—技術報告—

酸化法-液体クロマトグラフィー質量分析による
生体試料中のパラコートおよびジクワットの分析

鈴木雄亮, 金子 毅

千葉県警察本部科学捜査研究所
〒260-0024 千葉県千葉市中央区中央港 1-71-1**Determination of paraquat and diquat in human body fluid
by oxidation method-liquid chromatography/mass spectrometry**

Yusuke Suzuki and Tsuyoshi Kaneko

*Forensic Science Laboratory, Chiba Police H.Q.
1-71-1, Chuoko, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-0024, Japan**(Received 22 December 2014; accepted 16 July 2015;
Published online 26 August 2015 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.696)*

In this study, we developed a method for the detection of the herbicides paraquat (PQ) and diquat (DQ) in human urine and whole blood with an oxidative reaction followed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

Prior to the oxidative reaction, urine samples were cleaned up by dispersive solid phase extraction with Oasis® WCX, and blood samples were deproteinized with sulfosalicylic acid. These pretreated samples were oxidized with 1 mg/mL potassium ferricyanide and 15 M sodium hydroxide. The oxidative products of PQ and DQ were extracted with high recovery rates by solid phase extraction with Oasis® MAX. These extracted oxidative products were successfully separated and detected by LC/MS using a semi micro C18 column in the gradient solvent system of 10 mM ammonium formate (pH 3) and methanol.

Quantitative analyses for blood samples were carried out using PQ-d₆ and ethyl PQ as internal standards. The calibration curves for PQ and DQ showed good linearity in the range of 10–5000 ng/mL. Precision (R.S.D.) was less than 5.8%, and accuracy was ranged from 99% to 112%.

Key words: Paraquat, Diquat, Oxidative reaction, LC/MS

緒 言

パラコート (PQ) およびジクワット (DQ) は、
いずれもアルキルジピリジリウム塩系の除草剤であ

り、これまでに PQ 製剤による中毒事故が多発し、
現在、日本では DQ との低濃度混合製剤のみが販
売されるようになっている。しかしながら、この混
合製剤の入手の容易さもあり、自殺目的での摂取や

飲食物に混入して喫食させることによる傷害事件などの事案は現在も散見される。混入による傷害などの事案が発生したような場合、犯罪鑑識における重要なことのひとつとして、この混合製剤の摂取による中毒を証明するために中毒者の尿や血液などの生体試料から PQ, DQ を検出することがある。PQ, DQ の分析は、主にガスクロマトグラフィー質量分析¹⁻⁴⁾、キャピラリー電気泳動⁵⁻⁹⁾、液体クロマトグラフィー質量分析¹⁰⁻¹⁷⁾ (LC/MS) により行われるが、この中で LC/MS は検出感度の点で特に優れている。しかし、PQ, DQ はいずれもジカチオンであることから、LC/MS で用いられることの多い一般的な条件 (C18 カラムとギ酸アンモニウムなどの揮発性塩を含む移動相の組み合わせ) ではカラムに保持されず、分離分析が困難となる。そのため、移動相にイオンペア試薬を添加する特殊な条件¹⁰⁻¹³⁾ または親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) モード用カラムのような特殊なカラムを必要とする¹⁴⁻¹⁷⁾ ことになる。

これまでに、製剤または生体試料中の PQ, DQ を酸化反応により対応するジピリドン (以下、それぞれ PQ 酸化体および DQ 酸化体とする) に変換し、内径 6.0 mm の C18 カラムとイオンペア試薬を添加した移動相を用いた液体クロマトグラフィーにより分離し、蛍光により検出する方法^{18,19)} が報告されている。この他にも、農作物中の PQ, DQ を各酸化体とした後、内径 2 mm 程度の C18 カラムとイオンペア試薬を用いない一般的な移動相を用いて各酸化体を分離し質量分析により検出する方法²⁰⁾ もあり、分子量や構造情報が得られるマススペクトルが取得できるという点で優れている。これまで、生体試料中の PQ, DQ の検出に酸化反応-LC/MS を適用した報告はないことから、今回、検討することとした。なお、血液については、PQ, DQ の濃度が中毒の程度の判断指標となり得ることから、定量分析も合わせて検討した。

材料および方法

1. 試薬類

パラコート (PQ) ジクロリド、ジクワット (DQ) ジブロミド水和物、重水素化パラコート

Fig. 1 Chemical structures of (a) PQ-oxide, (b) DQ-oxide, (c) PQ-d₆-oxide and (d) EPQ-oxide.

