrations of these pesticides were obtained from solutions diluted three (c) or ten (d) times with artificial gastric juice. Therefore, the resultant concentration was multiplied three (c) or ten (d) times to obtain the final concentration. —: not detected.

実験装置は前法の HPLC-DAD・III 法と同様であり、測定条件としては前処理用の移動相が、酢酸で pH を 4.5 に調整したリン酸緩衝液で、分析用の移動相がアセトニトリル：水 (40 : 60)、流速は分析開始後 7 分までは 1.0 ml/分、それ以降は 2.0 ml/分とし測定を行った。なお検体としては、血清及び尿を用い検討した。その結果、FNT, FN-OX 及び MNP の 3 種の混合液を血清又は尿に添加したとき、それぞれのピークは 25 分以内に溶出し、生体成分の影響を受けずそれらのピークは完全に分離した (Fig. 7)。本法の検出限界は 10 ng 以下と高感度であった。検量線は、血清及び尿に標準品を添加した場合に、いずれも 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下において濃度とピーク面積が良好な直線性を示し、定量には支障がなかった。また、添加した標準品の血清及び尿の前処理における回収率はそれぞれ平均 91.4%, 101.8% と良好であった。

本法を FNT 中毒患者 3 例の検体 (血清・尿) に応用したところ、保持時間と UV 吸収スペクトルのデータから各成分が同定でき、同時に定量が可能であった。なお、1 検体の分析所要時間は 35 分と短かった。この中の 1 例として、FNT 乳剤を自殺企図にて左下腿部に静注した患者の血清中の FNT 濃

度と尿中の MNP 排泄量の推移及び臨床経過を示す (Fig. 8)。経時的な測定結果により、予後の推定ができたため極めて有用であった。本法は、MNP の分析が HPLC-DAD・I や III 法では不可能なため、HPLC-DAD・III 法の前処理用移動相の pH を 5.0 以下の酸性に変えることで、MNP の検出を可能にした。これは MNP の化学構造中に水酸基がある関係で、pH 5.5 以上ではイオン化が起これ水溶性となって、前処理カラムには吸着しないと考えられる。尿中の MNP は、血清中の FNT が消失した以降もしばらく患者の尿から検出される。このため服毒後、長時間経過して来院した症例に対しては、例え血清中に FNT が存在しなくても、尿中に MNP が認められれば FNT 中毒であることが診断できる。さらに、従来の血清コリンエステラーゼ値のみを指標とするよりは、本法で得られたデータを加味すれば、より重症度の判断や予後の推測を確実なものにすることができる。

6. おわりに

本研究における分析対象農薬は、当院及び全国で中毒の発生頻度が高くかつ重症化しやすいもの、また生産量の多いものから選択した。これらですべての農薬中毒に対応することはできないが、主要な農

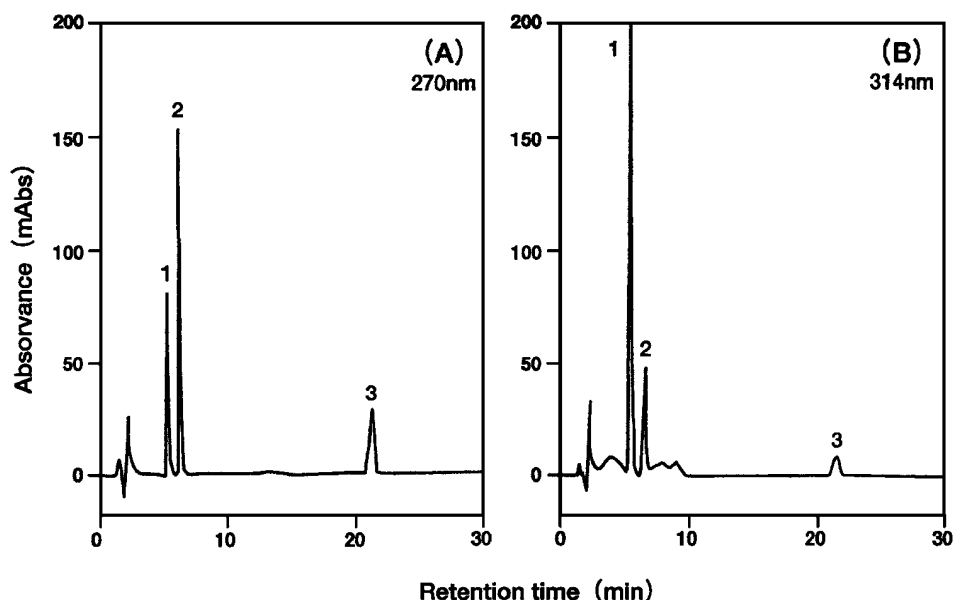


Fig. 7. Chromatograms of Mixed Standard Solutions of Fenitrothion and its Metabolites by Column-Switching HPLC-DAD

One hundred μl saline containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each pesticide was injected. Peak: 1: 3-methyl-4-nitrophenol (tR. 5.5 ± 0.02 min), 2: fenitrooxon (tR. 6.4 ± 0.03 min), 3: fenitrothion (tR. 21.7 ± 0.32 min), HPLC extraction conditions: column: Sumi Bio Trap 500 C18 (13 mm \times 4.0 mm i.d.), mobile phase: 20 mM sodium phosphate buffer (pH 4.5 regulated by acetic acid), flow rate: 2.5 ml/min, extraction time: 4 min, wash: acetonitrile-water (50 : 50, v/v). HPLC analytical conditions: column: Shim Pack VP-ODS (150 mm \times 4.6 mm i.d.), column temp.: 40°C, mobile phase: acetonitrile-water (40 : 60, v/v), flow rate: 1.0 ml/min until 7 min, 2.0 ml/min from 7.01 min, detection wavelength: 270 nm (A) and 314 nm (B).

