

micro LC/MS/MS による高感度自然毒一斉スクリーニング法の構築

○瀧健太郎^{A)}

^{A)} 医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

自然毒を含む動植物の誤飲食による中毒事故は毎年発生しており，その中には致死的な事例も多い．これら自然毒の成分分析には，高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）が多用されており，非常に有力な分析手法である．今回，LC/MS/MS を用いた自然毒の一斉スクリーニング法の構築を行うと共に，micro LC による更なる高感度分析の検討を行ったので報告する．

1 緒言

一部の動・植物には，毒性化合物（自然毒）を有するものが知られている．これらの自然毒を含む動植物の誤飲食によって急性中毒事案が発生した場合，迅速な原因物質の特定が不可欠である．よって，自然毒を一斉検出できるスクリーニング法の構築が求められているが，自然毒の化学的性質や物性は多様であることから，一斉スクリーニング法の構築は非常に難しい．これまでに LC/Q-TOFMS を用いた自然毒の分析が行われてきたが，より高感度な一斉分析法を構築するために，三連四重極型質量分析計（QqQMS）を用いた自然毒一斉分析法の構築を検討した．特に QqQMS では Selected Reaction Monitoring（SRM）モードにてターゲット分子を高選択的かつ高感度に検出することが可能であり，薬毒物の定量分析に威力を発揮する．さらに，フロント部にマイクロフロー LC（micro LC）を用いることで，conventional LC よりも，より高感度な分析が可能になることが期待できる．そこで本研究では，micro LC および QqQMS を用いて，51 種類の自然毒成分の高感度一斉スクリーニング法の構築を行った．特に，conventional LC と micro LC における感度の差異についても比較・検討した．

2 実験方法

2.1 試料

分析対象物質として，キノコ由来成分（amanitin, muscarine など），魚介類由来成分（tetrodotoxin, okadaic acid など），植物由来成分（aconitine, atropine など），カビ毒（aflatoxin B1, aflatoxin G1 など）から 51 種類の成分を選択し，全て市販標準品を使用した（表 1）．

表 1. Target compounds

No.	Compound Name	Source	M.W.
1	Picrotin	<i>Anamirta cocculus</i>	310.1
2	Colchicine	イヌサフラン、ユリグルマ	399.2
3	Bufalin	カエル毒	386.2
4	Aflatoxin B1	カビ毒	312.1
5	Aflatoxin B2	カビ毒	314.1

6	Aflatoxin G1	カビ毒	328.1
7	Aflatoxin G2	カビ毒	330.1
8	Oleandrin	キョウチクトウ	576.3
9	Digoxin	ケジギタリス	780.4
10	α -Solanine	ジャガイモ	867.5
11	α -Chaconine	ジャガイモ	851.5
12	Lycorine	スイセン等	287.1
13	Cinobufagin	センソ 強心性ステロイド	442.2
14	Resibufogenin	センソ 強心性ステロイド	384.2
15	α -Amanitine	タマゴテングタケ等	918.4
16	β -Amanitine	タマゴテングタケ等	919.3
17	γ -Amanitine	タマゴテングタケ等	902.4
18	Phalloidine	タマゴテングタケ等	788.3
19	Atropine	チョウセンアサガオ等	289.2
20	Scopolamine	チョウセンアサガオ等	303.1
21	Tubocurarine	ツヅラフジ科コンドデンドロン属	609.3
22	Muscarine	テングタケ等	174.1
23	Ibotenic acid	テングタケ等	158.0
24	14-Anisoxyaconine	トリカブト	633.3
25	Aconitine	トリカブト	645.3
26	Aconine	トリカブト	499.3
27	Jesaconitine	トリカブト	675.3
28	Hypaconitine	トリカブト	615.3
29	Benzoylaconine	トリカブト	603.3
30	Benzoylmesaconine	トリカブト	589.3
31	Mesaconitine	トリカブト	631.3
32	Galantamine	ヒガンバナ	287.2
33	Tetrodotoxin	フグ	319.1
34	Cymarine	フクジュソウ	548.3
35	Berberine	ベンジルイソキノリンアルカロイド	336.1
36	Strychnine	マチン科マチン	334.2
37	Okadaic acid	下痢性貝毒	804.5
38	Convallatoxin	スズラン	550.3
39	Dinophysistoxin-1	下痢性貝毒	818.5
40	Chinchonidine	キナ属植物	294.2
41	Quinine	キナ属植物	324.2
42	Coniine	毒ニンジン	127.1
43	Dioscin	ヤマイモ科カエデドコロ	868.5
44	Diosgenin	ヤマイモ科カエデドコロ	414.3
45	Domoic acid	記憶喪失性貝毒	311.1
46	Amigdaline	アンズ種子等	457.2
47	Cucurbitacin E	ユウガオ	556.3
48	Veratramine	バイケイソウ	409.3
49	Cyclopamine	バイケイソウ	411.3
50	Jervine	バイケイソウ	425.3
51	Bufotenine	カエル毒	204.1