(PQ-d₆) ジイオジドは Dr. Ehrenstorfer GmbH 製、エチルパラコート (EPQ) ジイオジドは Sigma-Aldrich 製、ギ酸およびメタノールは和光純薬工業製の LC/MS グレードのものを、その他の試薬は市販の特級品をそのまま用いた。ヒト尿は健常人から採尿したものを、ヒト血液は BIOPREDIC INTERNATIONAL から購入したものをそれぞれ用いた。PQ, DQ, PQ-d₆ および EPQ の各酸化体は、Calderbank らの方法²¹⁾ を参考に合成したものを、各酸化体の構造を Fig. 1 に示す。

なお、本研究は、ヒト生体試料を取り扱うことから、日本法科学技術学会ヒト対象医学的研究など倫理審査委員会の承認を得て実施した。

2. 試料調製

PQ ジクロリドおよび DQ ジブロミド水和物を 105°C で 2 時間乾燥したものを蒸留水に溶解し、PQ, DQ 標準溶液を調製した後、ヒト尿およびヒト血液に適宜添加することで、必要な濃度の尿試料および血液試料を調製した。

3. 試料の前処理

3.1. 定性分析用前処理

尿試料については分散固相抽出を、血液試料につ

いては除タンパク処理をそれぞれ行った後、得られた上清に対し酸化反応および固相抽出を行った。

3.1.1. 分散固相抽出

尿試料 (PQ, DQ の濃度各 $0.5 \mu\text{g/mL}$) を遠心分離して得られた上清 0.5 mL , 蒸留水 1.5 mL および Oasis® WCX 固相約 20 mg を 2 mL 容量のプラスチック製マイクロチューブに入れ, 1 分間攪拌した後, 遠心分離を行い上清を除去した。底部に残った Oasis® WCX 固相を, 蒸留水 1 mL で 1 回, メタノール 1 mL で 2 回洗浄し, 最後に 0.1 M 塩酸 1 mL を加えて 1 分間攪拌し, 遠心分離して得られた上清を後述の酸化反応に用いた。

3.1.2. 除タンパク処理

血液試料 (PQ, DQ の濃度各 $0.5 \mu\text{g/mL}$) 0.75 mL を 2 mL 容量のプラスチック製マイクロチューブに入れ, ここに 100 mg/mL スルホサリチル酸水溶液 0.75 mL を加えて攪拌した後, 遠心分離して得られた上清²²⁾を後述の酸化反応に用いた。

3.1.3. 酸化反応

フェリシアン化カリウム水溶液 (0.1 mg/mL , 0.25 mg/mL , 1 mg/mL , 2.5 mg/mL , 10 mg/mL , 100 mg/mL) 0.9 mL と水酸化ナトリウム水溶液 (7 M , 9 M , 13 M , 11 M , 15 M , 20 M) 0.9 mL を 10 mL 容量のプラスチック試験管に入れてあらかじめよく混合しておき, ポルテックスミキサーで攪拌しながら, ここに前述の分散固相抽出または除タンパク処理により得られた上清 0.9 mL を加えて攪拌し, 1 分間静置して反応させた。

3.1.4. 固相抽出

メタノール 3 mL と蒸留水 3 mL でコンディショニングした Oasis® HLB (3 cc , 60 mg , Waters) に反応液全量を通し, 蒸留水 6 mL で洗浄した後, さらに体積分率 5% メタノール水溶液, 5% アセトニトリル水溶液またはヘキサン 3 mL で洗浄し, メタノール, アセトニトリルまたは酢酸エチル 3 mL で溶出した。溶出液をヒートブロック (60°C) 上で加温しながら窒素気流下で乾固し, 残渣に LC/MS 初期移動相 0.1 mL を加え, これを Ultrafree®-MC (孔径 $0.22 \mu\text{m}$, Millipore) でフィルターろ過して得られたろ液を LC/MS 用試料とした。Oasis® MAX (3 cc , 60 mg , Waters) を用いる場合は, Oasis®

