

Agilent 6430 による生体試料中 11 種アコニチン系アルカロイドの一斉分析



Key Words: アコニチン、トリカブト、LC/MS-MS、自然毒

＜要旨＞LC/MS-MS 法を用いて生体中アコニチン系アルカロイド 11 種類の高感度一斉分析法を検討しました。その結果、各アルカロイドの検出限界は **0.1ng/mL** 以下でした。また、この高感度一斉分析法をアコニチン系アルカロイド中毒患者の生体試料に適用することで今回確立した方法がアコニチン系アルカロイド中毒患者の診断に有効であることを実証しました。

1. はじめに

トリカブトはキンポウゲ科に属するトリカブト属の総称であり、約 30 種が自生しています。わが国ではドクセリ、ドクウツギと並んで日本三大有毒植物の一つとされています。また、トリカブトは附子、烏頭など生薬としても使用されていますが、そのまま使用することはなく修治と呼ばれる解毒処理を行ったものが使用されています。トリカブトの毒性成分はジテルペンアルカロイドであり、アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチンなどです。修治附子など弱毒化した加工附子はアコニチンなどのアルカロイドの C-8 位のアセチル基が加水分解されたベンゾイルアコニチン、ベンゾイルメサコニチン、ベンゾイルヒパコニチンなどに変化することで毒性が低下します。しかし、未処理の附子を含む漢方薬も多く使用され、煎じるなどの解毒処理が不十分なことによる中毒事故が発生しています。またトリカブトはシドケと呼ばれる山菜と似ており誤食による食中毒も春から初夏にかけて発生しています。そこで今回、トリカブトに存在する 11 種類のジテルペンアルカロイドの高感度分析法として LC/MS-MS を用いた分析法を紹介いたします。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1,2 に示した通りです。LC 条件はカラムに 1.8 μ m の微小粒子径の逆相系カラムを使用し、0.1%ギ酸+ギ酸アンモニウム緩衝液とアセトニトリルのグラジエントモードで測定しました。イオン化法には ESI を使用し、正イオンモードで測定しました。各アルカロイドの SRM 条件は表.2 に示した通りですがプリカーサーイオンには全てプロトン化分子を選択しました。

試料前処理は試料(0.5mL)をエタノール(10mL)で 1 時間振とう抽出、遠心後上清を窒素パージで蒸発乾固後 0.4mL の 10%エタノール水溶液で再溶解しました。こ

の抽出液は予めメタノール(1mL)と純水(1mL)でコンデューションングしたミニカラム(Focus)に負荷し、純水(1mL)で洗浄後、0.1%TFA/アセトニトリル(0.75mL)及び 0.2%アンモニア/アセトニトリル(0.75mL)で溶出し、溶出液は窒素パージで蒸発乾固後、初期移動相(0.5mL)で再溶解し、測定試料としました。

表.1 LC/MS-MS 条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Extend C18 RRHT(100mm,2.1mm,1.8 μ m)
Mobile phase	: A:0.1% HCOOH_4 +10mM HCOONH_4 , B:ACN 10%A/90%B---(50min)---100%A
Column temp	: 40 $^{\circ}\text{C}$
Sample volume	: 2 μ L
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6430 LC-MS
Ionization	: ESI(positive)
Drying gas	: 10L/min at 350 $^{\circ}\text{C}$
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

表.2 各アルカロイドの SRM 条件

No	化合物	プリカーサー	プロダクト	CE
1	Mesaconine	486	436	35
2	Aconine	500	450	40
3	Hypaconine	470	438	35
4	Benzoylmesaconine	590	105	55
5	Benzoylaconine	604	105	55
6	14-Anisoylaconine	634	135	50
7	Benzoylhypaconine	574	542	35
8	Mesaconitine	632	572	35
9	Hypaconitine	616	556	40
10	Aconitine	646	586	35
11	Jesaconitine	676	616	40

CE:コリジョンエネルギー(v)

3. 結果

図.1 に各アルカロイドの 0.1ng/mL 相当の SRM クロマトグラムを示しました。11 種全てのアルカロイドで S/N 比は 22~96 で、検出限界は 0.01~0.003ng/mL でした。



Agilent Technologies

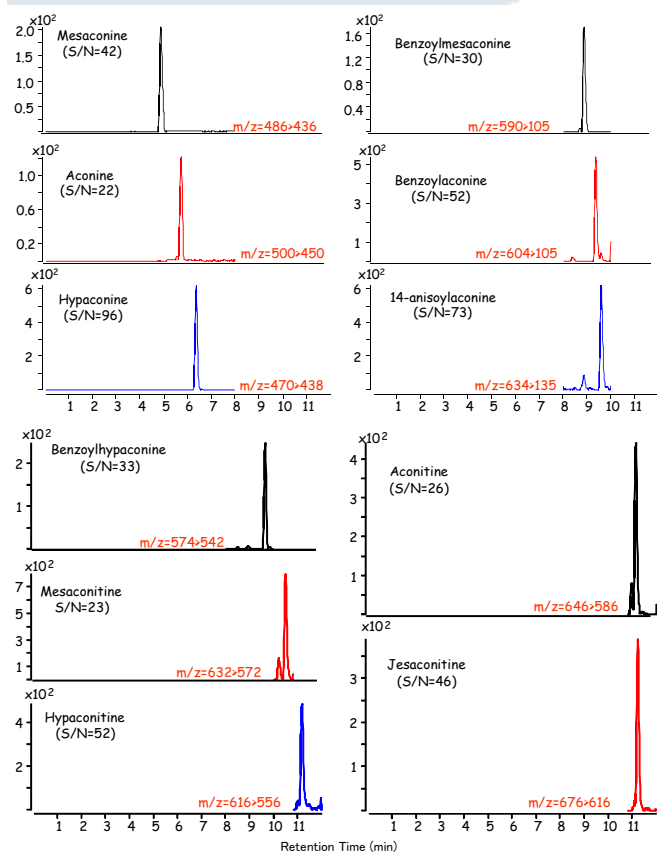


図.1 各アルカロイドの SRM クロマトグラム (0.1ng/mL)

