



SOLID PHASE EXTRACTION METHOD FOR RAPID ISOLATION AND CLEAN-UP OF SOME SYNTHETIC PYRETHROID INSECTICIDES FROM HUMAN URINE AND PLASMA

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 劉, 俊亭 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1487

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 210号	学位授与年月日	平成 7年 7月 7日
氏名	劉 俊 亭		
論文題目	SOLID PHASE EXTRACTION METHOD FOR RAPID ISOLATION AND CLEAN-UP OF SOME SYNTHETIC PYRETHROID INSECTICIDES FROM HUMAN URINE AND PLASMA (血漿と尿中多種有機合成除虫菊農薬類の固相抽出法による迅速分離とクリーンアップ)		

博士(医学) 劉 俊 亭

論文題目

SOLID PHASE EXTRACTION METHOD FOR RAPID ISOLATION AND CLEAN-UP OF SOME SYNTHETIC PYRETHROID INSECTICIDES FROM HUMAN URINE AND PLASMA

(血漿と尿中多種有機合成除虫菊農薬類の固相抽出法による迅速分離とクリーンアップ)

論文の内容の要旨

【目的】固相抽出法 (Solid-Phase Extraction) は従来の液-液抽出法より高い効率、乳化防止および簡便迅速などの特色を持ち、数年来薬毒物の新しい抽出法として注目されている。固相抽出吸着剤である結合型シリカゲル、特にオクタデシルシラン (商品名: Sep-Pak C₁₈, Waters Ltd.) は多種類の物質に対応できる利点があるので広く応用されている。有機合成除虫菊類殺虫剤 (Synthetic Pyrethroid Insecticides, SPI) は除虫菊の花の中に含まれた有毒成分-ピレトリン I (Pyrethrin I) とピレトリン II (Pyrethrin II) の化学構造を模倣して人工合成した最新型農薬である。いままで固相抽出法で生体試料から SPI を一斉に抽出した報告はほとんどない。我々は血漿と尿中の SPI の固相抽出法スクリーニングを検討する目的で Sep-Pak C₁₈ カートリッジを利用して多種 SPI の抽出条件を確立した。また、ワイドボアキャピラリーのガスクロマトグラフィー (GC) による分離も行ったので報告する。

【方法】7種類 SPI (メトトリン、フェンプロパトリン、シハロトリン、ペルメトリン、シベルメトリン、フェンバレレート及びデルタメトリン) を血漿あるいは尿 1 ml にそれぞれ 10 μg 添加したのち、種々の濃度のメタノール水溶液を 10 ml 加える。このサンプルを活性化した Sep-Pak C₁₈ カートリッジに流し、5 ml の水をカートリッジに流し洗浄する。最後に 2 ml クロロホルムを流し、SPI を溶出する。溶出液上部の水層を除去し、有機層を窒素気流下で蒸発乾固し、残渣を 0.10 ml エタノールに溶かし、GC 分析に供する。抽出前の GC ピークを基準としそれぞれのピーク高さを比較して 4 回平均値をとりその抽出回収率を計算する。GC 条件について、水素炎検出器 (FID)、無極性のフェーズドシリカワイドボアキャピラリーカラム (HP-1, 0.53 mm × 5 m) を採用した。また、検出器と注入口温度 240°C、カラム温度 190°C - 235°C、10°C / min の昇温で行った。窒素流量は 20 ml / min である。

【結果】(1) 70% メタノール水溶液を生体試料の希釈液として使用すると SPI を C₁₈ 表面にはほぼ完全に吸着させることができた。また、クロロホルム 2 ml だけで SPI を C₁₈ から完全に溶出させる事ができ、不純物も殆ど除去できた。血漿からの回収率は 81% (シベルメトリン) - 93% (メトトリン) で、尿の場合は 90% (シベルメトリン) - 102% (フェンバレレート) で、良好な結果を得た。(2) 7種類の SPI の GC 上の分離はデルタメトリンを除いていずれも良好であり、バックランドもきれいであった。また、FID の感度についてフェンプロパトリンでもっとも高く、デルタメトリンでは比較的に低かった。フェンプロパトリンを SPI の代表例としてその検量線を調べた結果、検出限度がガスクロ注入力 2 ng で、直線性の範囲は 100 ng 以上であった。

