

ノ ー ト

キャピラリー電気泳動法による生体試料中の過塩素酸塩の定量

加藤 徳雄^①, 森本 聡^②, 真鍋 敬^③

1 緒 言

過塩素酸塩による水質汚染が米国で 1997 年に発見されて以来、環境や食品中の過塩素酸塩についての関心が高まっている¹⁾²⁾。過塩素酸塩は、ミサイルやロケット燃料における酸化剤として、身近なところでは自動車のエアバッグ、発煙筒、花火などに用いられている。また、落雷による放電などにより塩素を含むエアロゾルから自然に生成され、湿性沈着物として地上に降下している³⁾⁴⁾。これらの過塩素酸塩は、大気環境中に拡散し、水への溶解度が大きい。解離によって生じる過塩素酸イオン (ClO_4^-) は環境水中や地下水中で安定であるため、飲料水⁵⁾や食物^{6)~8)}に取り込まれ、ヒトの体内に摂取されている。ヒト体内で過塩素酸塩は、甲状腺ホルモンを合成するためのヨウ素の摂取を妨げ、甲状腺ホルモンの生産を阻害すると言われている⁹⁾。

環境水や地下水中の ClO_4^- の定量は、イオンクロマトグラフィー (IC) による場合^{10)~12)}が多い。マトリックス成分を多く含む生体組織や生体液の測定には、IC 又は液体クロマトグラフィーと質量分析法を組み合わせた分析方法 (IC/LC-ESI-MS, IC/LC-ESI-MS/MS) が広く用いられている¹³⁾¹⁴⁾。一方、キャピラリー電気泳動法 (CE) による ClO_4^- の定量については、希薄水溶液中の分離法や検出限界を検討した報告¹⁾は多く見られるが、生体試料中の ClO_4^- の試料前処理法¹⁵⁾についてはほとんど報告されていない。本報ではラットに過塩素酸塩を投与して得た血液・尿・甲状腺などの生体試料を用いて試料調製法及び定量法を検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

陰イオン混合標準液は和光純薬製のイオンクロマトグラフ用陰イオン混合標準溶液 I と ClO_4^- 標準液を混合・希釈して用いた。 ClO_4^- 標準液の調製には同社製特級の過塩素

酸アンモニウムを用いた。エタノール (99.5%) は同社製精密分析用、過塩素酸ナトリウム (98%) は SIGMA-ALDRICH 製を用いた。その他の試薬は和光純薬製特級を用いた。水は Milli-Q 純水製造装置で精製した水を用いた。

キャピラリー電気泳動に用いる泳動液は Agilent 製 Inorganic Anion Buffer とリン酸塩泳動液の 2 種を用いた。Agilent 製泳動液は調製済みのものであり、8.5 mM NaOH-0.35 mM ピロメリット酸-0.42 mM トリエタノールアミン-0.12 mM ヘキサメトニウムヒドロキシド混合溶液 (pH 7.7) である。リン酸塩泳動液は実験室で調製したものであり、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)-2.24 mM ピロメリット酸-0.25 mM テトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (TTAB) 混合溶液¹⁵⁾とした。

2.2 試料採取と試料調製

2.2.1 試料採取 分析法の正確さや分離を検討するため、過塩素酸塩を投与しない動物から採取した空試験試料に ClO_4^- 標準液を添加した標準添加試料を用いた。また過塩素酸ナトリウムの水溶液をオスのラット静脈に注入し、24 時間後に血清、甲状腺及び尿を採取した。投与濃度は NaClO_4 1.2, 12, 及び 1.2×10^2 mg/kg とした。

2.2.2 血清及び尿の試料調製 100~300 μL (ClO_4^- 濃度に応じて) を 1.5 mL マイクロチューブに採取し水冷したエタノール (試料の 4 倍量) を添加混合した。これを 20000 g, 30 min, 4°C で遠心分離する。上澄みを回収した後、沈殿に更に同量のエタノールを添加し、超音波ホモジナイザーでかくはんし、上記の条件で遠心分離した。この上澄みを合わせ真空乾燥器又はアルミブロック恒温槽で 37°C に加熱し、エタノールを蒸発乾固させた。これに酢酸銀溶液 (0.049 M) を血清 200 μL のとき 0.45 mL を加え塩化銀を沈殿させた。更に酢酸銀溶液を 0.05 mL 追加しても新たな沈殿が生じないことを確認し、60°C で約 20 分温浸した。放冷後上記の条件で遠心分離し、上澄みを孔径 0.45 μm のシリジフィルター (versapor, acrodisc, Pall Gelmann 製) で汙過し分析試料とした。