各アルカロイドの検量線は図.2 に示しましたが、0.1~50ng/mL の範囲で全てのアルイアロイドで決定係数は 0.999 以上と直線性は良好でした。

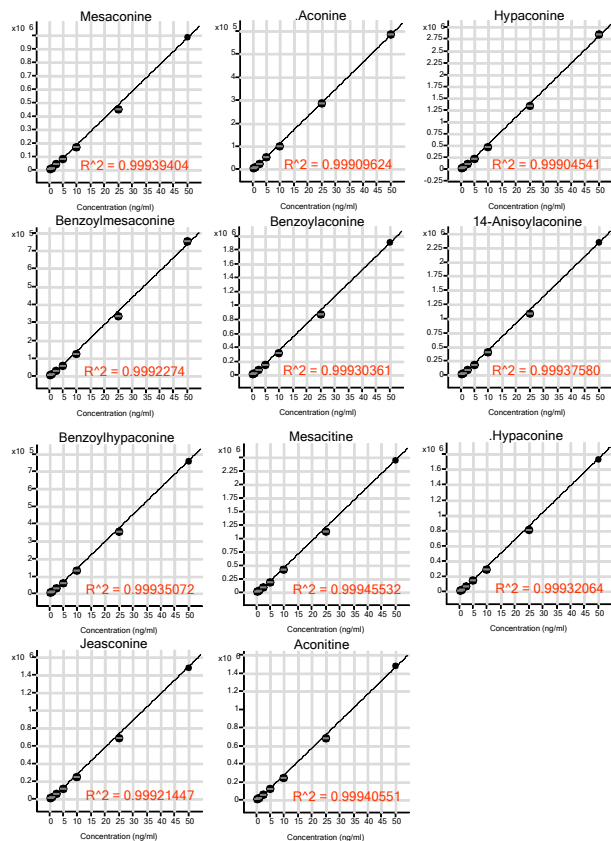


図.2 各アルカロイドの検量線

実試料に関しては附子を含む漢方薬及びその他薬物を服用し中毒を生じた患者の尿抽出液を分析しました。結果は図.3 に 11 種アルカロイドの SRM クロマトグラムを示しましたが、毒性の強いアコニチンやメサコニチンなどは検出されず C-8 位のアセチル基とベンゾイル基が加水分解された弱毒性のアコニン、メサコニン、ヒパコニンが検出されました。この結果は中毒原因が漢方薬中附子の不十分な処理によるものでないことが証明されました。

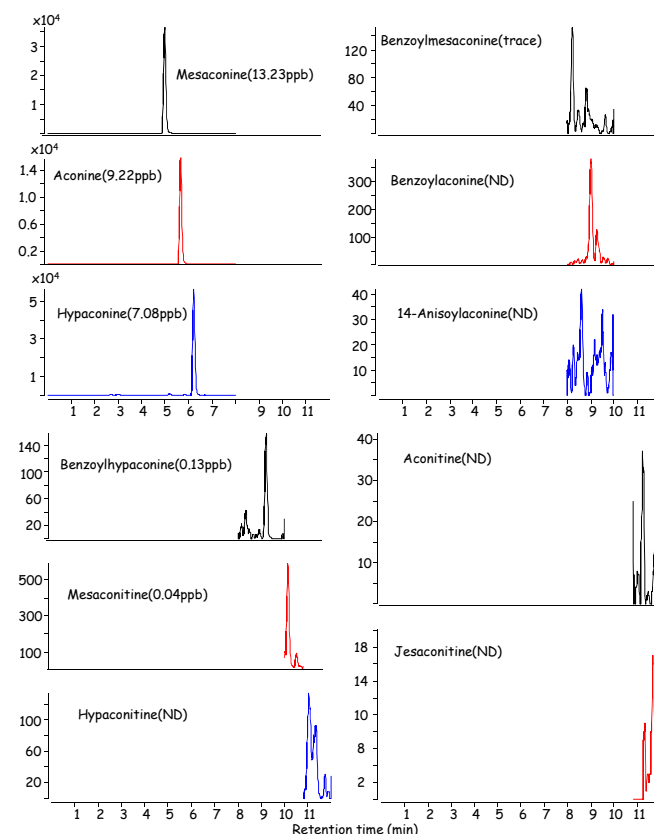


図.3 尿中各アルカロイドの SRM クロマトグラム

4.まとめ

今回、11 種アコニチン系アルカロイドの一斉分析法を開発し、生体試料中微量分析に適応しました。その結果生体中 11 種アコニチン系アルカロイド類を高感度迅速に測定することが可能となり、今回開発した固相ミニカルによる精製及び LC/MS-MS を用いた方法がアコニチン系アルカロイド類の中毒患者の診断に有効であることが実証されました。

【LCMS-201107TK-002】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp