技術論文

蛍光検出-高速液体クロマトグラフィーによる DL-ホモアラニン-4-イル(メチル)ホスフィン酸の迅速定量

阿久澤尚士^{®*}, 赤岩 英夫^{**}

Rapid determination of DL-homoalanine-4-yl (methyl) phosphinic acid by HPLC with a fluorescence detector

Hisashi AKUZAWA^{*} and Hideo AKAIWA^{**}^{*}Forensic Science Laboratory of Gunma Police H.Q., 534, Motosoja, Maebashi-shi, Gunma 371^{**}Faculty of Engineering, Gunma University, 1-5-1, Tenjin, Kiryu-shi, Gunma 376

(Received 25 July 1996, Accepted 2 September 1996)

High-performance liquid chromatography (HPLC) was applied for a simple and rapid determination of DL-homoalanine-4-yl (methyl) phosphinic acid (commercial name: Glufosinate, GLF). GLF was derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) and injected into an octadecylsilyl (ODS) column (4.6 mm i.d., 150 mm L) equipped with a fluorescence detector (E_x 265 nm, E_m 315 nm). The derivatization was completed within 10 min at 40°C. The calibration curve was linear between $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ and $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ of GLF-FMOC, the detection limit being $1 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-3}$. In the case of GLF determinations in such biological samples as blood and urine, sodium borate buffer (pH 8.5) and acetone were added in order to remove proteins. By injecting the supernatant into HPLC, GLF was rapidly determined with high sensitivity.

Keywords: DL-homoalanine-4-yl(methyl)phosphinic acid; glufosinate; herbicide; HPLC; 9-fluorenylmethyl chloroformate.

1 緒 言

DL-ホモアラニン-4-イル(メチル)ホスフィン酸(登録農薬名グルホシネート, GLF)は1984年に登録された非ホルモン型の非選択性茎葉処理型除草剤であり, 果樹や非農耕地の除草剤として用いられている。GLFは低毒性であることから, 毒性の非常に強い1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジニウム(バラコート)系除草剤に代わり, 近年多用されている。しかし, 最近毒性が低いために,

中毒死事故には至らないと考えられていたGLFを含む製剤をえん(嚥)下し, 死亡する事例が発生している。小山は動物実験によるGLFのLD₅₀値をGLF単独投与と製品投与で比較すると, ラット, マウス共に製品投与のほうが低値であり, これは界面活性剤が製品の毒性に関与しているためで, この傾向はヒトにおいても同様であり, 製品中に含まれる陰イオン系界面活性剤が中毒の病態に深く関与していると報告している¹⁾。近年, GLF製剤が多用されるにつれて中毒事故は増加する傾向を示しており, 1994年の中毒死事例は12件²⁾に上り, GLFは法科学的及び救急医学的にも見過ごすことのできない農薬となってきた。

^{*} 群馬県警察本部刑事部科学捜査研究所[®]: 371 群馬県前橋市元総社町 523

^{**} 群馬大学工学部: 376 群馬県桐生市天神町 1-5-1

GLFは難揮発性であり、又血液尿などから有機溶媒に抽出されにくい、生体試料の前処理を含めた分析法の報告は少ない。これまで知られている分析法としては、陰イオン交換樹脂を用いて精製し、メチル化したものをガスクロマトグラフ法で分離、定量するもの(公定法)³⁾、オクタデシルシリル(ODS)カラムを用いて前処理し、*t*-ブチルシリル化した後ガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)で定量するもの⁴⁾⁵⁾、ジクロロメタン抽出した後の水相を濃縮・乾固し、*t*-ブチルシリル化した後GC/MSで分離、定量するもの⁶⁾などがあるが、いずれも前処理から分析、確認に至るまでの操作が煩雑で、救急医療現場で要求される短時間での定量分析に適しているとは言い難い。又、アセトニトリルで除タンパクし、イオン交換カラムを用いて分離した後、*o*-フタルアルデヒドで蛍光ラベル化して検出するポストカラム高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の報告⁷⁾があるが、報告された測定条件では、HPLCに付加装置が必要であることや分析対象が限定されるなど、迅速定量が要求される分析現場ではやや難がある。

そこで今回、GLFをあらかじめ9-フルオレニルメチルクロロホルメート(FMOC-Cl)で蛍光ラベル化し、最もはん用性の高いODSカラムを用いたHPLC法(プレカラムHPLC法)について検討した。

