

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590631

研究課題名（和文）薬毒物錯体混合物のタンデム質量分析によるカラムを使用しない高感度同時分析法

研究課題名（英文）Simultaneous sensitive detection of chelated medicines and poisons by electrospray ionization tandem mass spectrometry without column separation

研究代表者

南方 かよ子 (MINAKATA KAYOKO)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70115509

研究成果の概要（和文）：申請者は水溶性が高い種々の薬毒物を錯体とし、極性有機溶媒で抽出し、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析(MS)法での高感度検出を可能にしてきた。その研究過程で性質が類似している一群の薬毒物は類似の条件で錯体の生成と検出が可能、即ち同時分析が可能であることが示唆された。従って、本研究では混合している薬毒物を群として一斉分析する方法の開発に努めた。また、通常の質量分析では妨害物を除くために、また混合した薬毒物を分離するためにカラムを使用しているが我々の方法ではタンデムマス(MS-MS)を用いることにより、妨害物を除き、かつ混合した薬毒物を分離するので、高価なカラムが不要である。またカラムによる分離には 30 分程時間を要するが我々の方法ではその時間は不要である。この 3 年間の研究成果として、1.シアン・アザイドイオン群、2.貴金属群、3.甲状腺機能低下イオン群の一斉分析が可能となった。我々の同時分析法は、時間、費用の面で法医学、救急医学分野に利点をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：To facilitate the detection of highly hydrophilic medicines and poisons, we developed a method that produces chelate complexes of analytes and then extracts them with polar organic solvents before electrospray ionization mass spectrometric (ESI-MS) detection. During the study we noticed the possibility to detect several analytes simultaneously by the method. In the simultaneous detection, usually, column separation was performed to separate analytes as well as to eliminate impurities. In tandem mass spectrometry (MS-MS), MS detection was performed twice in a blink for precursor ion and product ion, and hence impurities were eliminated twice. Most analytes having different molecular structures showed different product ions at the 2nd MS even though they showed the same m/z at the 1st MS. Therefore, our simultaneous detection method by ESI-MS-MS did not require column separation that took about 30 min. Using this method, three groups of analytes, that is, 1. cyanide-azide ion group, 2. coinage-metal group, 3. ion group that related to hypothyroidism, could be detected simultaneously during these three years. Multi analytes detection using a single sample without column separation contributes greatly to the saving of time and resources in forensic and clinical toxicology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：薬毒物、錯体、タンデム質量分析、イオンスプレー

1. 研究開始当初の背景

水溶性が高い薬毒物のエレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析(MS)法による実用レベルでの報告はなかった。我々はこれらの薬毒物を錯体として極性有機溶媒で抽出し、ESI-MS 装置に導入することにより高感度な検出を可能にしてきた。

その研究の過程において、性質が類似している一群の化合物は同一条件で各々の錯体の生成と検出が可能であること、即ち同時分析が可能であることが示唆された。例えば、シアン(CN⁻)中毒時、生体内では解毒作用により、CN⁻がチオシアン(SCN⁻)となるので、1 つの検体で両者を同時に測定することが望ましい。SCN⁻や過塩素酸(CIO₄⁻)は甲状腺がヨード(I⁻)を取り込むのを妨害する。生体内におけるこれら阻害物質と基質とを同時に測定できることが望ましい。

2. 研究の目的

(1)多くの薬毒物の一斉分析を可能にするには通常、カラムによる妨害物の除去や薬毒物の分離がなされたりしているが、その方法では高価なカラムが必要であり、かつ分離のため、30 分程度の時間を必要とする。我々はタンデム質量分析(MS-MS)装置を用い、カラムを使用することなく同時分析する方法を開発することを目的とする。

MS-MSとは第一のMSで目的の分子イオンを捕捉し、それにアルゴンガスを衝突させ、分子が分解したプロダクトイオン群を作り、その中から、その分子に特徴的かつ強度が高いプロダクトイオンを第二のMSで捕捉し、定量する。目的の分子イオンと同一な m/z をもったイオンのみがアルゴンガスの衝突を受けるので、目的のプロダクトイオンの m/z と同一な m/z を持った妨害物は極めて稀少であり、カラムによる分離がなくてもそれ以上の測定感度が得られることが多い。例えば、アジ化物イオン(N₃⁻)とシアン酸イオン(OCN⁻)は同一 m/z であるのでAu(N₃)₂⁻とAu(OCN)₂⁻は同一の $m/z = 281$ を第一のMSで示す。しかし、第二のMS-MSでは前者の主プロダクトイオンは $m/z = 253$ のAu(N)(N₃)⁻であり、後者のそれは $m/z = 42$ のOCN⁻であるのでカラムを使用することなく両者を区別することができる。