【考察】従来の固相抽出の溶出溶媒としてメタノールやアセトニトリルが一般的に用いられていた。今回クロロホルムを用いる理由として、第一に不純物が殆ど出ないこと、第二に窒素気流下にて蒸発乾固するのに 10 分間ほどで終了できる。カートリッジの再利用について尿では 20 回以上使用可能であり、血漿の場合は目づまりを起こしやすいため回数は少なくなると考えられた。二つの異なった極性の GC

キャピラリーカラムを使用してみたが、無極性のHP-1の方がすぐれた分離効果を示した。以上我々が開発設定した除虫菊農薬類の固相抽出法とGC分析法は法医中毒学のみならず、薬理学的研究にも有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

中国では殺虫剤や殺鼠剤の使用頻度が高く、これらの農薬による自殺や事故が多い。近年では、殺虫剤として有機リン剤と化学合成ピレスロイドの合剤が広く用いられている。合成ピレスロイド類は除虫菊中に含有されるピレトリンIとピレトリンIIの化学構造の誘導体として有機合成されたものであるが、中にはシハロトリンやデルタメトリンのように毒性がバラコートよりも高いものが出てきた。今回、申請者はこれら殺虫剤の生物試料からの抽出測定法を確立した。

固相抽出法は従来の液-液抽出よりも、簡易で、回収率が高く、精製度が高く、バックグラウンドが低い等の利点があるため広く用いられるようになってきた。今回申請者は7種類の合成ピレスロイドについて、ヒト血漿と尿に添加し、Sep-Pak C₁₈カートリッジによる抽出法の詳細を検討し、最良の抽出条件を設定したものである。さらにワイドボアキャピラリーガスクロマトグラフィー(GC)による検出条件も確立した。

7種類のピレスロイド(メトリン、フェンプロパトリン、シハロトリン、ペルメトリン、シベルメトリン、フェンバレレートならびにデルタメトリン)を血漿もしくは尿1mlに各10 μ gずつ添加した後、10mlの70%メタノール水溶液を加え、よく攪拌した後、活性化したSep-Pak C₁₈カートリッジに流す。5mlの蒸留水にてカートリッジを洗浄し、最後に2mlのクロロホルムを流しピレスロイド類を溶出する。上層の水層を除去し、有機層を窒素気流下で蒸発乾固し、残渣を100 μ lのエタノールに溶解し、GC分析の供する。GCは水素炎検出器によって行い、カラムは無極性のHP-1(0.53mm \times 5m)のワイドボアキャピラリーカラムを用いた。

7種類のピレスロイドはGC分析上、分離がよく、血漿や尿由来の不純ピークと重ならなかった。血漿と尿からの回収率はいずれも80%以上と良好で、検出限界はフェンプロパトリンにおいては注入量2ngで、検量線も注入量100ng程度まで直線性を示した。バックグラウンドも比較的不純ピークが少なかった。

今回の固相抽出法の新しい工夫の第一はSep-Pak C₁₈に生物試料を負荷する際、70%メタノール溶液で希釈した後に流した事であり、これによって混在し得る生体内不純物や他の薬毒物等を除去し、ピレスロイド類を比較的特異的に抽出できた点である。第二の新しい工夫として、Sep-Pak C₁₈カートリッジからピレスロイド類を溶出するのに、従来のメタノールやアセトニトリルの代わりにクロロホルムを用いた事である。これにより、窒素気流下で蒸発乾固する時間は約10分に短縮する事ができ、しかもバックグラウンドをきれいにする事ができた点である。以上の点から今回確立したピレスロイド類の固相抽出法は法医中毒学のみならず、環境化学、臨床薬理学の領域でも有用であると評価された。

申請者の発表に対し次のような質疑が行われた。

- 1) 回収率を算定する方法を具体的に説明せよ
- 2) 合成ピレスロイド類の中で毒性の強いものは何か
- 3) ピレスロイド類の中毒症状を述べよ
- 4) ピレスロイド類の中毒メカニズムは
- 5) 血漿サンプルに現れる不純ピークの本態について

- 6) ビレスロイド中毒の中国での頻度について
- 7) ビレスロイド類の代謝物の測定について
- 8) 天然ビレスロイドと合成ビレスロイドの違いについて
- 9) 検量線の作成方法について

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、研究内容も博士（医学）の学位論文にふさわしいものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	橋本久邦				
	副査	教授	鈴木修	副査	教授	藤瀬裕	
	副査	助教授	梅村和夫	副査	助教授	松島肇	