2.2.3 甲状腺の試料調製 ラット甲状腺を 1.5 mL マイクロチューブに採り水 0.25 mL を加え、マイクログ

^① 愛媛県立医療技術大学保健科学部: 791-2101 愛媛県伊予郡砥部町高尾田 543 番地

^② 愛媛県工業技術センター: 791-1101 愛媛県松山市久米窪田町 487-2

^③ 愛媛大学理学部物質質学科: 790-8577 愛媛県松山市文京町 2-5

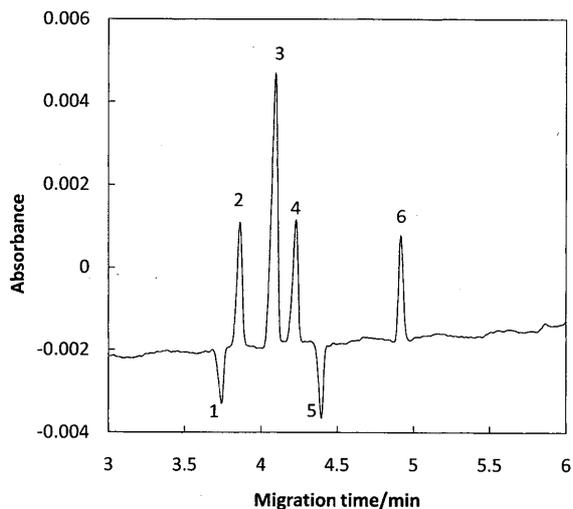


Fig. 1 Electropherogram of standard anions

Conditions, capillary: 60 cm \times 75 μ m i.d., uncoated fused silica; carrier electrolyte: Agilent inorganic anion buffer, pH 7.7; injection: pressure 0.5 psi (3447 Pa) for 5 s; applied potential: -25 kV; detection: indirect UV at 200 nm; Temp. of capillary; 30°C; solute: 1 = bromide (10 ppm); 2 = chloride (2 ppm); 3 = sulphate (10 ppm); 4 = nitrite (10 ppm); 5 = nitrate (10 ppm); 6 = perchlorate (5 ppm).

ラインダー及び超音波ホモジナイザーで組織を破碎した後、2.2.2の遠心分離の条件で遠心分離し、上澄みを回収した。沈殿について以上の操作を繰り返し、回収した上澄み液を合わせて0.50 mLとした。これを上記のフィルターで濾過し分析試料とした。

2.3 分析機器と分析条件

キャピラリー電気泳動は Beckman P/ACE MDQ により行った。泳動条件は以下の通りである。

キャピラリー: 溶融シリカ素管, 内径 75 μ m, 全長 60 cm, 有効長 50 cm; 印加電圧: -25 kV, 検出器側陽極; 検出は波長 200 nm での間接検出法; 泳動液: Agilent Inorganic Anion Buffer, pH 7.7; 試料注入: 圧力注入及び電氣的注入; キャピラリーの周囲温度 30°C; 分析時間は 6 分間; 洗浄: 分析終了後のキャピラリーの洗浄は, 水で 1 分間, 0.1 M NaOH で 3 分間, 水で 3 分間, 次の試料注入前に泳動液で 4 分間とした。

検量線作成用標準液は血清・尿及び甲状腺の空試験試料に ClO_4^- 標準液を添加し, 試料と同時に同じ操作法で調製した。

3 結果と考察

3.1 泳動液の検討

泳動液として Agilent 製及び 20 mM リン酸塩泳動液に

ついて, 陰イオン混合標準液を試料として検討した。両泳動液とも電気浸透流逆転剤と間接吸光試薬を含み, 電気浸透流の方向を逆転させ陽極側で陰イオンを間接的に吸光検出するものである。 ClO_4^- は両泳動液において他の成分と分離可能であったが, Agilent 製は 20 mM リン酸塩よりも検出限界が低く, ベースライン及び泳動時間の変動が小さいので, Agilent 製を用いた。Fig. 1 に Agilent 製泳動液を用いた陰イオン混合標準液の分離状態を示した。

3.2 泳動条件の検討

印加電圧を -20 kV から -25 kV まで変化させて, 陰イオン混合標準液を試料として分離を検討した。印加電圧を負側に変化させていくと泳動速度が速くなるため移動時間は短くなり, ピーク面積は小さくなった。いずれの印加電圧でもピークの分離は良好であったので, 泳動時間が比較的短い -25 kV を選択した。

キャピラリーの全長 60 cm と 80 cm の場合について同様に比較し, 泳動時間が短くピーク面積が大きい 60 cm を選択した。

検出波長は, ClO_4^- 5 μ g/mL を含む血清試料について, 4 波長 200, 214, 254, 280 nm でピーク面積を比較し, 最も大きな値を示した 200 nm を選択した。