このように同時分析は、時間、費用の面で研究者に利点をもたらすのみならず、生

体反応についての知識を深めることも可能である。MS-MS を用いた同時分析を行い、併せて今までの方法を広く深く発展させることを目的とする。

(2) この方法の利点

① 対象薬毒物は低分子であるので、それらの m/z は200以下である。質量分析においてこの200以下の領域は種々の分子や溶媒等に由来する妨害シグナルが非常に多い領域である。薬毒物を錯体とすることによりその分子量は増加し m/z は400以上となることが多く、その結果、妨害シグナルを避けることができる点で有利である。

② 薬毒物錯体の m/z を選択した後に、アルゴンガスを衝突させて錯体からキレート剤を取り除き、次に薬毒物自体の m/z を選択するという、タンデム質量分析、即ち、2回の質量選択(MS-MS)を行うことにより、妨害シグナルをさらに除くことが可能となり、より高感度を得ることが可能である。

③ 生体試料は水溶性であるので、妨害物質も水溶性である。極性有機溶媒で薬毒物錯体を抽出することにより、これらの多くの妨害物を除くことが可能である。

④ 今までのESI-MSの溶媒はメタノールやアセトニトリルのような、水との親和性が大きい溶媒であったが、申請者の溶媒はメチルイソブチルケトンのような、水との親和性が小さい溶媒であるので、イオンスプレーがより容易となり高感度が得られる。

3. 研究の方法

群中の各薬毒物について以下の項目について、最適条件を捜した後、それらを総合した群の最適条件を捜した。

(1) キレート剤：陰イオンキレート剤としてはpyrrolidine dithiocarbamate, dithizone, citric acid, diethyl-dithiocarbamate, 8-quinolinol, 1,10-phenanthroline, heptanesulfonic acid 等があり、陽イオンキレート剤としては3価金、tetrabutylammonium, tetraethylammonium 等があり、これらの中から選択した。

(2) pH：錯体作成時の最適pH、次に錯体を有機溶媒で抽出する時の最適pH お呼びこれらのpHを得るための最適緩衝剤についての検討を行った。

(3) 抽出極性有機溶媒：クロロホルム、イソアミルアルコール、ヘキサノール、オクタノール、メチルイソブチルケトン、ジクロロ

メタン、クロロブタン、ニトロベンゼン等の
中から最適溶媒を選択した。

(4) 装置：四重極型質量分析機(TSQ 7000,
ThermoQuest, Japan) を用いた。キャピラリー
温度、イオン化電圧、コリジョン電圧の最適
条件を捜した。

4. 研究成果

(1) シアン・アザイドイオン群

アジ化物イオン(N_3^-)はエアバッグや防腐
剤に使用されている。日本では近年その中毒
や犯罪への使用が問題となり、1999年には毒
物に指定された。 N_3^- を有機化合物によって誘
導体化し、GC-MSによって検出するのが今ま
では最良の方法であった。しかし、その方法
では誘導体化には30分、GCにさらに15分を要
する点や、シアン酸イオン(OCN^-) [シアン(CN^-)
やチオシアン(SCN^-)の酸化により生成するイ
オンであるが]は、 N_3^- と同一質量であるため、
 N_3^- の判定を著しく妨害する点等、多々改良が
必要であった。我々は測定時間が10分で、よ
り少量の試料で OCN^- と N_3^- とが区別できる
MS-MSによる N_3^- の検出法を開発した。

試料とAuイオンをアスコルビン酸含有pH5
の緩衝液に添加して錯体を作成した。錯体を
オクタノールで抽出し、ESI-MS-MS装置に注入
した。第一のMSで $m/z = 281$ のAu(N_3) $_2^-$ を検出
し、第二のMS-MSで $m/z = 253$ のAu(N)(N_3) $^-$
への脱離反応を測定した。 OCN^- は第一のMSで m/z
 $= 281$ のAu(OCN) $_2^-$ を示すが、MS-MSでは $m/z =$
 253 にシグナルを示さないので、 OCN^- と N_3^- とは
明確に区別された。また、 $m/z = 253$ における
妨害イオンは非常に少ないので N_3^- の検出感度
が向上した。定量濃度は0.1—10 μ Mであった。
アジ化ナトリウム(NaN_3)による自殺と推定さ
れた解剖例での胃内容中濃度は75nM、尿中濃
度は3.2mMであった。胃内容中の NaN_3 の総量は
3.1gと計算された。本解剖例のように、高濃
度の胃内容と尿では試料を20,000倍と5,000
倍に希釈するのみで10分以内に検出できるの
で、本法は毒物スクリーニングに適した方法
と思われる。また、アジ化物中毒では生体内
で、シアンが産生される。解剖例において胃
内容、尿、血液中のシアン濃度も定量した。
これらの結果は下記の雑誌論文②、⑧で報告
した。

