

Application News

No. B109

探針エレクトロスプレーイオン化法

DPIIMS™-8060を用いた薬草中の発がん性物質の迅速スクリーニングと定量分析

ヒトの健康に重大な影響を及ぼす有害物質は、被害防止の観点から効果的で迅速なスクリーニング・定量化方法を設定することが必要です。植物などに含まれる有害物質は、LCやLC/MSによって分析されています。その際、カラムによる分離や夾雑成分の除去が必要です。そのため、前処理や分析に時間がかかり、有機溶剤類を大量に消費することもあります。

弊社が提供する超高速スクリーニングプラットフォームの一つである探針エレクトロスプレーイオン化法 (PESI) は、これらの問題を解決することができます。すでに麻薬、医薬品、殺虫剤、生体毒素および代謝物の解析で利用されています。

今回分析対象としたアリストロキア酸は、ウマノスズクサ属の植物などに含まれており、その植物も含めて発がん性物質に分類されています。本稿では、ウマノスズクサとウスバサイシンに含まれる4種類のアリストロキア酸とその代謝物のひとつであるアリストラクタムⅠの、DPIIMS-8060を用いた迅速スクリーニングと定量分析のための内部標準 (ナプロキセン) 法をご紹介します。

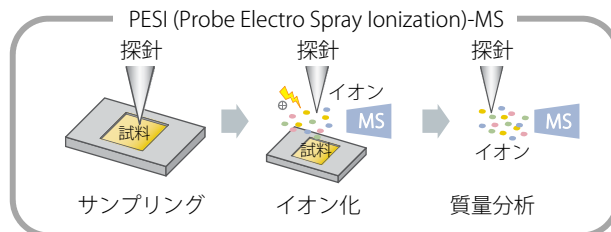
Z.Chen, K.Waki

■ DPIIMS-8060の特徴

DPIIMS-8060はトリプル四重極質量分析計 (LCMS™-8060) に探針エレクトロスプレーイオン化法 (PESI) によるイオン源を組み合わせた装置です (図1)。PESIのイオン源はLCMS-8045以降の質量分析計に直接接続できます。PESIは試料プレート上の試料に探針を刺し、探針表面に付着した試料に電圧をかけることで分子をイオン化する分析手法のため、移動相を必要としません (図2)。また、簡単な前処理で分離カラムを使用せず迅速に分析を行えます。



図1 DPIIMS™-8060の外観



探針



試料プレート

図2 探針エレクトロスプレーイオン化法の原理
試料プレート上の試料に探針を刺し、探針表面に付着した試料に電圧をかけることで分子をイオン化する。

■ 試料調製

試料調製のために、以下の2種類の溶液を調製しました。

- メタノール/水 (70/30, v/v)
- エタノール/水 (60/40, v/v) : 2 mMギ酸アンモニウム、10 ppbナプロキセン (内部標準) を含む

試料を図3の手順で調製しました。標的化合物の標準試料溶液10 µg/Lを表1と表2の条件で、20秒程度の超高速分析を実施した結果が図4です。

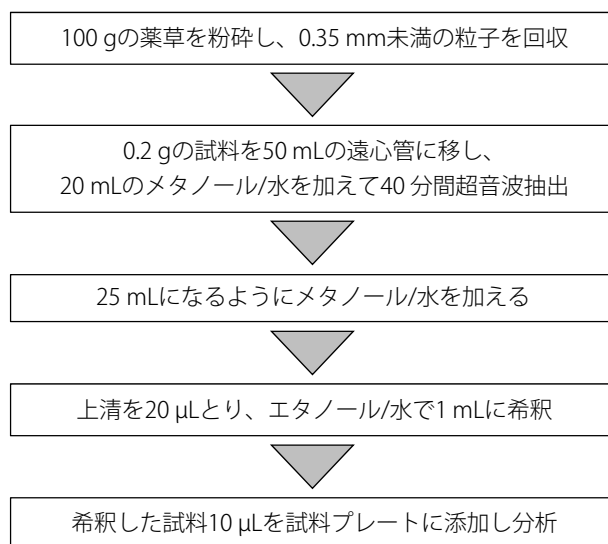


図3 試料調製のワークフロー

■ 検量線の直線性

表3に表1と表2の条件で分析した検量線の直線性を示します。検量線は0.05 ~50 µg/Lの範囲で作成しました。各成分とも寄与率R²=0.999以上と良好な直線性が得られました。

■ 再現性

表4に再現性の指標となる、標準品の測定値の相対標準偏差 (RSD (%), n=6) を示します。アリストロキア酸Cとアリストロキア酸Dの0.2 µg/Lの場合を除き、すべての化合物でRSDは15%以下でした。PESI法の試料の測定方法を考慮すると、再現性は許容範囲内と考えられます。