3.3 試料調製法及び回収率の検討

血清・尿試料は冷エタノールを加え沈殿したタンパク質を遠心分離し, 回収した上澄みのエタノールを蒸発乾固させたのち, 水を加え試料中の成分を水に溶解させた¹¹⁾。このように調製された試料中には塩化物イオンが多量に存在し, ClO_4^- 分離の妨げになる場合が多い。そこでエタノール蒸発後に酢酸銀水溶液を加え, 塩化銀の沈殿を生成させてこれを遠心分離した。この操作によって塩化物イオンのピーク面積を約 250 分の 1 に減少させることができた。

次に塩化銀沈殿分離の操作による ClO_4^- の共沈などによる損失を検討した。空試験血清 (ラット) に ClO_4^- 標準液を段階的に添加したものを 2 つずつ調製し, 一方に塩化銀沈殿分離を行い, 他方は行わずに ClO_4^- のピーク面積を比較した。いずれの濃度においてもピーク面積はほぼ同じであり沈殿分離による ClO_4^- の損失は認められなかった。

上記の調製法により分析試料中のタンパク質や塩化物イオンを減少させることができたので, 試料注入に電氣的注入法を用いることが可能になった。濃度感度が不足する場合は試料注入量を増やしたが, 試料注入量が多くなるに連れて分離度が低下するので, ClO_4^- のピーク形状が正常に保たれる範囲で最大電圧 -10 kV, 注入時間 99.9 秒とした。検量線の直線性は良好であり, 濃度とピーク面積の相関係数 r は 0.9998, 血清・尿の検出限界は 0.01 μ g/mL であった。

Table 1 Recovery and precision of CE determination of perchlorate spiked in biological samples

Fluids and tissues	Concentration/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Found ^{a)} / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recovery, %	RSD, %
Rabbit, serum	10	9.3 ± 0.68	93	7.3
	5.0	4.9 ± 0.49	98	10
	1.0	1.0 ± 0.14	102	14
Rat, serum	5.0	5.1 ± 0.34	102	6.7
	1.0	0.98 ± 0.042	98	4.2
Human, urine	5.0	4.8 ± 0.28	96	5.8
	1.0	0.99 ± 0.12	99	12
Rat, thyroid	5.0	4.9 ± 0.036	99	0.73
	1.0	1.0 ± 0.042	100	4.2

a) Mean \pm SD at each concentration, $n = 5$

Table 2 Perchlorate concentration in serum, urine and thyroid gland in intravenously dosed male rats

Dose/mg (perchlorate/kg body weight)	Serum perchlorate/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Urine perchlorate/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Thyroid perchlorate (total amount in μg)
1.2	0.14 ± 0.042	3.9 ± 1.6	0.017 ± 0.0026
12	1.2 ± 0.26	14 ± 4.2	0.090 ± 0.023
1.2×10^2	6.0 ± 0.72	74 ± 26	0.42 ± 0.13

Samples were collected at 24 h following the perchlorate administration, mean \pm SD at each concentration, $n = 5$.

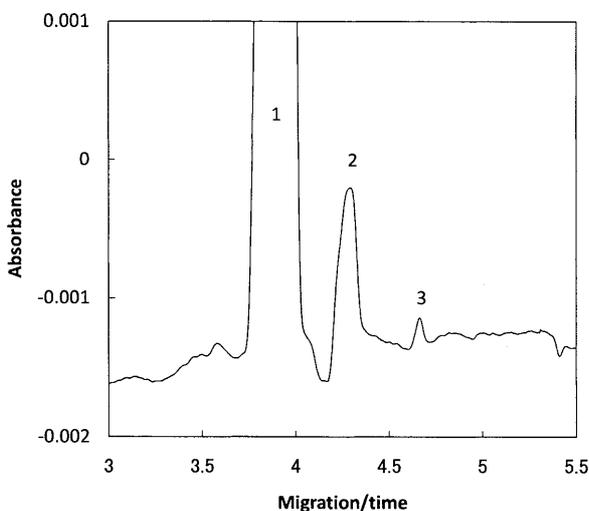


Fig. 2 Electropherogram obtained for a serum sample of rat dosed intravenously with perchlorate at concentration of 1.2 mg/kg

Conditions are same as Fig. 1 except for electrokinetic injection for 99.9 s at -10 kV; solute: 1 = chloride; 2 = unknown; 3 = perchlorate.

なお甲状腺試料は血清・尿に比べて共存成分濃度が低いのでタンパク質や塩化物イオンの分離は行わず, 試料注入は圧力注入によった. 甲状腺の検出限界は 0.25 mg/kg であった.

上記の試料調製法による定量の正確さを確認するため,

標準添加試料を分析し回収率を求めた. この結果を Table 1 に示した. 回収率は $93 \sim 102\%$ であり, 定量の正確さが確認できた.