(2) 貴金属群(金、銀、銅)

金化合物はリュウマチの治療薬、銀化合物
は殺菌剤として使用されている。一方銅レベ
ルは種々の疾患や薬剤投与で変動する。金属
定量にはICP-MS装置が汎用されており、有
機化合物検出に最適なESI-MS装置では金
(Au)、銀(Ag)、銅(Cu)の高感度検出はまだな

されていなかった。今回、Au, Ag, Cuにジエ
チルジチオカルバメート(DDC)を結合させた
錯体群検出の最適条件を調べた。その結果、
第一のMSによる $[Au(DDC)_2]^+$ 、 $[Ag(DDC)_2]^+$ 、
 $[Cu(DDC)_2]^+$ はMS-MSにより $[Au(DDCH)]^+$ 、
 $[Ag(DDCH)]^+$ 、 $[Cu(DDCH)]^+$ となり、検出限界
が5pgという高感度で3種類の金属イオンを
同時検出する方法を確立することができた。
高血圧ラット腎臓中の銅の変動をこの方法
で測定した。このようにICP-MS装置がなく
ても本方法により、金属イオンを同時検出
できることが示された。これらの結果は下記
の雑誌論文⑥で報告した。

(3) 甲状腺機能低下イオン群(ClO_4^- , SCN^- , I^-)

過塩素酸(ClO_4^-)化合物は金属や鉱物類の
溶解やロケット燃料の酸化剤として使用さ
れている。 SCN^- は野菜から摂取されるが毒物
 CN^- の解毒産物でもある。甲状腺では ClO_4^-
は I^- の30倍、 SCN^- は2倍吸収され易く両者
は I^- の吸収を阻害する。今までのこれらの陰
イオンの検出法では2価陽イオンと陰イオン
($X=ClO_4^-$, SCN^- , I^-)との間でイオンペアを
作り検出していたが、その方法でのMS-MS
では陽イオンの分解物が検出され、検出す
べき陰イオンの方は検出できなかった。我々
は陰イオン(X)が鉄(Fe)フェナントロリン
(phen)と錯体 $[Fe(phen)_2X]^+$ を生成するこ
とを見出した。更に錯体検出の最適条件を
調べた。その結果、MSで検出された $[Fe(phen)_2X]^+$
はMS-MSによって陰イオンを含んだ
 $[Fe(phen)X]^+$ となった。その結果、検出限界
が30nMという高感度で3種類の陰イオンを
同時検出することができた。これらの結果は
下記の雑誌論文⑤、⑦で報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al.
MALDI-TOF mass spectrometric
determination of 11 phenothiazines with
heavy side chains in urine. Forensic
Toxicology, 査読有, 31巻, 2013, 138-144,
DOI 10.1007/s11419-012-0157-2
- ② Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al.
Determination of azide in gastric fluid and
urine by flow-injection electrospray
ionization tandem mass spectrometry.
Analytical Bioanalytical Chemistry, 査読有,
403巻, 2012, 1793-1799, DOI
10.1007/s00216-012-5848-3
- ③ Kunio Gonmori, Kayoko Minakata, Masako
Suzuki, et al. MALDI-TOF mass

- spectrometric analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in urine. Forensic Toxicology, 査読有, 30 巻, 2012, 179-184, DOI 10.1007/s11419-012-0145-6
- ④ Kunio Gonmori, Koutaro Hasegawa, Hiroki Fujita, Yoshito Kamijo, Hideki Nozawa, Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata, Kanako Watanabe, Osamu Suzuki, Analysis of ibotenic acid and muscimol in *Amanita* mushrooms by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Forensic Toxicology, 査読有, 30 巻, 2012, 168-172, DOI 10.1007/s11419-012-0144-7
- ⑤ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al. A new approach in tandem mass spectrometry simultaneous determination of perchlorate, thiocyanate, and iodide using their ternary complexes with tris (1,10-phenanthroline) iron(II) chelate. Forensic Toxicology, 査読有, 30 巻, 2012, 156-161, DOI 10.1007/s11419-012-0140-y
- ⑥ Kayoko Minakata, Itaru Yamagishi, et al., Simultaneous determination of coinage metals, copper, silver, and gold in tissues using electrospray ionization tandem mass spectrometry. Forensic Toxicology 査読有, 30 巻, 2012, 149-155, DOI 10.1007/s11419-012-0134-9
- ⑦ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al. A rapid and decisive determination of thiocyanate in blood by electrospray ionization tandem mass spectrometry, Forensic Toxicology, 査読有, 30 巻, 2012, 45-50, DOI 10.1007/s11419-011-0124-3
- ⑧ Kayoko Minakata, Hideki Nozawa, et al. Determination of cyanide in blood by electrospray ionization tandem mass spectrometry after direct injection of dicyanogold, Analytical Bioanalytical Chemistry, 査読有, 400 巻, 2011, 1945-1951, DOI 10.1007/s00216-011-4824-7
- ⑨ Sanae Kanno, Kanako Watanabe, Itaru Yamagishi, Seishiro Hirano, Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, Osamu Suzuki, Simultaneous analysis of cardiac glycosides in blood and urine by thermoresponsive LC-MS-MS. Analytical Bioanalytical Chemistry, 査読有, 399 巻, 2011, 1141-1149, DOI 10.1007/s00216-010-4405-1