HLB で最適化した抽出条件をそのまま適用した。

3.2. 血液試料の定量分析用前処理

PQ-d₆ および EPQ の混合水溶液 (各 $10 \mu\text{g/mL}$) を作製し, これを内部標準溶液とした。血液試料 1 mL に対し, 内部標準溶液を 0.1 mL 添加して攪拌したものを定量分析用試料とした。これについて, 3.1.2. のとおりに除タンパク処理を行い, 得られた上清を酸化反応に用いた。なお, 酸化反応に用いるフェリシアン化カリウム水溶液の濃度は 1 mg/mL とし, 水酸化ナトリウム水溶液の濃度は 15 M とした。各酸化体を抽出するための固相抽出は, Oasis® MAX (3 cc , 60 mg , Waters) を用いて 3.1.4. のとおりに行い, 洗浄には蒸留水およびヘキサンを, 溶出にはメタノールを用いた。抽出物に加える LC/MS 初期移動相の量は, 0.5 mL とした。

4. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

装置条件は, 清涼飲料水中の PQ, DQ の測定²³⁾を行ったものを参考とし, 次の条件で行った。装置: alliance LC/MS ZMD システム (Waters), ガードカラム: L-column2 ODS (長さ 5 mm , 内径 2.0 mm , 粒子径 $5 \mu\text{m}$, 化学物質評価機構), 分析カラム: L-column2 ODS (長さ 150 mm , 内径 2.1 mm , 粒子径 $5 \mu\text{m}$, 化学物質評価機構), カラムオープン温度: 35°C , 移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム (ギ酸で pH 3 に調整), 10 mM 酢酸アンモニウム (酢酸で pH 5 に調整) または 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.5), 移動相 B: メタノールまたはアセトニトリル, グラジエント条件: 移動相 B を 15% で 5 分間保持後, 毎分 8% で 95% までリニアグラジエント, 流速: 0.2 mL/min , キャピラリー電圧: 3.5 kV , コーン電圧: $40, 50$ および 60 V , ソースブロック温度: 120°C , 脱溶媒温度: 400°C , 脱溶媒ガス: 500 L/h (窒素), イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ポジティブ), 測定モード: スキャンモード (m/z $80\text{--}300$) または選択イオンレコーディング (SIR) モード (PQ 酸化体: m/z 217, DQ 酸化体: m/z 215, PQ-d₆ 酸化体: m/z 223, EPQ 酸化体: m/z 245)。試料の注入量は, $10 \mu\text{L}$ とした。

結果および考察

1. 液体クロマトグラフィー質量分析

1.1. 移動相の検討

移動相に用いる有機溶媒について、水系移動相を 10 mM ギ酸アンモニウム（ギ酸で pH 3 に調整）とし、メタノールとアセトニトリルを検討したところ、感度の面ではほとんど差は認められなかったが、メタノールでは PQ 酸化体と DQ 酸化体のピークは良好に分離したものの、アセトニトリルでは両ピークが重なった。

移動相に用いる揮発性塩の溶液について、有機系移動相をメタノールとし、10 mM ギ酸アンモニウム（ギ酸で pH 3 に調整）、10 mM 酢酸アンモニウム（酢酸で pH 5 に調整）、10 mM 酢酸アンモニウム水溶液（pH 6.5）を検討したところ、PQ 酸化体と DQ 酸化体の保持時間はほぼ同じであったが、溶液の pH が低いほど、ピーク面積値が増加する傾向が認められた（Fig. 2）。

以上のことから、移動相には 10 mM ギ酸アンモニウム（ギ酸で pH 3 に調整）とメタノールを用いることとした。

1.2. コーン電圧の検討

コーン電圧を 40 V・50 V・60 V として、PQ、DQ の各酸化体のマススペクトルを測定したところ、DQ 酸化体は 40 V でプロトン付加イオン $[M+H]^+$ の他にフラグメントイオンが観測されたが、PQ 酸化体はプロトン付加イオン $[M+H]^+$ のみが観測され、フラグメントイオンを生成させるためには、コーン電圧を 60 V とする必要がある。各酸化体のマススペクトルを Fig. 3 に示す。