又、法科学におけるスクリーニングや救急医療現場における迅速定量分析に応用すること、すなわち生体試料、特に血液、尿を試料とすることを考慮し、前処理法についても併せて検討した。

2 実 験

2・1 試薬及び試料

GLFはヘキストジャパン製を用いた。FMOC-ClはSigma製、アセトニトリルは市販HPLC用、そのほか試薬は市販特級品を用いた。

2・2 装置及び測定条件

HPLC装置は日立製ポンプL-6200、日立製カラムオープンL-5020型、日立製蛍光検出器F-1050、日立製オートサンプラーL-7200、日立製データ処理装置D-6100、ジューエルサイエンス製カラムInertsil ODS-2(内径4.6 mm、長さ150 mm、粒径5 μ m)の構成である。測定はカラム温度40°C、移動相はアセトニトリル-10 mM リン酸緩衝溶液(pH 2.5) 3:7 (V/V)で7分間保持後、13分後に1:1 (V/V)、15分後に8:2 (V/V)として1分間保持するよう配液法とした。なお、13分以降は洗浄過程である。移動相の流量は1.0

cm³ min⁻¹、検出器条件は励起波長265 nm、蛍光波長315 nmである。

2・3 生体試料の前処理

血液又は尿0.1 cm³に0.1 M ホウ酸緩衝溶液(pH 8.5)を0.4 cm³、アセトンを1.0 cm³加え、ミキサーで混合後、遠心分離する。得られた上澄み液を蛍光ラベル化試料とする。

2・4 蛍光ラベル化

試料0.05 cm³に0.1 M ホウ酸緩衝溶液(pH 8.5)0.2 cm³、0.1% FMOC-Clアセトン溶液0.2 cm³を加えて密栓し、混合する。これを40°Cで10分間加温し、加熱終了後、酢酸エチル0.5 cm³を加え、振り混ぜ洗浄し、水相の2.0 mm³をHPLC分析試料とした。

3 結果及び考察

3・1 最適ラベル化 pH の検討

GLFをFMOC-Clで蛍光ラベル化する際の最適pHについて検討した。GLFを1.0 μ g cm⁻³含む水溶液0.05 cm³にpH 7.5~pH 9.5まで変化させた緩衝溶液をそれぞれ0.2 cm³加えて、これに0.1% FMOC-Clアセトン溶液0.2 cm³を加え、40°Cで10分間ラベル化反応を行い、GLF-FMOC誘導体の生成量について比較した。又、空試験溶液として蒸留水0.05 cm³を用いて同

Fig. 1 Effect of pH on the derivatization of GLF (40°C)

○: GLF 1.0 μ g cm⁻³; ●: blank

Fig. 2 Effect of reaction time on the derivatization of GLF

Concentration of GLF: $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$; ○: 40°C ; ●: 60°C ; □: 90°C

様の条件でラベル化反応を行い、比較検討した。その結果、Fig. 1 に示すとおり、GLF を含む溶液からはいずれの pH においてもほぼ一定のピーク面積値が得られ、空試験溶液からは認められなかった。よって、以後の検討には pH 8.5 の 0.1 M ホウ酸緩衝溶液を用いた。

3・2 最適ラベル化反応温度及び反応時間の検討

GLF を FMOC-Cl で蛍光ラベル化する温度について検討した。GLF を $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ 含む水溶液 0.05 cm^3 に、0.1 M ホウ酸緩衝溶液 0.2 cm^3 、0.1% FMOC-Cl アセトン溶液 0.2 cm^3 を加え、ラベル化反応温度を 40, 60, 90°C として検討した。その結果、Fig. 2 に示すとおり、60, 90°C では、加熱時間が長くなるとピークの面積値が減少する傾向であった。これは、GLF-FMOC 誘導体が、熱分解しているためと考えられ、 90°C では 60°C に比べ、この傾向が顕著に現れた。以上の検討からラベル化最適温度は、最も安定に反応が進む 40°C と考えられる。

又、 40°C における反応時間は、7.5 分以後一定の面積値が得られたため、以後の検討では反応時間は 10 分間とした。

3・3 ラベル化試薬濃度の検討

ラベル化反応を行うためのラベル化試薬濃度、すなわち FMOC-Cl アセトン溶液の濃度について検討した。

GLF を $5.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ 含有する血液に、2 倍量のアセトンを加えてミキサーで混合後、これを遠心分離した。