[学会発表] (計 14 件)

(1) 国際学会 (計 7 件)

- ① Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, et al., Determination of azide in gastric fluid and urine by flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic

- Toxicologists, June 3-8, 2012, Hamamatsu, Japan
- ② Koutaro Hasegawa, Amin Wurita, Kunio Gonmori, Hideki Nozawa, Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata, Osamu Suzuki, Kanako Watanabe, A sensitive and fully automated method for GC-MS analysis of volatile organic compounds in whole blood using large volumes of headspace vapor. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, June 3-8, 2012, Hamamatsu, Japan
- ③ Kunio Gonmori, Koutaro Hasegawa, Hiroki Fujita, Yoshito Kamijo, Hideki Nozawa, Itaru Yamagishi, Kayoko Minakata, Kanako Watanabe, Osamu Suzuki, Analysis of ibotenic acid and muscimol in *Amanita* mushrooms by hydrophilic interaction LC-MS-MS with solid-phase extraction. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists, June 3-8, 2012, Hamamatsu, Japan
- ④ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, et al., Determination of blood cyanide in several poisoning cases. 2011 Joint SOFT-TIAFT International Conference & Expo on Forensic and Analytical Toxicology. September 25-30, 2011, San Francisco, USA
- ⑤ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, et al., Electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of monomethylarsonic and dimethylarsinic acid after adduct formation with citric acid. 48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. August 29–September 2, 2010, Bonn, Germany
- ⑥ Walid Ahmed, Kunio Gonmori, Masako Suzuki, Hideki Nozawa, Itaru Yamagishi, Sanae Kanno, Koutaro Hasegawa, Kayoko Minakata, et al., Simultaneous analysis of alpha-amanitin, beta-amanitin and phalloidin in toxic mushrooms by liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. 48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. August 29–September 2, 2010, Bonn, Germany
- ⑦ Kayoko Minakata, Kunio Gonmori, et al., ESI-MS-MS Determination of cyanide in gastric content and urine. 10th Indo-Pacific Congress on Legal Medicine and Forensic Science, October 25-30, 2010, New Delhi, India

(2) 国内学会 (計 7 件)

- ① 南方かよ子, 鈴木雅子、他 7 名、MALDI-TOF-MS を用いた組織中の金、白金の定量、第 37 回日本医用マススペクトル学会年会、2012 年 10 月 25-26 日、名古屋
- ② 南方かよ子, 権守邦夫、他 5 名、種々の中毒症例における血液中のシアン物の定量、日本法中毒学会第 30 年会、2011 年 6 月 10-11

日、長崎

③ 南方かよ子、野澤秀樹、他 6 名、ESI-MS-MS による胃内容・尿中アジ化物イオンの迅速・高感度定量法、第 36 回日本医用マスペクトル学会年会、2011 年 9 月 15-16 日、大阪

④ 渡部加奈子、長谷川弘太郎、山岸格、野秀樹、権守邦夫、南方かよ子、鈴木修、アスパラギン酸カリウムを静脈内投与して死亡した心中事例、日本法中毒学会第 29 年会、2010 年 7 月 23-24 日、東京

⑤ 南方かよ子、権守邦夫、他 6 名、胃内容・尿中シアン錯体化合物の ESI-MS-MS による高感度・迅速定量法、日本法中毒学会第 29 年会、2010 年 7 月 23-24 日、東京

⑥ 菅野さな枝、渡部加奈子、山岸格、平野靖史郎、南方かよ子、他 2 名、温度応答性カラムを用いた LC-MS-MS による強心配糖体類の分析、第 35 回日本医用マスペクトル学会年会、2010 年 9 月 9-10 日、名古屋

⑦ 南方かよ子、鈴木雅子、他 7 名、ESI-MS-MS による血中シアンの迅速・高感度定量法、第 35 回日本医用マスペクトル学会年会、2010 年 9 月 9-10 日、名古屋

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

発表した 9 件の雑誌論文は浜松医科大学
学術雑誌リポジトリにて公開されている。

<http://hikumano.hama-med.ac.jp/dspace/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南方 かよ子 (MINAKATA KAYOKO)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70115509

(2) 研究分担者 無

(3) 連携研究者 無