

今回は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたパラコートとジクワットの分析法をご紹介します。

塩基性農薬であるパラコート及びジクワットは、人体に対して非常に強い毒性を示すことが知られています。これらの農薬の中毒者における血中、尿中濃度の分析は、その患者の回復時期やその見込みを予測する目安となるため、とても重要です。

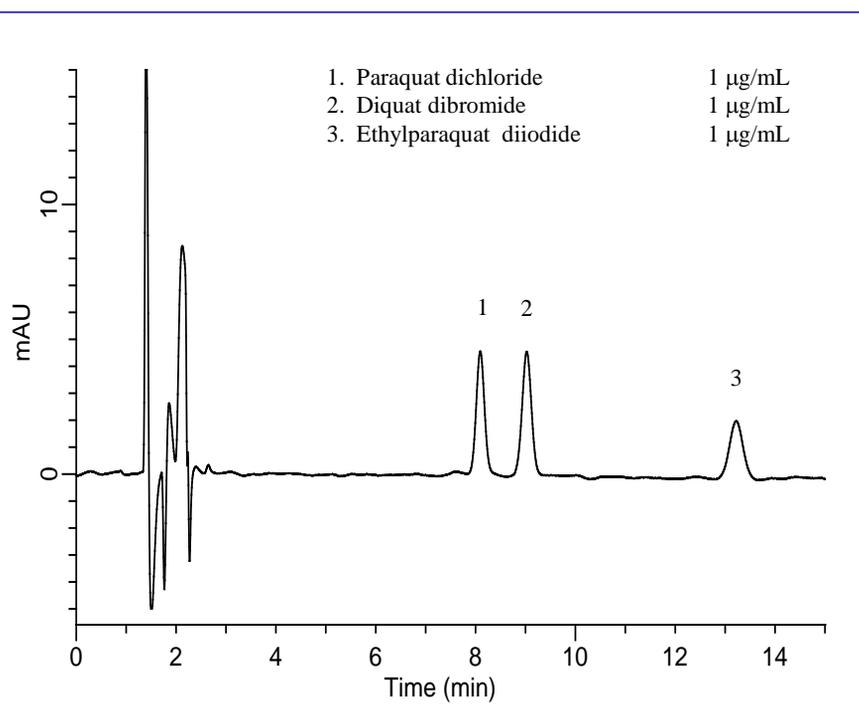
血中や尿中の濃度を測定するためには、固相カラムを用いた前処理が必要です。しかし、C18の固相カラムを使用する場合には、固相カラムに保持させる時にこれらの成分が不安定になるアルカリ溶液を使用することにな

り、回収率が低下してしまいます。また、強陽イオン交換体(SCX)を修飾した固相カラムを使う場合には、溶出させる時に高濃度の塩を含む溶液を用いる必要があります。溶出液をそのままHPLCに注入するとピーク形状が悪化する可能性があります。

そこで、今回は弱陽イオン交換体であるカルボキシル基(CBA)を修飾した、MonoSpin CBAを前処理工程において用いることにしました。その結果、尿中に含まれているパラコート及びジクワットを、短時間の操作で安定して精製・回収することができました。

(S. Ota)

標準液測定例

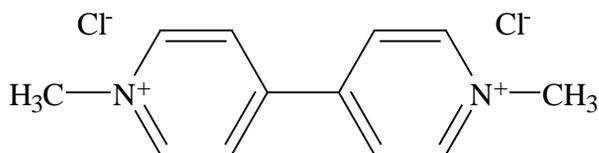


HPLC条件

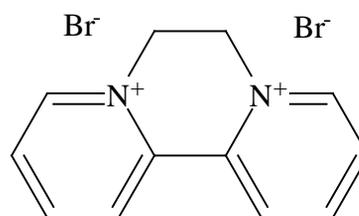
カラム	: Inertsil ODS-3 (5 µm, 150 x 4.6 mm I.D.)
溶離液	: A) Phosphate buffer ※ B) CH ₃ CN A/B = 89/11, v/v
流量	: 1.0 mL/min
カラム温度	: 40 °C
検出	: UV 290 nm
注入量	: 50 µL