2.2 装置

質量分析計に AB Sciex 製 QTRAP6500 system を用いた. LC システムには Eksigent 製 microLC 200 および島津製作所製 Prominence を用いた.

2.3 分析方法

分離カラムには何れも ODS カラムを使用し, 試料注入量は 5 μ L とした. Flow injection analysis により, 各成分の SRM transition を最適化した後, 試料濃度を 1 ng/mL あるいは 0.1 ng/mL に調整し, LC 分離条件及び装置感度の比較等を行った (表 2).

表 2. HPLC conditions

	conventional LC	micro LC
HPLC solvent	A: 10mM ammonium formate, 5% MeOH	
	B: 10mM ammonium formate, 95% MeOH	
Column temperature	40°C	
Column	3 μ m, 1.5x150mm	2.7 μ m, 0.5x50mm
Flow speed	0.1 mL/min	20 μ L/min
Gradient program	B 0-100% [15 min], hold 5 min	B 0-100% [5 min], hold 2 min

3 結果と考察

micro LC を用いて対象成分を分析したところ, 何れの成分も 1 ng/mL の濃度においてシャープなピークを得ることができた. conventional LC と micro LC について各ピークの peak height を比較したところ, micro LC の方が相対的に peak height が高く (図 1), 成分によっては 1 桁ほど peak height が高くなる傾向も観察された. micro LC と QqQMS を組み合わせた場合には, 0.1 ng/mL 以下の濃度であっても検出可能な成分があったことから, micro LC による高感度化が達成できた. さらに今後, 血液などの生体試料からの適切な抽出法と本法を組み合わせることで, 本スクリーニング法は生体試料中自然毒成分の高感度一斉検出が可能となり, 法中毒学あるいは救命救急分野において活用できることが期待される.

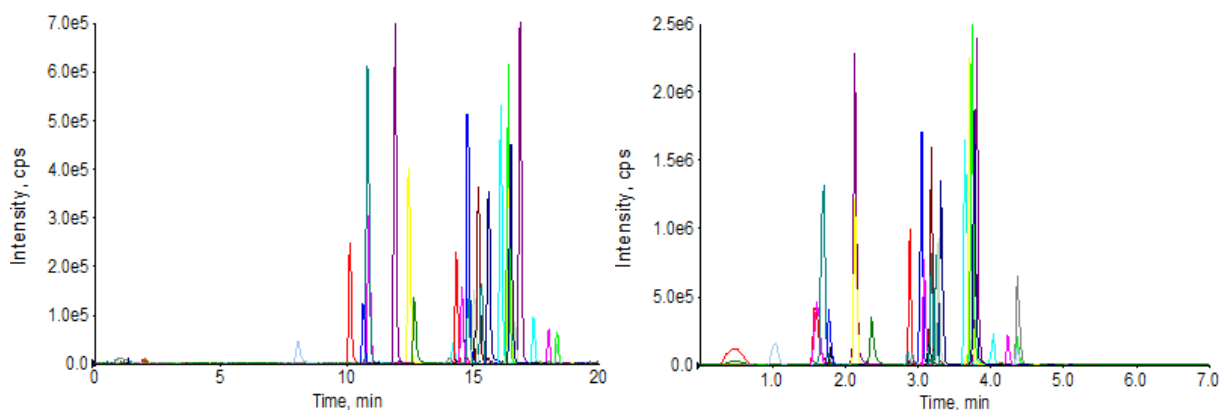


図 1. LC/MS/MS による自然毒 51 成分のクロマトグラム. conventional LC (左), micro LC (右).