2. 分散固相抽出の効果の検討

尿試料を遠心分離して得られた上清について、分散固相抽出を行わずに酸化反応を行い、固相抽出により得られた抽出物について LC/MS を行ったところ、PQ 酸化体は良好に検出されたが、DQ 酸化体は尿由来と考えられる妨害ピークが重なり、同定が困難であった。このため、酸化反応の前に妨害成分を除去する操作が必要であると考えられた。生体試料中の PQ、DQ の抽出については、Sep-Pak® C₁₈ を用いる方法^{24,25)}が非常に有効であることが知られ

Fig. 2 Total ion chromatograms by LC/MS with three types of mobile phase at different pH (3, 5 and 6.5) obtained from standard solution of PQ-oxide and DQ-oxide.

Fig. 3 Mass spectra of PQ-oxide (upper) and DQ-oxide (lower).

ている。本研究では、精製効果は Sep-Pak® C₁₈ を用いる方法よりは劣るものの、短時間で簡便に PQ、DQ を抽出する方法として分散固相抽出を検討した。弱カチオン交換固相を用いたアプリケーション

ン²⁶⁾を参考に、逆相-弱カチオン交換固相である Oasis® WCX を用いた抽出を検討したところ、DQ 酸化体のピークに重なる妨害成分は除去され、各酸化体を良好に検出することができた。PQ, DQ の回収率 (PQ, DQ の濃度各 $0.5 \mu\text{g/mL}$, 回収率 (%) $\pm$ S.D.) は PQ が $86\% \pm 9.8$, DQ が $85\% \pm 11.1$ で、各酸化体の生成率が上昇する効果 (PQ 酸化体: $70\% \rightarrow 80\%$, DQ 酸化体: $15\% \rightarrow 50\%$) も認められた。

3. 酸化反応条件の最適化

3.1. 水酸化ナトリウム濃度の検討

ブランク尿の分散固相抽出液およびブランク血液の除タンパク液に、PQ, DQ の濃度が各 $1 \mu\text{g/mL}$ (PQ: $5.3 \mu\text{M}$, DQ: $5.4 \mu\text{M}$) となるように標準溶液を添加したものについて、フェリシアン化カリウム濃度を 1 mg/mL に固定し、水酸化ナトリウム濃度を 7 M から 20 M の間で酸化反応を行い、水酸化ナトリウム濃度の最適条件の検討を行った。各酸化体の生成率は、ブランク尿の分散固相抽出液およびブランク血液の除タンパク液について同条件で酸化反応および固相抽出を行い、得られた抽出物に各酸化体の LC/MS 初期移動相溶液 (PQ 酸化体: $5.3 \mu\text{M}$, DQ 酸化体 $5.4 \mu\text{M}$) を加えたものを SIR モードで測定して得られた結果をもとに算出した。

PQ 酸化体の生成率は、尿試料については検討した水酸化ナトリウムの濃度範囲内で、血液試料については水酸化ナトリウム濃度 9 M 以上でいずれも約 80% で一定となった。DQ 酸化体の生成率は、尿試料、血液試料ともに、水酸化ナトリウム濃度が高くなるにつれ上昇する傾向が認められた。水酸化ナトリウム濃度と各酸化体の生成率の関係を Fig. 4 に示す。

この結果から、酸化反応に用いる水酸化ナトリウム濃度は 20 M 以上とすることが適当と考えられる。しかし、水酸化ナトリウム濃度が 15 M と 20 M のときの DQ 酸化体の生成率を比較すると、尿試料では 50% と 54% 血液試料では 40% と 42% であり、生成率の上昇幅はそれほど大きくない。また、高濃度の水酸化ナトリウム水溶液は、調製が煩雑であることから、水酸化ナトリウム濃度は 15 M とすることとした。

Fig. 4 Effect of NaOH concentration on oxidation of PQ (■) and DQ (●) in a spiked urine sample (upper) and a spiked blood sample (lower).