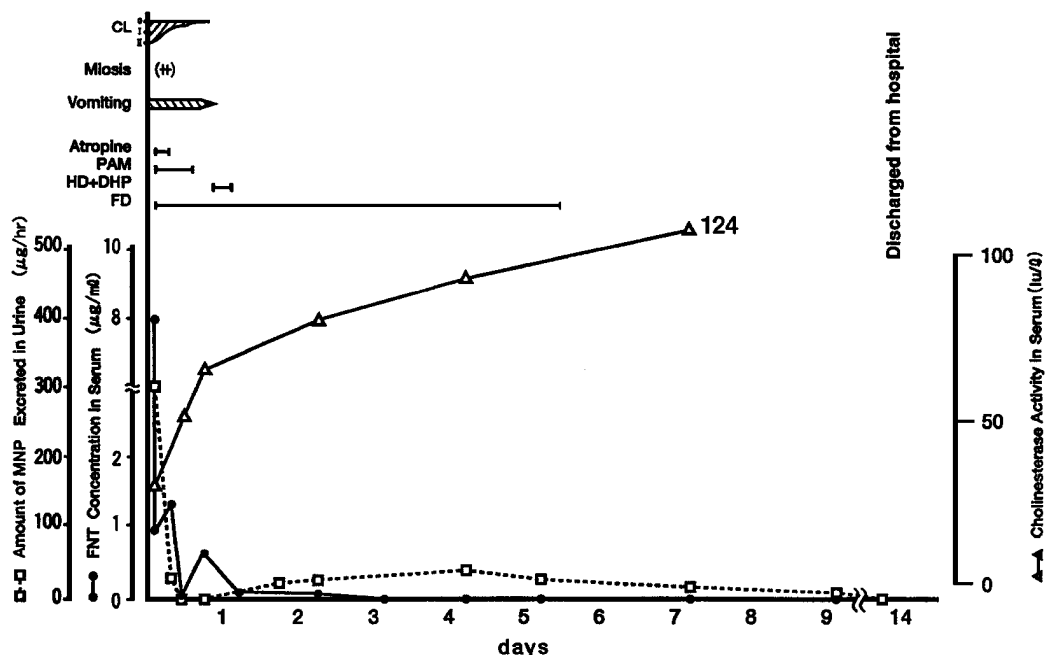


Fig. 8. Clinical Course and FNT and MNP Concentration of Intravenous Injected Case

CL: consciousness level (Japan Coma Scale: I—III), PAM: pralidoxime iodide, HD+DHP: hemodialysis and direct hemoperfusion, FD: forced diuresis, Cholinesterase Activity in serum: normal value (300—710 IU/l).

薬中毒には十分に対応できると思われる。

また、分析機器については、救急医療現場や各病院の薬剤部などにある範囲で、迅速でしかも簡便な中毒起因農薬のスクリーニング法及び定性・定量法の開発を目的に研究を行った。その結果、種々のケースに合った迅速でしかも簡便な分析法を確立することができた。また、患者から採取した検体（胃内容物・胃洗浄液・血清・尿）のいずれを用いても、優れた前処理法により分析に支障はなかった。

実際に農薬中毒が疑われる患者が来院した時に活用できるよう、本研究で検討した6つの方法を系統的に組み合わせた救急医療における中毒起因農薬の分析手順を示す (Fig. 9)。まず、最初に中毒起因農薬が全く不明の場合には、TLC・I又はII法を用いて、スクリーニングを行う。これによりある程度、中毒起因農薬が絞り込まれたら、HPLC-DAD・I法—IV法を用いて定量する。一方、最初から中毒起因農薬がある程度判明している場合には、HPLC-DAD・I法—IV法を行い、定性・定量を同時に行うシステムである。この手順を利用することにより、迅速で効率良く分析ができるようになった。