3.4 過塩素酸塩投与生体試料中の ClO_4^- の定量

過塩素酸ナトリウム水溶液をオスのラット静脈に注入し, 24 時間後に採取した血清, 甲状腺及び尿を分析した. 投与濃度 1.2 mg/kg のラット血清試料の一例を Fig. 2 に示した. この場合吸光度変化量は 0.00022 で定量値は 0.20 ppm であり, 高感度の検出が可能となった. 分析値を Table 2 に示した. 血清, 尿及び甲状腺試料のいずれにおいても投与濃度を増加すると上記試料中の ClO_4^- の濃度は高くなっている.

4 結 言

血清, 尿, 甲状腺中の過塩素酸塩の定量に紫外線検出キャピラリー電気泳動を用いる方法について報告した. エタノール沈殿法によるタンパク質の除去ならびに酢酸銀による塩化物イオンの除去により, はじめて生体試料中の ClO_4^- をキャピラリー電気泳動法で定量することができた.

文 献

- 1) E. T. Urbansky: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **30**, 311 (2000).

- 2) 竹内政樹: *ぶんせき (Bunseki)*, **2007**, 94.
- 3) P. K. Dasgupta, P. K. Martinelango, W. A. Jackson, T. A. Anderson, K. Tian, R. W. Tock, S. Rajagopalan: *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 1569 (2005).
- 4) L. Barron, P. N. Nesterenko, B. Paull: *Anal. Chim. Acta.*, **567**, 127 (2006).
- 5) S. A. Snyder, B. J. Vanderford, D. J. Rexing: *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 4586 (2005).
- 6) A. J. Krynsky, R. A. Niemann, A. D. Williams, M. L. Hopper: *Anal. Chim. Acta*, **567**, 94 (2006).
- 7) H. El-Arabi, Y. J. C. LeBlanc, S. Antosen, T. Sakuma: *Anal. Chim. Acta*, **567**, 39 (2006).
- 8) A. B. Kirk, P. K. Martinelang, K. tian, A. Dutta, E. E. Smith, P. K. Dasgupta: *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 2011 (2005).
- 9) E. A. Merrill, R. A. Clewell, P. J. Robinson, A. M. Jarabek, J. M. Gearhart, T. R. Sterner, J. W. Fisher: *Toxicological Sciences*, **83**, 25 (2005).
- 10) K. Tian, P. K. Dasgupta, T. A. Anderson: *Anal. Chem.*, **75**, 701 (2003).
- 11) L. Narayaman, G. W. Buttler, K. O. Yu, D. R. Mattie, J. W. Fisher: *J. Chromatog. B.*, **788**, 393 (2003).
- 12) P. Batjoens, H. F. DeBrabander, L. T'Kindt: *Analytica Chimica Acta.*, **275**, 335 (1993).
- 13) L. Valentin-Blasini, J. P. Mauldin, D. Maple, B. C. Blount: *Anal. Chem.*, **77**, 2475 (2005).
- 14) J. V. Dyke, K. Ito, T. Obitsu, Y. Hisamatu, P. K. Dasgupta, B. C. Blount: *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 88 (2007).
- 15) J. J. Ellington, N. L. Wolfe, A. W. Garrison, J. J. Evans, J. K. Avants, Q. Teng: *Environ. Sci. Tecnol.*, **35**, 3213 (2001).

Determination of Perchlorate in Biological Samples by Capillary Electrophoresis

Norio KATO¹, Satoshi MORIMOTO² and Takashi MANABE³

¹ Ehime Prefectural University of Health Sciences, Faculty of Health Sciences, 543, Takooda, Tobecho, Iyogun, Ehime 791-2101

² Industrial Research Center of Ehime Prefecture, 487-2, Kumekubota-machi, Matsuyama-shi, Ehime 791-1101

³ Ehime University, Faculty of Science, 2-5, Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime 790-8577

(Received 7 May 2007, Accepted 14 June 2007)

A rapid capillary electrophoresis method was developed to detect perchlorate in tissues of male rats after the administration of perchlorate. Supernatants of ethanol-precipitated rat fluids were evaporated to dryness, and silver acetate solution was added. Precipitated silver chlorides were separated by centrifugation and supernatants were injected into a capillary electrophoresis system coupled with UV detection. The separation and quantification of perchlorate was achieved using Agilent inorganic anion buffer as the carrier electrolyte, electrokinetic injection and indirect detection at 200 nm. The lower detection limits for perchlorate in fluids and tissues of rats were 0.01 µg/ml and 0.25 mg/kg, respectively. Perchlorate in biological samples was determined for the first time by capillary electrophoresis already described.

Keywords : perchlorate ; capillary electrophoresis ; serum ; urine.