3.2. フェリシアン化カリウム濃度の検討

ブランク尿の分散固相抽出液およびブランク血液の除タンパク液に PQ, DQ の濃度が各 $1 \mu\text{g/mL}$ となるように標準溶液を添加したものについて、水酸化ナトリウム濃度を 15 M に固定し、フェリシアン化カリウム濃度を 0.1 mg/mL から 100 mg/mL の間で酸化反応を行い、フェリシアン化カリウム濃度の最適条件の検討を行った。各酸化体の生成率は、3.1.と同様の方法で算出した。

PQ 酸化体の生成率は、尿試料についてはフェリシアン化カリウム濃度が 2.5 mg/mL のとき約 90% 、血液試料については 1 mg/mL のとき約 80% と最大になった。DQ 酸化体の生成率は、尿試料、血液試料ともに 1 mg/mL のときにそれぞれ約 50% および約 40% と最大になった。尿試料、血液試料ともに、各酸化体の生成率が最大となった後は、フェリシアン化カリウム濃度が高くなるにつれ、各酸化体

Fig. 5 Effect of potassium ferricyanide concentration on oxidation of PQ (■) and DQ (●) in a spiked urine sample (upper) and a spiked blood sample (lower).

の生成率が減少する傾向が認められた。フェリシアン化カリウム濃度と各酸化体の生成率の関係を Fig. 5 に示す。

この結果から、フェリシアン化カリウム濃度は、DQ 酸化体の生成率が最大となる 1 mg/mL とすることとした。

4. 酸化反応後の固相抽出の検討

ブランク尿およびブランク血液の酸化反応液に、PQ, DQ の各酸化体を各 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、これについて逆相タイプの Oasis® HLB (3 cc, 60 mg, Waters) を用い、添付文書に準じたコンディショニング (メタノールおよび蒸留水)、洗浄 (5% メタノール水溶液)、溶出 (メタノール) 条件による抽出を行ったところ、5% メタノール水溶液による洗浄の過程で各酸化体の一部が溶出していることが判明した。洗浄液として、5% メタノール水溶液の他に、5% アセトニトリル水溶液およびヘキサンを検討したところ、5% アセトニトリル水溶液

では 5% メタノール水溶液と同様に各酸化体の溶出が認められたが、ヘキサンでは各酸化体の溶出は認められず、各酸化体は、極性の高い有機溶剤により溶出されやすいものと考えられた。この結果から、洗浄液はヘキサンを用いることとした。溶出液として、メタノール、アセトニトリルおよび酢酸エチルを検討したところ、酢酸エチルでは各酸化体を溶出しきれなかったが、メタノールおよびアセトニトリルはいずれも完全に溶出することができた。この結果から、溶出液としては、メタノールまたはアセトニトリルが適当であると考えられたが、より沸点の低いメタノールの方が留去にかかる時間が少ないことから、溶出にはメタノールを用いることとした。また、逆相-強アニオン交換タイプの Oasis® MAX (3 cc, 60 mg, Waters) を用いたところ、Oasis® HLB とほぼ同様の回収率であったが、よりクリーンアップ効果の高い Oasis® MAX の方が適当であると考えられた。Oasis® MAX による各酸化体の回収率 (回収率 (%) $\pm$ S.D.) は、尿試料 ($n=5$) では PQ 酸化体が 97.9% $\pm$ 1.0, DQ 酸化体が 92.8% $\pm$ 2.3, 血液試料 ($n=5$) では PQ 酸化体が 96.0% $\pm$ 3.8, DQ 酸化体が 91.9% $\pm$ 2.7 であり、前処理 (尿試料: 分散固相抽出, 血液試料: 除タンパク), 酸化反応および固相抽出を合わせた最終的な PQ および DQ の回収率は、尿試料でそれぞれ約 80% および約 45%, 血液試料でそれぞれ約 75% および約 35% であった。

