

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659302

研究課題名(和文)ヒ素化合物の形態別抽出による新規系統的GC/MS分析法の確立

研究課題名(英文)New chemical form separated detection method of arsenics in human urine by GC/MS

研究代表者

長尾 正崇 (Nagao, Masataka)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：80227991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GC/MSによる、尿中ヒ素化合物(ヒ酸、亜ヒ酸、メチルアルシン酸)の同定・定量分析に至るまでのハイスループット分析法の開発を目的に、誘導体化剤や還元条件、抽出条件の最適化を行った。その結果、尿中の3価ヒ素を2,3-ジチオ-1-プロパノールで抽出、次に5価ヒ素を3価ヒ素に還元して3価ヒ素と同様に抽出することで、ヒ素の化学形態別抽出が可能となった。尿中ヒ素の検出下限は1 ng/mL (S/N > 3)、検量線の範囲は2.0～200 ng/mLで良好な直線性が得られた ($r > 0.996$)。尿中からの回収率は91.9～106.5%で、ばらつきも2.95～13.4%と再現性も確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the combination of a derivatization of trivalent arsenic compounds by 2,3-dithio-1-propanol and a reduction of pentavalent arsenic compounds (arsenate and methylarsenate) were accomplished to carry out the analysis of arsenic compounds in urine as a new chemical form separated detection method. The arsenic derivatives obtained using BAL were extracted in a stepwise manner using a monolithic spin column and analyzed by GC-MS. A linear curve was observed for concentrations of arsenic compounds of 2.0 to 200 ng/mL, where the correlation coefficients of calibration curves were greater than 0.996 (for a signal-to-noise (S/N) ratio >10). The detection limits were 1 ng/mL (S/N > 3). Recoveries of the targets in urine were in the range 91.9-106.5%, and RSDs of the intra- and interday assay for urine samples containing 5, 50, and 150 ng/mL of arsenic compounds varied between 2.95 and 13.4%.

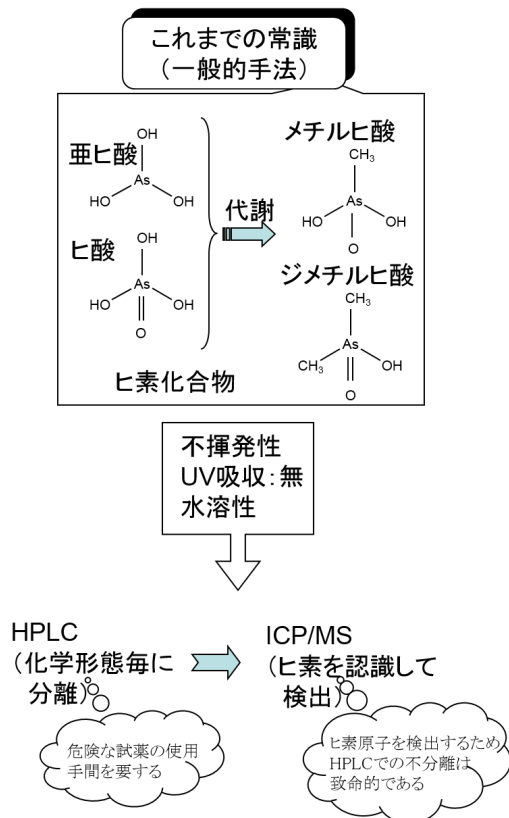
研究分野：中毒学

キーワード：産業衛生 中毒 分析

1. 研究開始当初の背景

亜ヒ酸を含む砒石は日本では古くから「銀の毒」などと呼ばれ殺鼠剤などに用いられていたが、森永ヒ素ミルク中毒事件(1955年)や和歌山毒物カレー事件(1998年)でも有名である。ヒ素化合物は梅毒治療薬(サルバルサン)、歯科治療の歯髄失活剤(ネオアルゼン)などの医療用に使用されていたが、現在でも半導体製造プロセスのハイテク産業においてヒ素化合物が汎用されている。また最近、亜ヒ酸は急性前骨髄球性白血病(APL)に対して高い有効性を示すことが見いだされ、アメリカやヨーロッパにおいて医薬品として承認された。日本でも2004年に亜ヒ酸製剤(トリセノックス)が医薬品として厚生労働省から承認され、限定的であるが医薬品としての流通が認められている。

ヒ素およびヒ素化合物には発癌性のあることが警告されており、単体ヒ素およびほとんどのヒ素化合物は、人体に非常に有害であるため、「労働安全衛生規則等の一部を改正する省令」(平成20年厚生労働省令第158号、平成20年11月12日公布)において、尿中の砒素化合物(砒酸、亜砒酸及びメチルアルソン酸に限る)の測定が義務付けられ、再現性の高い分析法の確立が急務とされている。現在、ヒ素化合物の化学形態分析は、高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ/質量分析計にて実施されている。その前処理



は、硝酸-硫酸や硝酸-過塩素酸-硫酸などの強力な混酸で有機物を分解、処理中の気散など、危険を伴うとともに再現性の低下が懸念されている。また、基本的に高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ/質量分析計は、

ヒ素原子を認識して検出するため、前段階の高速液体クロマトグラフにて化学形態毎に完全分離しなければならないが、分離条件次第では無機ヒ素と重複するために見かけ上、無機ヒ素濃度が高くなり、施設間誤差の大きいことを経験している。

化学構造を反映した情報収集にはガスクロマトグラフ/質量分析計あるいは高速液体クロマトグラフ/質量分析計が優れている。しかし、「無機化合物はガスクロマトグラフで分析できない」との固定観念より、詳細な検討すらなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、作業労働者の健康診断にも活用できるような簡便で低コストな尿中ヒ酸、亜ヒ酸、メチルアルソン酸の化学形態別抽出法を構築し、ガスクロマトグラフ/質量分析計を活用した新規系統的分析法の確立を行い、微量採取試料からの分析にも対応した施設間誤差の少ない方法を確立することを目的とする。

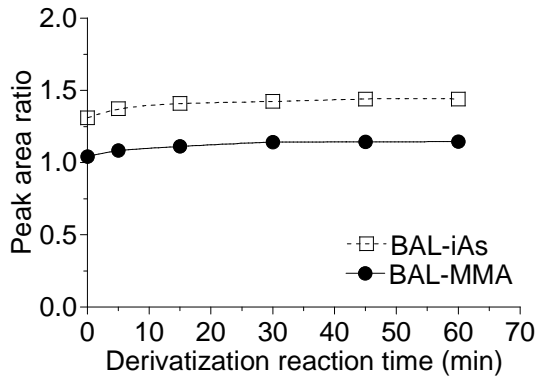
3. 研究の方法

本研究では、(1)熱安定性の優れた誘導体化剤の選択、(2)ヒ素化合物との複合体の構造解析、(3)還元条件の検討、(4)抽出条件の検討、(5)系統的化学形態別抽出法の検討、(6)生体試料中ヒ素分析のバリデーションデータの収集、(7)施設間誤差を検討する。研究開始時の背景の項でも述べたが、一般にヒトの体内に入ったヒ素化合物は無機ヒ素から有機ヒ素へと代謝される。例えば、3価ヒ素は5価ヒ素へ、さらにメチルアルソン酸やジメチルアルソン酸へと代謝が進み、尿などとして対外へ排泄される。しかし、ジメチルアルソン酸は、アルセノ糖などの食餌由来成分からの代謝でも生成することが知られており、無機ヒ素暴露の指標としては不向きであるとされている。それ故、本研究での対象とするヒ素化合物は、食餌の影響を受け難い、3種類(亜ヒ酸、ヒ酸、メチルヒ酸(メチルアルソン酸))とする。

4. 研究成果

(1)熱安定性の優れた誘導体化剤の選択
誘導体化剤として、チオグリコール酸メチル、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、2,3-ジチオ-1-プロパンジオールなどのSH剤を検討した結果、ガスクロマトグラフ/質量分析計での検出には、2,3-ジチオ-1-プロパンジオールが適していた。

2,3-ジチオ-1-プロパンジオールとヒ素化合物の反応に要する時間を検討したところ、時間経過とともに複合体の生成量は増加し、30分以降は一定となった。この結果より、2,3-ジチオ-1-プロパンジオールとヒ素化合物の反応に要する最適時間は30分とした。

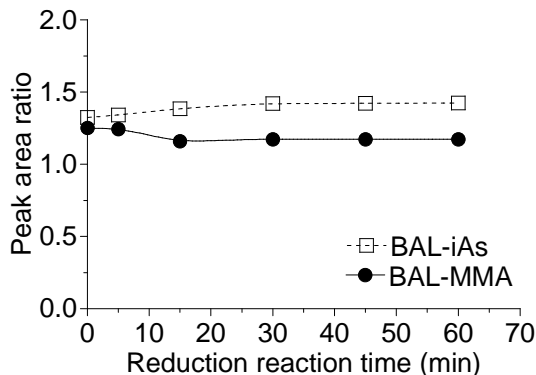


(2) ヒ素化合物との複合体の構造解析

上記の検討で適していた2,3-ジチオ-1-プロパンジオールとの誘導体の質量スペクトルが既報と異なっていたことから、誘導体を単離してNMRなどで構造推定を行った。その結果、これまではヒ素化合物と2,3-ジチオ-1-プロパンジオールとの反応生成物は1,3-dithia-2-arsacyclopentaneの5員環構造をとるとされていたが、本研究で得られた生成物は1,3-dithia-2-arsacyclohexaneの6員環構造であることが示唆された。1,3-ジチオ-2-プロパンジオールとの反応によっても同じ生成物の得られることが判明したが、詳細な反応機構の特定には至らなかった。

(3) 還元条件の検討

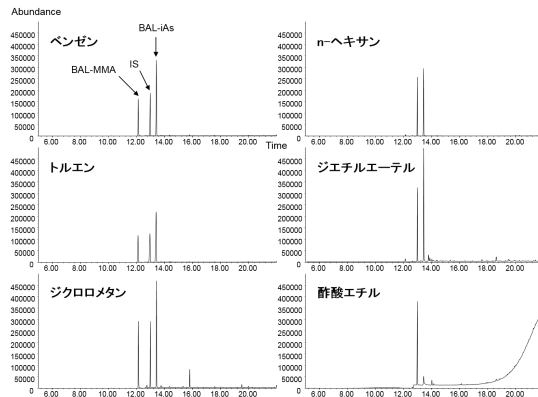
ヨウ化カリウムなどの無機系還元剤、アスコルビン酸などの有機系還元剤を中心に検討を行ったが、ヒ酸、メチルアルソン酸などの5価ヒ素を3価に還元するには、塩化スズ+塩酸とヨウ化カリウムを溶液で添加する方法が適しており、操作上も簡便であり実用であった。塩化スズ+塩酸とヨウ化カリウムを添加後、ヒ酸、メチルアルソン酸などの5価ヒ素が3価に還元される時間を検討した結果、時間経過とともに3価ヒ素の生成量は増加し、30分以降は一定となった。この結果より、塩化スズ+塩酸とヨウ化カリウムでの還元に要する最適時間は30分とした。



(4) 抽出条件の検討

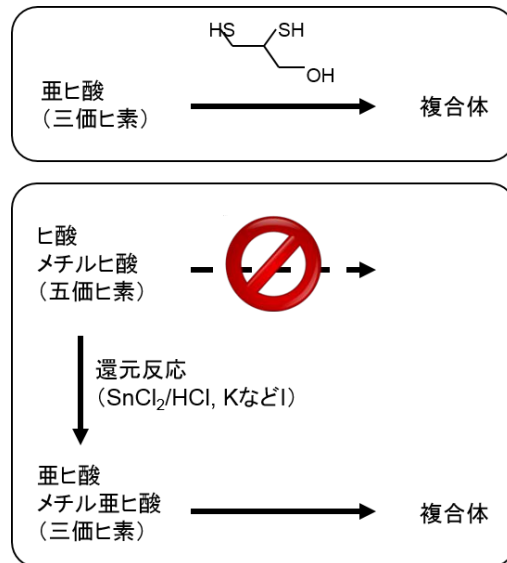
ヘキサン、酢酸エチルなどの一般に使用される有機系溶剤を中心に検討した結果、ベンゼン、トルエン、塩化メチレンで良好な結果が得られた。溶剤の毒性や分取操作の簡便性を考慮した結果、抽出溶剤は塩化メチレ