※ Phosphate buffer ;
水に200 mMのリン酸、100 mMのジエチルアミン、7.5 mMの1-オクタンスルホン酸ナトリウムを溶かしたもの。

構造式



パラコート
(Paraquat)

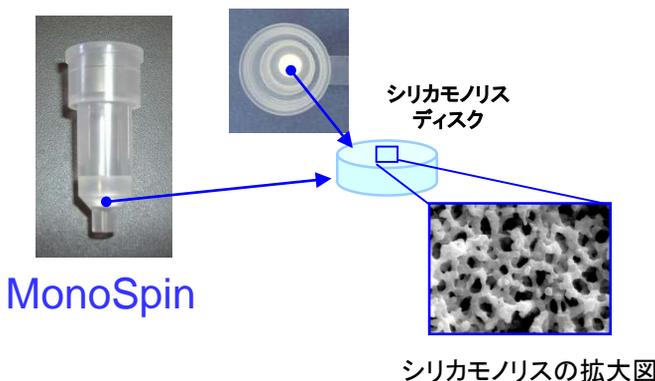
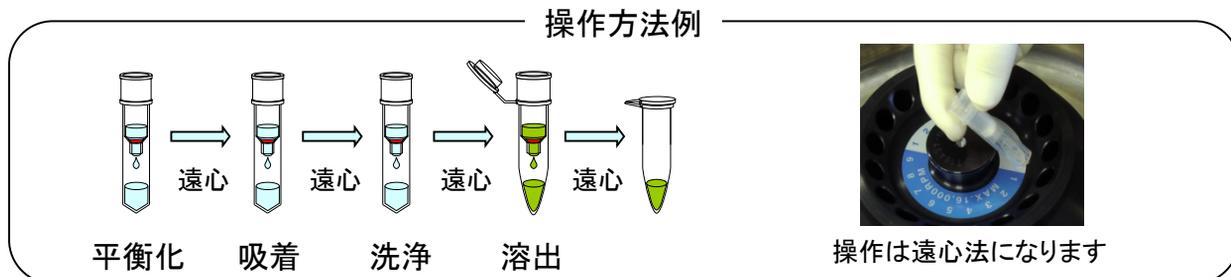


ジクワット
(Diquat)

Structures are created using Chemistry 4-D Draw which is provided by ChemInnovation Software, Inc.

MonoSpin とは？

MonoSpinシリーズは、均一な連続孔を持つシリカモノリスを用いたスピナカラムです。空隙率の高いシリカモノリスを担体として用いているので、遠心操作だけで通液させることができます。そのため、短時間の簡便な操作で試料の精製・濃縮を行うことができます。また、ベッドボリュームが小さく液のきれも良いので、試料量が少ない場合にも適しています。

