

学 位 論 文 要 旨

氏 名 佐々木 千寿子



論 文 題 目

「ペンタフルオロフェニルカラムを用いたヒト血清中
リコリンおよびガラントミンの高速液体クロマトグラフ
タンデム質量分析法の開発」

指 導 教 授 承 認 印

佐藤 文子



ペンタフルオロフェニルカラムを用いたヒト血清中リコリンおよび ガラタミンの高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法の開発

氏名 佐々木 千寿子

【目的】

リコリンおよびガラタミンは、ヒガンバナ科植物に含まれるアルカロイドであり、摂取すると悪心、嘔吐、下痢、発熱、昏睡などの中毒症状をひき起こす化合物である。ヒガンバナ科植物の一つであるスイセンは、葉の形状がニラなどの野菜と類似しているため、誤食による中毒事例が発生している。摂取の証明には患者試料からリコリンおよびガラタミンを検出することが必須であるが、その分析法は確立されておらず、ヒト試料を材料とした定性定量分析法の開発が必要である。

自然毒誤食の軽症例では、毒物の血中濃度は低いことが予測されるため、高感度分析法が求められる。本研究では軽症例から致死例まで対応可能な血清中リコリンおよびガラタミンの高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた定性定量法の開発を目的とした。薬毒物分析で用いる分析カラムは、疎水性相互作用により化合物を分離するオクタデシルシリル (ODS) カラムを用いることが一般的であるが、アルカロイドなどの極性化合物では保持が弱くピークテーリングを生じやすい。リコリンとガラタミンを ODS カラムで測定したところピーク割れが生じ定量不能であった。そこで極性芳香族化合物を保持する特徴をもつペンタフルオロフェニル (PFP) カラムを用いた分析法を検証した。

【方法】

[前処理]

5 mL 容バイアルに血清 0.2 mL、超純水 0.4 mL、内部標準物質 (IS) として 200 ng/mL ガラタミン- d_6 10 μ L および 4 mm ステンレスビーズ 1 個を容れ混和後、アセトニトリル 0.6 mL を加えボルテックスミキサーで混和した。QuEChERS AOAC パウダー (6.0 g 硫酸マグネシウムおよび 1.5 g 酢酸ナトリウム含有) 0.2 g を加え攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を試験管に採り、窒素気流下 60°C で溶媒を乾固した。残渣にメタノール 100 μ L を添加し再溶解し、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清 1 μ L を LC/MS/MS に注入した。

[LC/MS/MS 条件]

装置は 1290 - 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies) を使用した。カラムは CAPCELL CORE PFP (2.1 mm I.D. \times 100 mm, 粒子径 2.7 μ m, 大阪ソーダ社) を用いた。

カラム温度は 40℃に設定した。移動相は、A 液に 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1%ギ酸水溶液、B 液にアセトニトリルを用いた。グラジエントプログラムは 10%B・(6 min)・40%B・(4 min)・100%B とし、その後すぐに 10%B に戻して次の測定まで 6 分間平衡化を行った。流速は 0.2 mL/min とした。

【結果】

リコリン、ガラントミンおよび IS のアセトニトリル溶液を測定したところ、保持時間はそれぞれ 3.1 分、3.9 分、3.9 分に検出され、いずれも良好なピーク形状が得られた。リコリンおよびガラントミン標準物質をブランク血清に添加し、前処理を行ったサンプルを MRM モードで測定したところ、いずれも夾雑ピークは見られなかった。

リコリン、ガラントミンともに検出下限値は 0.01 ng/mL、定量下限値は 0.05 ng/mL であった。検量線の決定係数はいずれも 0.999 以上であった。マトリックス効果はリコリンで 94.3~98.4%、ガラントミンで 87.8~91.1%、回収率はリコリンで 101.9~112.7%、ガラントミンで 95.6~107.1%であった。精度の日内日差変動はリコリンで 0.5~2.2%、ガラントミンで 0.4~2.0%であった。

【考察】

前処理法は、野菜等に含まれる残留農薬の抽出を目的に開発された QuEChERS AOAC 法を応用した。QuEChERS AOAC 法は、硫酸マグネシウムによる脱水と酢酸ナトリウムによる塩析作用を利用した液-液抽出である第一段階と、分散固相抽出を用いた第二段階から成る。本法は第一段階のみを用いた簡便かつ短時間で抽出可能な前処理法である。マトリックス効果の結果より、イオンサプレッションやイオンエンハンスメントは観察されず、本法の血清前処理法は夾雑物を良好に除去していることが示唆された。回収率は良好であり簡便な操作で血清から効率よく抽出されたことが確認された。前処理において抽出液を濃縮することで検出感度を上昇させ、検出下限値で 0.01 ng/mL、定量下限値で 0.05ng/mL の低濃度の測定を実現し、スイセン中毒の軽症例にも対応可能となった。検量線の決定係数は 0.999 以上であり良好な直線性が得られた。日内日差変動は基準内であり安定した結果が得られ、定性定量検査として適合していることが確認された。

PFP カラムを用いたことにより、ODS カラムでは分離困難であったリコリンとガラントミンが良好に分離された。PFP カラムは疎水性相互作用に加え、 π - π 相互作用、双極子-双極子相互作用を有しており高極性塩基性化合物の保持に優れた分離挙動を発揮する。本研究で塩基性化合物であるリコリンとガラントミンの分析に適していることが確認されたことから、今まで ODS カラムで分離困難であった他のアルカロイドにも有用であることが期待され、今後アルカロイドの一斉分析法へ発展させる次第である。

【結論】

極性化合物の保持に優れた PFP カラムを用いることにより、リコリンとガラントミンを

良好に分離することに成功した。本研究によりヒト血清中リコリンおよびガラントミンの定性定量分析が可能となり、スイセン中毒の軽症から致死例に対応可能な分析法が確立された。