表1 測定条件

試料採取停止時間	: 50 msec
試料採取位置	: - 46.0 mm
イオン化停止時間	: 220 msec
ヒートブロック温度	: 30 °C
インターフェイス電圧	: 2.3 kV (+) / -3.0 kV (-)
探針クリーニング時間	: 0.05 min (+) / 0.05 min (-)
探針動作繰り返し速度	: 2.78 Hz
DL温度	: 250 °C

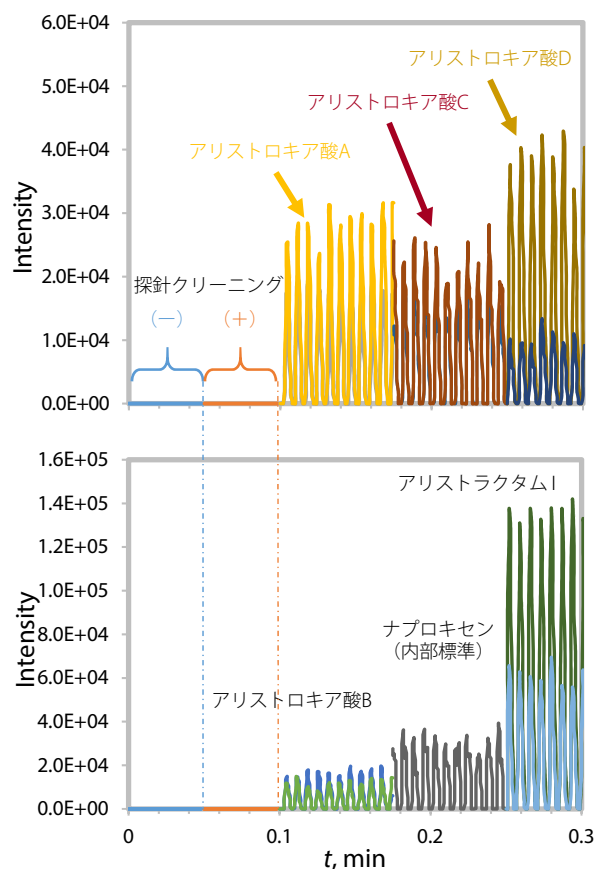


図4 標準品のMRMデータ

表2 MRM分析パラメーター

化合物名	m/z	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
アリストロキア酸A	359.05>296.15*	-25.0	-18.0	-22.0
	359.05>324.05	-25.0	-21.0	-20.0
アリストロキア酸B	329.05>268.15*	-12.0	-12.0	-10.0
	329.05>294.10	-13.0	-15.0	-15.0
アリストロキア酸C	345.00>284.05*	-24.0	-13.0	-14.0
	345.00>282.05	-26.0	-20.0	-32.0
アリストロキア酸D	375.00>312.10*	-14.0	-15.0	-24.0
	375.00>297.05	-14.0	-34.0	-22.0
アリストラクタムI	294.05>279.10*	-12.0	-27.0	-29.0
	294.05>251.05	-12.0	-35.0	-18.0
ナプロキセン	231.10>185.15*	-16.0	-15.0	-24.0
	231.10>170.15	-16.0	-26.0	-16.0

* 定量イオン

表3 検量線の直線性、範囲、検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)

化合物	検量線	R ²	線形範囲 (µg/L)	LOD	LOQ
アリストロキア酸A	Y = 0.843484X + 0.0184829	0.999	0.05-50	0.09	0.27
アリストロキア酸B	Y = 0.382409X + 0.0029026	0.999	1.0-50	0.66	1.99
アリストロキア酸C	Y = 0.833272X - 0.0366437	0.999	0.05-50	0.06	0.19
アリストロキア酸D	Y = 1.33628X - 0.0340039	0.999	0.05-50	0.14	0.41
アリストラクタムI	Y = 4.28566X - 0.0844784	0.999	0.05-50	0.04	0.13

■ 添加回収率

表5は正確さの指標となる、*Herba aristolochiae* と *Asarum sieboldii* の抽出液中の標的標準品の添加回収率を示したものです (n=4)。どちらの薬草も添加回収率は低濃度添加 (1.0 µg/L) の場合は85.5%から146%の間、高濃度添加 (20 µg/L) の場合は60.1%から151%の間でした。一般的にこの回収率は満足できるものです。*H. aristolochiae* のアリストラクタムⅠの低い回収率 (60%) は、ナプロキセンがカルボキシ基をもつのにに対し、アリストラクタムⅠはアミド構造を持つため、マトリックス効果により内部標準を正確に反映できないためだと推測されます。

■ 実試料の測定

図3の手法で *H. aristolochiae* および *A. sieboldii* 試料を調製し、アリストロキア酸とその代謝物を計測した際のデータが図5です。また、表6はアリストロキア酸A-DおよびアリストラクタムⅠの含有量を示しています。*H. aristolochiae* はアリストロキア酸D含量が高く、*A. sieboldii* ではアリストロキア酸DとアリストラクタムⅠの両方が高いことがわかりました。

表4 ピークエリアの再現性

化合物	濃度 (µg/L)	計測回数						平均 (µg/L)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
アリストロキア酸A	0.2	0.23	0.28	0.22	0.25	0.29	0.26	0.25	11.5%
	10	9.92	9.67	8.84	9.24	9.36	9.22	9.37	4.02%
	50	49.4	48.9	43.6	48	51.3	50.9	48.7	5.68%
アリストロキア酸B	1	1.46	1.35	1.19	1.32	1.35	1.38	1.34	6.59%
	10	8.23	9.83	7.8	8.61	9.46	9.43	8.89	9.01%
	50	50.7	50.5	44.3	50	52.6	51.5	50.0	5.81%
アリストロキア酸C	0.2	0.2	0.17	0.21	0.13	0.27	0.15	0.19	26.6%
	10	7.37	8.53	6.98	7.22	8.01	7.98	7.68	7.64%
	50	47.9	50.5	43.6	49.1	51.8	46.6	48.2	6.07%
アリストロキア酸D	0.2	0.12	0.16	0.24	0.21	0.17	0.14	0.17	26.7%
	10	7.58	8.34	7.35	8.28	8.44	8.83	8.14	6.87%
	50	49.3	50.5	45.6	50	53	45.3	48.9	6.10%
アリストラクタムⅠ	0.2	0.2	0.21	0.17	0.18	0.21	0.21	0.2	8.39%
	10	8.2	8.9	7.7	8.42	9.07	8.92	8.54	6.19%
	50	48.4	46.7	45.2	47.8	49.7	46.1	47.3	3.47%

表5 *H. aristolochiae* と *A. sieboldii* における添加回収率

添加 (µg/L)	植物名	化合物	添加回収率 (%)			
			1	2	3	4
1.0	<i>H. aristolochiae</i>	アリストロキア酸A	129	125	108	95.4
		アリストロキア酸B	109	134	85.7	120
		アリストロキア酸C	113	115	106	105
		アリストロキア酸D*	—	—	—	—
		アリストラクタムⅠ	112	101	85.5	101
		アリストロキア酸A	134	140	119	120
1.0	<i>A. sieboldii</i>	アリストロキア酸B	132	119	146	133
		アリストロキア酸C	93.6	101	93.5	101
		アリストロキア酸D*	—	—	—	—
		アリストラクタムⅠ	—	—	—	—
		アリストロキア酸A	74	87.4	71	79.8
		アリストロキア酸B	86.5	78.5	91.9	74.6
20.0	<i>H. aristolochiae</i>	アリストロキア酸C	85	88.1	80.4	81.6
		アリストロキア酸D	118	151	127	119
		アリストラクタムⅠ	65.4	60.1	65.6	60.5
		アリストロキア酸A	94.1	97.7	106	110
20.0	<i>A. sieboldii</i>	アリストロキア酸B	97.3	93.5	96.7	104
		アリストロキア酸C	97.8	101	94.4	104
		アリストロキア酸D	104	100	105	102
		アリストラクタムⅠ	86.0	72.5	87.9	99.0

* 未同定

■まとめ

本手法により、簡単な前処理かつ1試料当たり20秒程度で、葉草中のアristolochia酸とその代謝物であるアristolactamの含有量を知ることができました。この内部標準を用いた測定手法は、他の物質にも応用が可能です。さらに、PESIのイオン化原理はESIであるため、LC/MSのESIプローブでイオン化が可能なのはPESIでも計測できる可能性があります。加えて、簡単に当社製トリプル四重極型LCMSシリーズ（LCMS-8045以上のモデル）との切り替えが可能です。そのため、本アプリケーションニュースのように、LCMS-8060とDPIMS間でデータの比較を行ったり、当社製LCMSで作成した分析メソッドをカスタマイズしてDPIMSで分析を行うことも可能です。

これらのことから、有害物質の迅速なスクリーニング・定量が必要な場面において、DPIMSによる分析は有用な手法となることが期待されます。

表6 *H. aristolochiae* と *A. sieboldii* における標的化合物の含有量 (n=4)

植物名	化合物	平均 (μg/g)	RSD (%)
<i>H. aristolochiae</i>	アristolochia酸A	11.6	2.0%
	アristolochia酸B	8.17	9.4%
	アristolochia酸C	7.49	10.3%
	アristolochia酸D	90.4	4.8%
	アristolactam I	5.89	4.2%
<i>A. sieboldii</i>	アristolochia酸A	6.39	4.0%
	アristolochia酸B	6.35	9.5%
	アristolochia酸C	1.55	3.4%
	アristolochia酸D	36.5	4.3%
	アristolactam I	82.0	3.7%

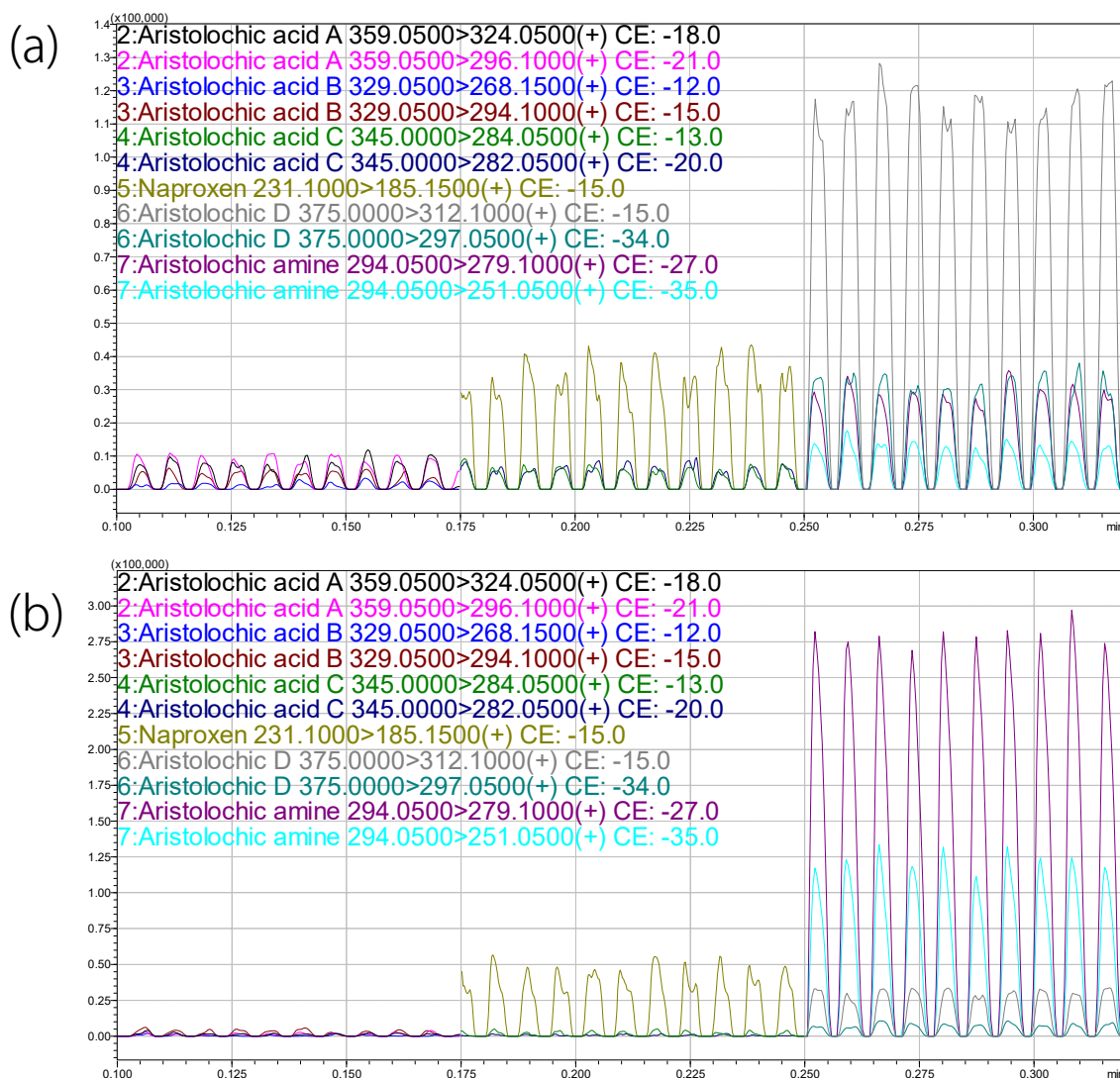


図5 実試料測定時のMRMデータ
(a): *A. sieboldii*, (b): *H. aristolochiae*

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。
DPIMSおよびLCMSは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年3月
島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。