5. 定性分析

尿試料および血液試料 (PQ, DQ の濃度各 0.5 $\mu\text{g/mL}$) について、検討した条件で分析を行ったところ、いずれも PQ, DQ の各酸化体を良好に検出することができた。Fig. 6 に、尿試料および血液試料 (PQ, DQ の濃度各 0.5 $\mu\text{g/mL}$) から得られたトータルイオンクロマトグラムを示す。本法での検出限界 ($S/N > 3$) は、尿試料, 血液試料ともに PQ がスキャンモードで 10 ng/mL, SIR モードで 0.2 ng/mL, DQ がスキャンモードで 20 ng/mL, SIR モードで 0.5 ng/mL であった。

6. 血液試料の定量分析

血液試料については、定性分析と同様の方法で前処理を行った。Fig. 7 に、血液試料 (PQ, DQ の濃

度各 $0.5 \mu\text{g/mL}$)から得られた選択イオンクロマトグラムを示す。検量線は、内部標準物質としてPQ-d₆またはEPQを用いたいずれの場合も、PQ, DQともに 10 ng/mL から 5000 ng/mL の範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.995$) が得られ、定量精度は5.8%

以内、定量確度は99%から112%であった (Table 1)。

結 論

生体試料である尿および血液中のパラコート (PQ) とジクワット (DQ) の測定に、酸化法-液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) を検討したところ、定性および定量分析 (血液のみ) に有用であることがわかった。

尿試料に対しては逆相-弱カチオン交換タイプの固相を用いた分散固相抽出を、血液試料に対してはスルホサリチル酸による除タンパク処理をそれぞれ行った後、フェリシアン化カリウムと水酸化ナトリウムによる酸化反応により PQ, DQ を各酸化体に変換した。生成した各酸化体を、逆相-強アニオン交換タイプの固相抽出カートリッジで抽出した後、

Fig. 6 Total ion chromatograms by LC/MS obtained from a urine sample (upper) and a blood sample (lower) spiked with PQ and DQ at concentration of $0.5 \mu\text{g/mL}$ each.

Fig. 7 Selected ion chromatograms by LC/MS (SIR mode) obtained from a urine sample spiked with PQ and DQ at concentration of $0.5 \mu\text{g/mL}$ each.

Table 1 Precision and accuracy (blood sample, $n = 5$).

Compound	I.S.	Amount added	Mean	S.D.	R.S.D. (%)	Accuracy (%)
PQ	PQ-d ₆	100 ng/mL	101	1.56	1.5	101
		$1 \mu\text{g/mL}$	1.00	0.02	2.0	100
	EPQ	100 ng/mL	102	1.56	1.5	102
		$1 \mu\text{g/mL}$	1.02	0.03	3.5	102
DQ	PQ-d ₆	100 ng/mL	109	6.43	5.8	109
		$1 \mu\text{g/mL}$	0.99	0.02	3.1	99
	EPQ	100 ng/mL	112	2.89	2.5	112
		$1 \mu\text{g/mL}$	1.00	0.03	2.9	100

LC/MSを行ったところ、各酸化体を良好に分離し、検出することができた。また、重水素化パラコートまたはエチルパラコートを内部標準物質として用いた内部標準検量線法により、血液試料から得られた検量線は、いずれも10–5000 ng/mLの範囲で良好な直線性を示し、精度・真度もおおむね良好であった。