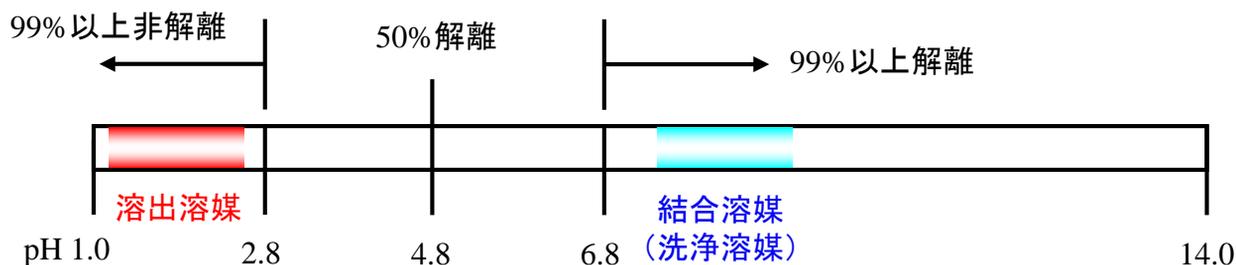


MonoSpin CBA を使用した前処理の原理

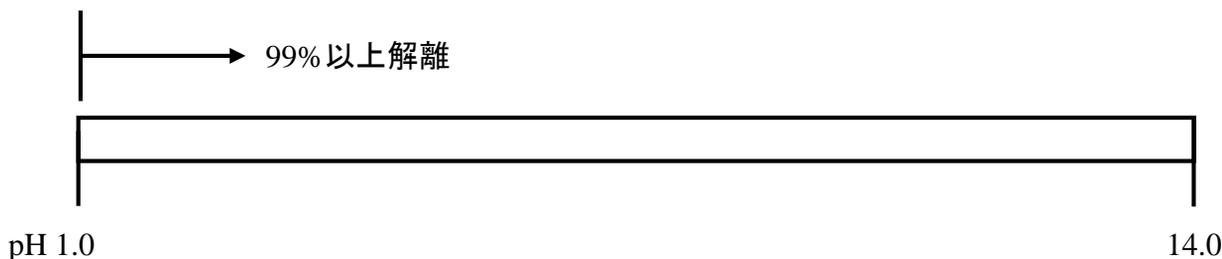
MonoSpin CBAには、弱酸性のカルボキシル基(COOH)が修飾されています。カルボキシル基は通液する溶媒のpHによって、解離状態(COO-)もしくは非解離状態(COOH)となります。パラコートやジクワットは陽イオン性の分子なので、MonoSpin CBAに保持させる時には塩基性の溶媒を通します。溶出する時にはカルボキシル基の解離を抑制するために強酸性の溶媒を通します。

なお、強酸性の官能基であるスルホン酸(SO₃H)が修飾されたMonoSpin SCXでは、溶媒のpHによってスルホン酸を非解離の状態とすることができません。そのため、MonoSpin CBAの方がパラコートやジクワットを容易に溶出させることができるのです。

MonoSpin CBA (pKa ≒ 4.8)

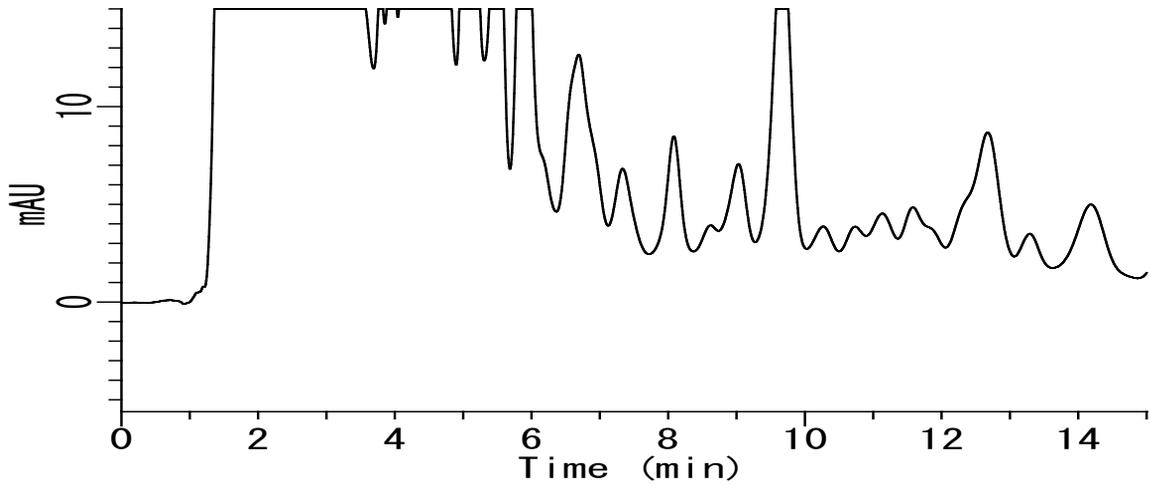


MonoSpin SCX (pKa < 1.0)