国は近年、多くの中毒事件の教訓から、平成10年度に各県一カ所の救命救急センターに分析機器を

農薬中毒が疑われる患者の検体

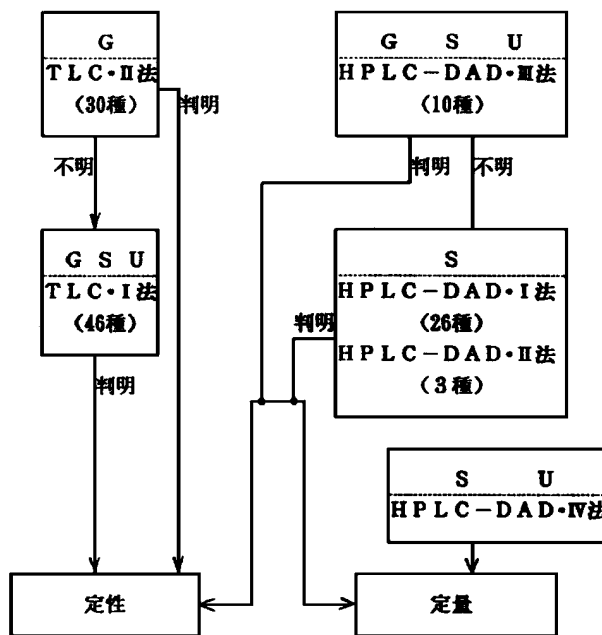
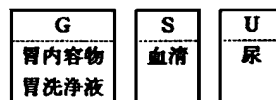


Fig. 9. A Practical System for Detection of Acute Poisoning-Inducing Pesticides in Emergency Medicine

配備した。そして、そのほとんどが本研究に用いたものと同種の HPLC-DAD である。したがって、本研究の内容が、多くの救急医療現場で広く活用されることを願っている。

謝辞 本研究の遂行にあたり、終始懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学衛生学教室・永瀬久光教授並びに岐阜薬科大学・佐藤孝彦前教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究遂行の機会を与えて頂きました大垣市民病院 中野哲前院長に厚く御礼申し上げます。

さらに、終始有益な御指導とご協力を頂きました大垣市民病院薬剤部・山崎太郎長並びに薬剤部各位に心より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Mori H., Nakamura T., Watanabe H., Iwata S., Takagi T., Hayata M., Yoshimura S., *Iyaku Journal Ltd.*, **18**, 95-101 (1982).
- 2) Mori H., Nakamura T., Watanabe H., Yashiro S., Takagi T., Sato R., Yashuda C., Hayata M., Yoshimura S., *Iyaku Journal Ltd.*, **19**, 83-89 (1983).
- 3) Mori H., Otsuki C., Yashuda C., Yamaguchi S., Iwata Y., Kobayashi J., Hayata M., *Jpn. J. Toxicol.*, **4**, 243-251 (1991).
- 4) Hayata M., Mori H., *Gekkann Yakuji*, **31**, 39-43 (1989).
- 5) Mori H., Hayata M., *Gekkann Yakuji*, **35**, 475-482 (1993).
- 6) Hayata M., Mori H., Otsuki C., *Jpn. J. Clin. Ecol.*, **2**, 14-17 (1993).
- 7) Takeda A., Mori H., Yashuda C., Yamazaki F., *Gifu Byoyaku*, **28**, 17-22 (1999).
- 8) Mori H., Sato T., Nagase H., Sakai Y., Yamaguchi S., Iwata Y., Hashimoto R., Yamazaki F., Hayata M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 101-110 (1994).
- 9) ICI Nohyaku Kyogikai, "Parakohto Ganyu Jyosohzai —Chudoku Shohjoh to Syochihoh—," Tokyo, 1992.
- 10) Mori H., Sato T., Nagase H., Andou M., Sakai Y., Yamaguchi S., Yamazaki F., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **42**, 101-109 (1996).
- 11) Tamura Z., Kin M., Hosokawa N., Takitani S., Suzuki M., Suzuki T., Inoue M., *Bunseki Kagaku*, **19**, 518-524 (1970).
- 12) Mori H., Sato T., Nagase H., Takada K., Yamazaki F., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **44**, 182-194 (1998).
- 13) Mori H., Sato T., Nagase H., Takada K., Okada K., Yamazaki F., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **44**, 413-427 (1998).
- 14) Mori H., Sato T., Nagase H., Takada K., Nagasaka M., Yamazaki F., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **44**, 245-255 (1998).
- 15) Tomita M., Okuyama T., Watanabe S., Uno B., Kawai S., *J. Chromatogr.*, **566**, 239-243 (1991).
- 16) Mori H., Nagase H., Okada K., Takada K., Nakamura M., Yamazaki F., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **45**, 282-288 (1999).
- 17) Yoshimura S., Hayata M., Yamazaki F., Mori H., "Kyusei Chudoku Jyoho Fairu," 3rd ed., Hirokawa Shoten, Tokyo, 1996, p 37.
- 18) Mori H., Nagase H., Nakamura M., Yamazaki F., *Jpn. J. Toxicol.*, **13**, 165-174, (2000).
- 19) Yamashita M., Ando Y., Matuo H., Saruki K., Onaga Y., Ogura Y., Miwa A., Satomi K., Takakoshi Y., Sekiguchi H., Yamashita M., *Jpn. J. Toxicol.*, **9**, 230 (1996).
- 20) Okumura T., Suzuki K., Aoki M., Kobayashi R., Nishina M., Fukuda M., Fuzii T., Kohama K., *Jpn. J. Toxicol.*, **12**, 95 (1999).