Fig. 3 Effect of FMOC-Cl concentration on the derivatization of GLF

Concentration of GLF: $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$; Derivatization temperature: 40°C

得られた上澄み液を試料とし、濃度を 0.05~0.5% まで変化させた FMOC-Cl アセトン溶液 0.2 cm^3 に 0.1 M ホウ酸緩衝溶液 0.2 cm^3 を加え、反応温度 40°C 、反応時間 10 分間でラベル化を行い、得られるピーク面積を比較した。その結果、Fig. 3 に示すとおり全領域について一定の面積値が得られた。このことから 0.05~0.5% FMOC-Cl アセトン溶液で、GLF のラベル化反応は定量的に進んでいることが明らかとなった。

以後の検討では、高濃度の GLF 試料やアミノ酸基を有する物質を多量に含有する試料に対応できるよう、FMOC-Cl アセトン溶液の濃度は 0.1% とした。

3・4 未反応試薬の洗浄

GLF $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ の水溶液を用い、GLF-FMOC 誘導体を作製し、未反応試薬を洗浄・除去する目的で種々の溶媒について検討した。GLF-FMOC 誘導体を作製し、酢酸エチル、ペンタン、ヘキサン、ジエチルエーテルの各溶媒で未反応試薬を振り混ぜ抽出した後、水相を HPLC で分析し、洗浄効果とクロマトグラムを比較検討した。なお、抽出溶媒は被洗浄溶液とほぼ同量の 0.5 cm^3 とし、振り混ぜ時間は 30 秒とした。その結果、ペンタンはベースラインが乱れて定量性に問題を生じ、ヘキサンは沈殿物が多量に生じ、操作性に難があった。又、ジエチルエーテルでは洗浄後のクロマトグラムは安

Table 1 Conditions of protein removal

Sample to removal reagent ratio (V/V)	Recovery [†] , %
Blood(1) + Acetone(2)	73
Blood(1) + Dist. water(9) + Acetone(20)	120
Blood(1) + CH ₃ CN(2)	30
Blood(1) + Dist. water(9) + CH ₃ CN(20)	ND
Blood(1) + Sodium borate buffer (pH 8.5)(4) + Acetone(10)	101
Urine(1) + Sodium borate buffer (pH 8.5)(4) + Acetone(10)	110

[†]: average of 3 determinations. (): number of volume ratio. ND: no peak detected.

定していたが、ピークが多出した。酢酸エチルは洗浄効果が良好で、クロマトグラムのベースラインも安定していたことから、未反応試薬の洗浄溶媒として最も適しているものと認められた。よって、未反応試薬は酢酸エチルで 30 秒間振り混ぜ抽出・除去することとした。

3・5 生体試料の前処理についての検討

30.0 $\mu\text{g cm}^{-3}$ の濃度になるよう GLF を添加した血液(全血) 0.1 cm^3 に、除タンパク用試薬を加え、ミキサーで混合後、遠心分離する。得られた上澄み液を蛍光ラベル化試料として、前述のとおりホウ酸緩衝溶液及び FMOC-Cl アセトン溶液を加え、40°C で 10 分間加温して GLF-FMOC 誘導体を作製し、HPLC で分析後 GLF の回収率について検討した。除タンパク用試薬として 2% スルホサリチル酸、エチルアルコール、アセトン、アセトニトリル、水-アセトン、水-アセトニトリル、0.1 M ホウ酸緩衝溶液 (pH 8.5)-アセトンについて検討した。その結果、2% スルホサリチル酸、エチルアルコールは誘導体生成量が著しく少なく、そのほかの試薬は Table 1 のとおりで、ホウ酸緩衝溶液であらかじめ希釈した後、アセトンで除タンパクした場合、良好な回収率が得られた。従って、血液(全血)の前処理法(除タンパク法)としては、血液 0.1 cm^3 に 0.1 M ホウ酸緩衝溶液 0.4 cm^3 、アセトン 1.0 cm^3 を加えることとした。

尿についても同様に、0.1 M ホウ酸緩衝溶液-アセトンを用いて除タンパクを行い、回収率を検討したところ、Table 1 のとおり、GLF がほぼ定量的に回収されていることが確認され、同様の前処理法が適用できることが判明した。

Table 2 Retention time of GLF

pH	2.5	3.0	7.5
R.T. (min)	4.4	4.1	1.1

HPLC conditions: column, ODS-2 $\phi 4.6 \times 150$ mm; carrier, CH₃CN/disodium hydrogenphosphate buffer 35/65 1.0 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$; column temperature, 40°C

3・6 HPLC 移動相の検討

GLF-FMOC 誘導体を定性・定量するための HPLC 条件を検討した。溶離液系ははん用されている中で、分離能が優れていると思われるアセトニトリル-リン酸緩衝溶液系とした。溶離液をアセトニトリル-10 mM リン酸緩衝溶液 35: 65 (v/v) として、緩衝溶液の pH を 2.5, 3.0, 7.5 と変化させたところ、Table 2 のとおり、GLF-FMOC 誘導体は pH が低くなるに従って保持時間が長くなる傾向であった。そこで、カラムの適用 pH を考慮し、移動相に使用するリン酸緩衝溶液の pH を 2.5 とした。又、移動相のこの配溶離条件をアセトニトリル-10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 2.5) 3: 7 (V/V) で 7 分間保持後、13 分後に 1: 1 (V/V)、15 分後に 8: 2 (V/V) として 1 分間保持するように設定し、健康成人血、尿及び Sigma 製標準アミノ酸溶液を前述のとおり、ホウ酸緩衝溶液及び FMOC-Cl アセトン溶液を加え、40°C で 10 分間加温して蛍光ラベル化して分析したところ、Fig. 4 に示すクロマトグラムが得られ、GLF-FMOC 誘導体のピークに重なるピークは認められず、GLF の定性・定量分析にはなんら影響のないことが確認された。なお、13 分以降はカラムの洗浄工程である。以上の検討から、血液、尿中の GLF の定量分析は約 25 分で終了し、前処理及びラベル化反応を含めた 1 検体当たりの総分析所要時間は約 40 分である。

3・7 検量線

GLF を 0.2~20.0 $\mu\text{g cm}^{-3}$ の濃度に調製した水溶液を用い、前述のとおりホウ酸緩衝溶液及び FMOC-Cl アセトン溶液を加え、蛍光ラベル化して GLF の検量線を作成し、検出限界について検討した。その結果、Fig. 5 に示すとおり良好な直線が得られ、その相関係数は 0.99 であった。又、 $S/N=10$ を検出限界とすると、本法における検出限界は 1 ng cm^{-3} であった。現在まで報告されている GLF 中毒者の中毒初期の血中及び尿中濃度は、順に 0.1~176 $\mu\text{g cm}^{-3}$ 、2.3~24 mg cm^{-3} であった^{8)~12)}。中毒者の薬剤嚥下量、嚥下から発見・初期治療までの経過時間、中毒者自身の個体差はあるもの

Fig. 4 Chromatograms of the FMO derivatives
1: GLF $1.0 \mu\text{g cm}^{-3}$; 2: blood blank; 3: urine blank; 4: amino acid standard (Sigma A9781)

Fig. 5 Calibration curve for GLF (40°C)

の, 中毒初期における血中, 尿中の GLF 濃度は, 本法の検出限界の 100 倍以上高濃度である。このことから, 本法を用いれば, 被検査者からの採血, 採尿は 0.1 ml 程度で十分定量でき, これは被検査者の負担が少ないという点で, 臨床分析に十分応用可能である。なお, GLF-FMOC 誘導体は, 19 時間経過してもクロマトグラムのピーク面積値は減少せず, 安定である。

Fig. 6 Chromatograms of the FMO derivatized samples obtained from a person suspected of GLF poisoning

1: blood; 2: urine; 3: GLF $5.0 \mu\text{g cm}^{-3}$

3・8 実試料への応用

GLF 製剤 (GLF アンモニウム塩 18.5% 含有) を多量嚥下し, 死亡したとされる 87 歳女性の血液及び尿について, 本法で分析した結果を Fig. 6 に示す。尿のクロマトグラムは, GLF が高濃度であったため, 100 倍希釈液のクロマトグラムである。いずれのクロマトグラムとも左右対称の良好なピークが得られた。なお, それぞれの定量値は血液 $22.2 \mu\text{g cm}^{-3}$, 尿 1.03 mg cm^{-3} であった。

GLF をあらかじめ蛍光ラベル化し, 蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ装置を用いた迅速定量法を確立し, 併せて生体試料への応用について検討した。

GLF は FMOC-Cl を用いてあらかじめ蛍光ラベル化する方法により, 迅速に定量することが可能となり, 定量性にも優れていた。本法の検出限界は GLF 1 ng cm^{-3} であり, 角田の報告による GC 法の検出感度 (300 ng) 及び GC/MS の検出感度 (20 ng)⁶⁾ や Okuda らによる HPLC 分析の検出感度 (20 ng cm^{-3})⁷⁾ に対し, 高感度である。又, 生体試料への応用として, 血液及び尿について検討したところ, 溶液に 0.1 M ホウ酸緩衝溶液及びアセトンを加えて除タンパクの後, 本法で分析可能であった。

本法は, 生体試料の前処理及びラベル化反応が容易で

あり、又ははん用 ODS カラムの使用、分析供試料が極少量で良いなどの利点を持つ、簡便な分析法である。又、HPLC に加え、蛍光ラベル化反応及び蛍光検出の特異性から同定能力にも優れ、定量範囲も広い。よって、多種多様な分析試料について迅速、確実な分析を要求される法科学及び救急医学の分野で、従来法に比べて十分有用であると考えられる。

本研究に当たり、GLF 標品を提供してくださいましたヘキストジャパン株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) 小山完二: 中毒研究, **8**, 391 (1995).
- 2) 科学警察研究所: “薬物による中毒事故等の発生状況”, 第 38 報, (1995).
- 3) 後藤真康, 加藤誠哉: “増補残留農薬分析法”, p. 236 (1987), (ソフトサイエンス社).
- 4) 角田紀子: 法中毒, **8**, 100 (1990).
- 5) 角田紀子: 日本法中毒学会第 13 年会講演要旨集, p. 104 (1994).
- 6) 角田紀子: 日本薬学会第 113 年会公衆衛生協議会資料, p. 55 (1993).
- 7) T. Okuda, K. Naotsuka, I. Sameshima, M. Nishida, T. Kito, Y. Kato: *Jpn. J. TDM*, **9**, 39 (1993).
- 8) 小山完二, 松尾英徳, 猿木和久, 安藤義孝, 柴崎徹, 関口博行, 山下 衛: 集中治療, **5**, 1311 (1993).
- 9) 久保覚志, 小山完二, 安藤義孝, 関口博行, 星野天志, 松村正志, 山下 衛: 中毒研究, **6**, 448 (1993).
- 10) 橋本英利, 山本良二, 住野公昭, 小泉直子: 中毒研究, **7**, 47 (1994).
- 11) 科学警察研究所: “薬物による中毒事故等の発生状況”, 第 37 報, (1994).
- 12) 広瀬保夫, 三井田努, 本多 拓: 日本救急医学会雑誌, **5**, 625 (1994).
- 13) 田口雅一, 渡邊誠治, 猪股伸一: 中毒研究, **5**, 193 (1992).

要 旨

毒性が低くはん用性の高い除草剤である, DL-ホモアラニン-4-イル(メチル)ホスフィン酸(グルホシネート)の高速液体クロマトグラフ装置を用いた迅速分析法について検討した。高感度定量を行うため, アミノ酸分析に用いられている 9-フルオレニルメチルクロロホルメート(FMOC-Cl)を用いてグルホシネートを蛍光ラベル化した。蛍光ラベル化は, 試料溶液に pH 8.5 のホウ酸緩衝溶液と 0.1% FMOC-Cl アセトン溶液を加え, 40°C で 10 分間加温する。反応終了後, 未反応試薬を除去し, 蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ装置で分析した。カラムとしては最もはん用性の高いオクタデシルシリルカラムを, 移動相にはアセトニトリル-リン酸緩衝溶液(pH 2.5)系を用いた。生成した誘導体は 19 時間経過しても安定であった。検量線は $0.2 \sim 20.0 \mu\text{g cm}^{-3}$ の範囲で良好な直線を示し, その相関係数は 0.99 で, 検出限界は 1 ng cm^{-3} であった。生体試料に応用するため, 前処理法について検討したところ, あらかじめ試料を pH 8.5 のホウ酸緩衝溶液で希釈した後, アセトンで除タンパクする方法が最良で, グルホシネートの回収は定量的であった。グルホシネートを含む製剤を嚥下したヒト血液, 尿について分析したところ, 共存成分による妨害も見られず, 1 検体当たり 40 分足らずで容易に定量可能であった。