参考文献

- 1) 大津留修, 角田紀子, 皆川 節, 農薬試験法, 日本薬学会編, 薬毒物化学試験法と注解 2006. p. 266, 東京化学同人, 東京, 2006.
- 2) de Almeida R. M. and Yonamie M., Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples. *J. Chromatogr. B*, **853**, 260–264, 2007.
- 3) Posecion N. C., Ostrea E. M. and Bielawski D. M., Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Chromatogr. B*, **862**, 93–99, 2008.
- 4) Saito T., Fukushima T., Yui Y., Miyazaki S., Nakamoto A., Namera A. and Inokuchi S., Monolithic spin column extraction and GC-MS for the simultaneous assay of diquat, paraquat, and fenitrothion in human serum and urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 25–31, 2011.
- 5) Tomita M., Okuyama T. and Nigo Y., Simultaneous determination of paraquat and diquat in serum using capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 91–94, 1992.
- 6) Wu W. S. and Tsai J. L., Simultaneous determination of paraquat and diquat in urine by capillary electrophoresis. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, **14**, 76–80, 1998.
- 7) Vinner E., Stievenart M., Humbert L., Mathieu D. and Lhermitte M., Separation and quantification of paraquat and diquat in serum and urine by capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 342–347, 2001.
- 8) Ishiwata T., Onuki S., Okada H. and Ohashi K., Determination of paraquat and diquat in human blood by capillary electrophoresis after solid-phase extraction using an OASIS® MCX cartridge. *Jpn. J. Forensic Toxicol.*, **20**, 284–294, 2002.
- 9) 成田有史, 富岡なおこ, 飯田英己, 柳 幸男, 皆川 節, キャピラリー電気泳動による血液中のパラコートおよびジクワットの分析. 日本法科学技術学会誌, **10**, 171–178, 2005.
- 10) Castro R., Moyano E. and Galceran M. T., Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **914**, 111–121, 2001.
- 11) Lee X. P., Kumazawa T., Fujishiro M., Hasegawa C., Arinobu T., Seno H., Ishii A. and Sato K., Determination of paraquat and diquat in human body fluids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **39**, 1147–1152, 2004.
- 12) Ariffin M. M. and Anderson R. A., LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J. Chromatogr. B*, **842**, 91–97, 2006.
- 13) Wang K. C., Chen S. M., Hsu J. F., Cheng S. G. and Lee C. K., Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **876**, 211–218, 2008.
- 14) Whitehead Jr. R. D., Montesano M. A., Jayatilaka N. K., Buckley B., Winnik B., Needham L. L. and Barr D. B., Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **878**, 2548–2553, 2010.
- 15) Wang Z., Wang Z. and Xing J., The Quantita-

- tive Analysis of Paraquat in Biological Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **35**, 23-27, 2011.
- 16) Yoshioka N., Asano M., Kuse A., Matsuoka T., Akiyama Y., Mitsunashi T., Nagasaki Y. and Ueno Y., Rapid and sensitive quantification of paraquat and diquat in human serum by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *Forensic Toxicol.*, **30**, 135-141, 2012.
- 17) Hao C., Zhao X., Morse D., Yang P., Taguchi V. and Morra F., Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. *J. Chromatogr. A*, **1304**, 169-176, 2013.
- 18) 土橋 均, 辰野道昭, 大槻一夫, 酸化法によるパラコート及びジクワットの高速液体クロマトグラフィー同時分析法. 衛生化学, **34**, 31-35, 1988.
- 19) 土橋 均, 辰野道昭, 大槻一夫, 酸化法による血中及び尿中パラコート, ジクワットの高速液体クロマトグラフィー同時分析. 科学警察研究所報告, **41**, 269-271, 1988.
- 20) 厚生労働省, ジクワット, パラコート及びメピコートクロリド試験法 (農作物), available from [<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-206.html>], accessed Mar 20, 2015.
- 21) Calderbank A., Charlton D. F., Farrington J. A. and James R., Bipyridylum Quaternary Salts and Related Compounds. Part IV. Pyridones derived from Paraquat and Diquat. *J. Chem. Soc.*, **10**, 138-142, 1972.
- 22) 加藤晴代, 磯野秀夫, 藤田 進, 生体試料中パラコートの定性・定量のための除蛋白剤の検討について. 衛生化学, **32**, 460-463, 1986.
- 23) 鈴木雄亮, 金子 毅, 酸化法-GC/MS・LC/MSによる清涼飲料水中のパラコートおよびジクワットの分析. 日本法科学技術学会誌, **16** (Suppl), 52, 2011.
- 24) 角田紀子, Sep-Pak C₁₈ カートリッジによるパラコートの選択的抽出. 衛生化学, **29**, 206-211, 1983.
- 25) 佐藤常寿, Sep-Pak C₁₈ カートリッジによるジクワットの抽出について. 科学警察研究所報告, **41**, 265-268, 1988.
- 26) ジーエルサイエンス固相抽出ガイドブック編集委員会編, パラコート, ジクワットの前処理, 固相抽出ガイドブック. pp. 99-100, ジーエルサイエンス, 東京, 2012.