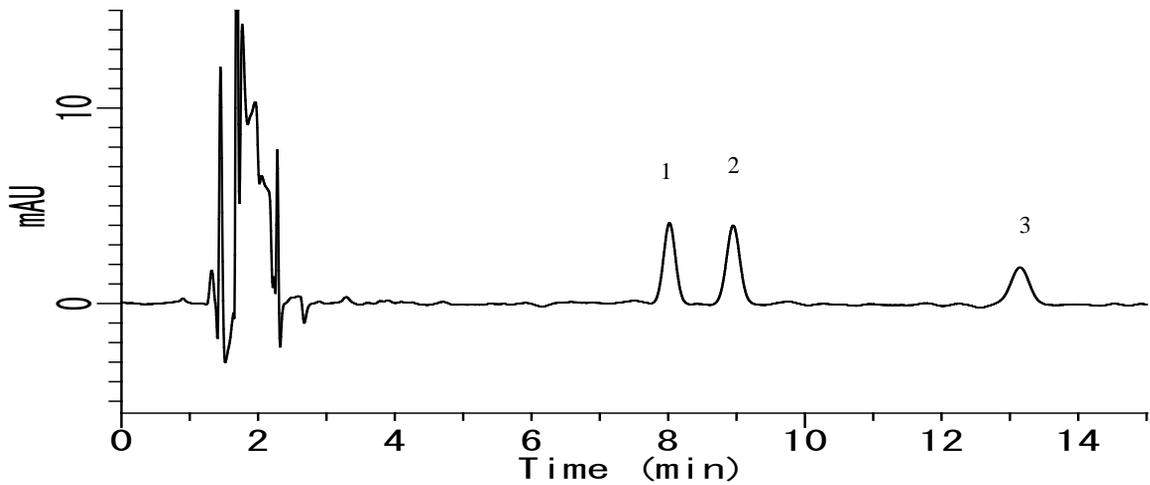


各成分1 $\mu\text{g/mL}$ を添加した尿サンプルのクロマトグラム

<MonoSpin CBAによる精製前>



<MonoSpin CBAによる精製後>



前処理工程のプロトコル

あらかじめ準備するもの:

- ①洗浄溶媒: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)
- ②溶出溶媒: 塩酸:メタノール:水=1:30:69

MonoSpin CBAに廃液用チューブを取りつける

↓ + ①洗浄溶媒 200 μL

遠心*

↓ + ①洗浄溶媒 400 μL

↓ + 尿サンプル 200 μL

遠心

↓ + ①洗浄溶媒 200 μL

遠心

↓

(右上へ)

(左下より)

↓

回収用チューブに付け替える

↓ + ②溶出溶媒 200 μL

遠心

↓

回収された溶液をHPLCシステムにインジェクト

* 遠心は全て、10,000 gで30秒間としました。

回収率と再現性

アルカリ性の溶液を使わないので、ほとんど分解することなく良好な回収率が得られました。また、MonoSpinシリーズに標準付属の各種チューブは全てプラスチック製なので、ガラス製の器具に吸着する塩基性の成分などを扱う場合にも安心です。

成分名	濃度 (ug/mL)	日内変動 (n=5)		日間変動 (n=3)	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
パラコート	1.0	97.5	6.5	95.4	2.6
	0.1	99.1	3.5	95.4	3.3
ジクワット	1.0	94.3	8.9	97.4	3.0
	0.1	98.7	3.6	97.7	3.1
エチルパラコート	1.0	88.0	5.9	89.8	6.0
	0.1	101.6	3.2	97.3	4.0

使用した前処理カラム；

MonoSpin CBA 50/pk
Cat.No. 5010-21729

MonoSpin CBA 100/pk
Cat.No. 5010-21730

※ 検討のためのトライアルキットもあります！

MonoSpin トライアルキット1：薬物、農薬分析に最適です。
(C18, SCX, SAX, TiO 各10個入)
Cat. No. 5010-21740

MonoSpin トライアルキット2：糖鎖や親水性化合物分析に最適です。
(C18, Amide, CBA, NH2 各10個入)
Cat. No. 5010-21741

MonoSpin トライアルキット3：イオン性化合物の分析に最適です。
(SCX, SAX, CBA, NH2 各10個入)
Cat. No. 5010-21742



ジールサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー 30F
TEL.03-5323-6611 FAX.03-5323-6622

※各試験法は、変更される場合がありますので、分析の前に確認されることをお勧めします。

データに起因し、直接的または間接的に生じたいかなる損害に対しても、当社が責任をおうものではありません。また、記載事項につきましては、予告無しに改訂する場合がありますので、あらかじめご了承ください。

カスタマーサポートセンターでは、ノウハウのご提供と分析に関するフォローを行っております。お困りの際には、カスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。

カスタマーサポートセンター (土・日・祝除く 9:00-17:00)

04-2934-1100 info@gls.co.jp



【アプリケーションの検索はこちら】

https://www.gls.co.jp/technique/app/app_search.html