ンとした。



(5) 系統的化学形態別抽出法の検討

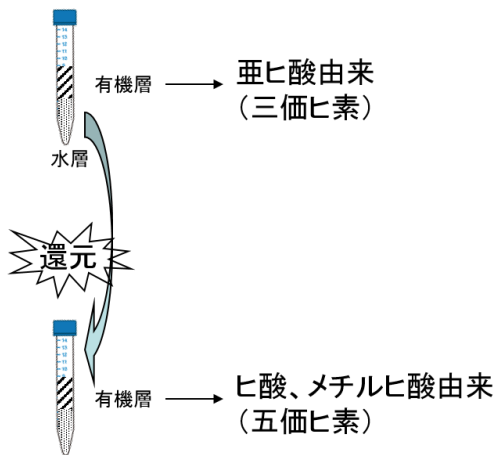
亜ヒ酸などの3価ヒ素は、2,3-ジチオ-1-プロパンジオールと反応させて塩化メチレンで抽出することが可能である。しかし、ヒ酸、メチルアルソン酸などの5価ヒ素は2,3-ジチオ-1-プロパンジオールと反応させて塩化メチレンで抽出することが不可能であった。



これらの挙動を考慮すると、まず、2,3-ジチオ-1-プロパンジオールと反応させて3価ヒ素を塩化メチレンで抽出する。次に抽出後の試料に塩化スズ+塩酸とヨウ化カリウムを加えて5価ヒ素を3価ヒ素にすると、5価ヒ素に相当分が2,3-ジチオ-1-プロパンジオールと反応させて塩化メチレンで抽出することが可能であり、結果として、形態別のヒ素の抽出が可能となった。

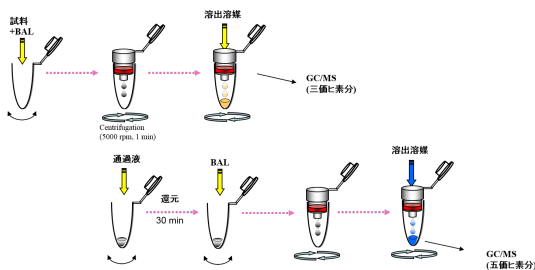
三価ヒ素の複合体は
有機溶剤抽出が可能

抽出と還元を組み合わせることで
形態を反映した分析が可能?



(6) 固相抽出法ならびに少量化の検討

使用溶媒量および検査試料の少量化を目的に MonoSpin によるスケールダウンを検討した。種々の固相を検討したが、C18 が適していた。基本的な手法は、上記で検討した液液抽出法の流れを踏襲した。その結果、0.5mL の尿試料を出発として 1ng/ml まで検出することが可能となった。



(7) 生体試料中ヒ素分析のバリデーションデータの収集

上記の MonoSpin 法を用いてバリデーションデータを取得した。尿中の各ヒ素化合物の回収率は 91.9 ~ 106.5% であり、2 ~ 200ng/ml の範囲で良好な直線性が認められた ($r > 0.996$)。また、尿に各ヒ素を 5, 50, 150 ng/mL で添加した際の繰り返し変動を検討した結果、2.95 ~ 13.4% となり、再現性の高い結果が認められた。

(8) 施設間誤差を検討

各ヒ素濃度が規格化された (既に定量値が値付けされた) 尿 (ClinChek, RECIPE) を使用して、本法で検証した結果、精度良く規格値内に納まることが確認された。また、

高速液体クロマトグラフ-誘導結合プラズマ/質量分析計との検査値を比較したところ、無機ヒ素 (亜ヒ酸、ヒ酸) と有機ヒ素 (メチルアルソン酸) とに分けて相関性を確認した結果、良好な相関性が認められた。

本法は、これまで実施されていた煩雑で莫大なランニングコストを要していた ICP/MS に取って代わることが可能となり、迅速かつ簡便に、多くの検査機関にて検査が可能となる。特に ICP/MS を装備できない東南アジアなどのヒ素汚染が広まっている開発途上国での健康診断には不可欠な技術になると期待される。また、健康診断のみならず、上水道や環境水、野菜食肉中ヒ素分析にも応用可能であり、環境分野や食品分野への波及効果も期待できる。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 正宗 (NAGAO MASATAKA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 80227991