

Agilent 6410 による大環状トリコテセン類の高感度分析



要旨> *Stachybotrys chartarum* の産生するかび毒の一種である大環状トリコテセン類 (Satratoxin G、Satratoxin H、Iso-satratoxin F、Roridin L2、Roridin E 及び Verrucarin E) の LC-MS/MS 法による高感度分析法を検討しました。その結果、イオン源に ESI 法、移動相に酢酸/酢酸アンモニウム及びメタノールによるグラジエント溶出で全ての大環状トリコテセン類の分離が可能であり、1ng/mL 以下の測定が可能でした。また、*Stachybotrys chartarum* 菌糸抽出液中で全ての Satratoxin 類及び Roridin L2 が検出されました。

Key Words: 大環状トリコテセン、*Stachybotrys chartarum*、かび毒、LC-MS/MS、MRM

1. はじめに

Stachybotrys chartarum は麦わらなどに繁殖する黒かびの一種であり古くから北欧諸国では家畜に疾患を引き起こすことから Stachybotriotoxicosis として恐れられていました。近年、このかびが洪水などの被害を受けた住居の壁紙、建材、ごみなどに繁殖し人への健康被害が懸念されています。このかびの細胞毒性の原因物質はかび毒の一種である大環状トリコテセン類 (MTRs) であり Satratoxin 類、Roridin 類、Verrucarin 類など多くの化合物が確認されています。従来これら化合物の測定には GC/MS 法や HPLC 法が使用されていましたが、GC/MS 法は誘導体化が必要であり、HPLC 法は定性能力に欠ける問題点があります。そこで三連四重極型質量分析計である Agilent 6410 LC-MS を用いた分析法について紹介します。

表.1 に示した MRM 条件としました。

表.1 大環状トリコテセン類の分析条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Eclipse Plus (150mm, 2.1mm, 3.5 μm)
Mobile phase	: A: MeOH, B: 0.1%CH ₃ COOH+10mMCH ₃ COONH ₄ , 30%A--(50min)--100%A
Column temp	: 40 C
Sample volume	: 20uL
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6410 LC-MS
Ionization	: ESI(Positive)
Drying gas	: 10L/min at 300°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

No	Name	Precursor	Product 1	Product 2	Collision 1	Collision 2	R.time	TS
1	Roridin L2	531.5	249.0	231.0	15	15	23.17	1
2	Satratoxin G	562.5	249.0	545.5	10	5	24.21	2
3	Satratoxin H	546.5	529.5	511.5	5	10	25.62	3
4	Iso-satratoxin F	560.5	249.0	543.5	10	5	27.75	4
5	Verrucarin A	520.5	249.0	457.0	10	5	28.23	4
6	Roridin A	550.5	249.0	85.0	10	20	29.48	5

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りですが、移動相にはメタノール及 0.1%酢酸/10mM 酢酸アンモニウムを用い、グラジエント溶出で分離の最適化を行いました。また MS 条件はイオン源に ESI を用いた正イオンモードで測定しました。

3. 結果及び考察

3.1. MRT 標準品の測定

図.1 には各化合物のプロダクトイオンスキャンモードによる MS/MS スペクトルを示しましたが、プリカーサーイオンにはプロトン化分子或いはアンモニウム付加イオンを選択しました。観察されたプロダクトイオンは脱アンモニウムイオン、脱水イオンや共通骨格由来の m/z=249, 231 などが観察され強度の強いイオンを定量用及び確認用イオンに選択し

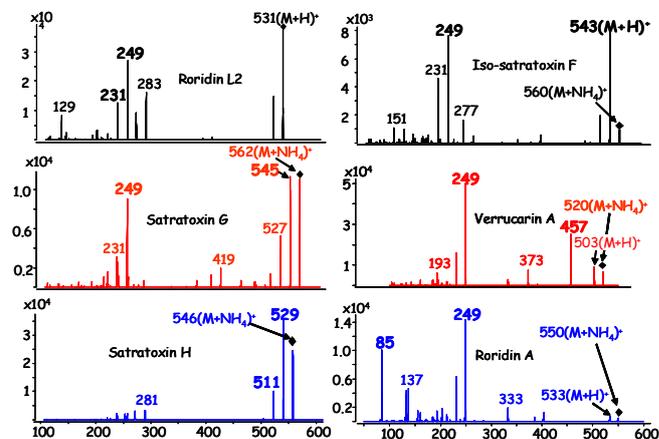


図.1 各 MTRs の MS/MS スペクトル(◆:プリカーサーイオン)



Agilent Technologies

図. 2 には表. 1 に示した条件での各 MTR の MRM クロマトグラムを示します。

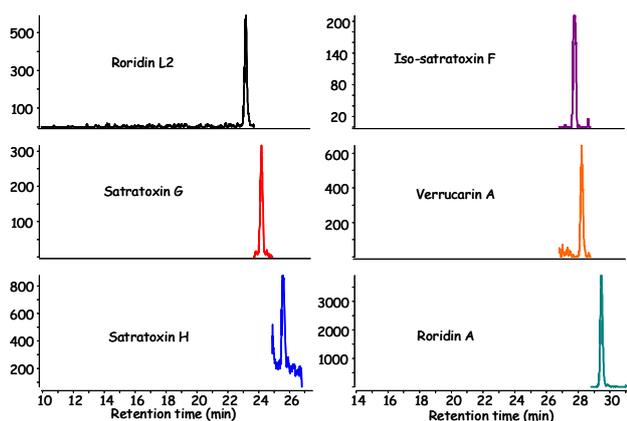


図. 2 各 MTR の MRM クロマトグラム (0.5ppb)

各 MTR の濃度は 0.5ppb ですが、全ての MTRs で S/N 比は 3 以上で検出が可能でした。また、直線性の確認に 1000~1ppb での各 MTR の検量線を示しましたが、Roridin A を除いて相関係数は 0.999 以上と良好でした。

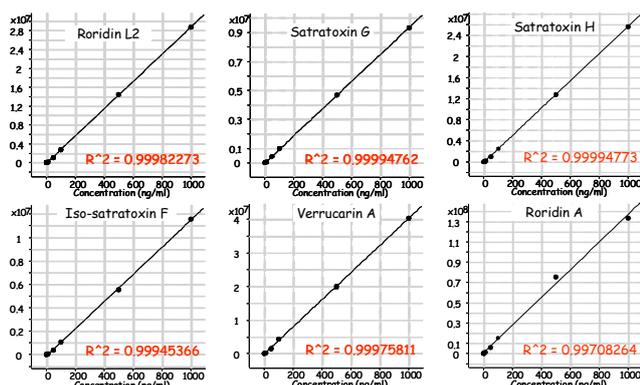


図. 3 各 MTR の検量線 (1000~1ppb)

3.2. *Stachybotrys chartarum* 抽出液の測定

Stachybotrys chartarum 菌糸をメタノールで抽出した抽出液を直接 LC-MS/MS で分析しました。結果の積算 MRM クロマトグラム及び各 MTR の MRM クロマトグラムは図. 4 及び 5 に示しました。検出された MTR は Roridin L2, Satratoxin G, Satratoxin H, Iso-satratoxin F であり測定に影響を与える菌糸由来のピークは検出されませんでした。また図. 5 に示したクロマトグラム中の破線は確認イオンの定量イオンに対する相対強度の許範囲 ($\pm 20\%$) ですが、検出された全ての MTR で確認イオンの相対強度は許容範囲内でした。定量値は表. 2 に示しましたが、53~113ppb でした。

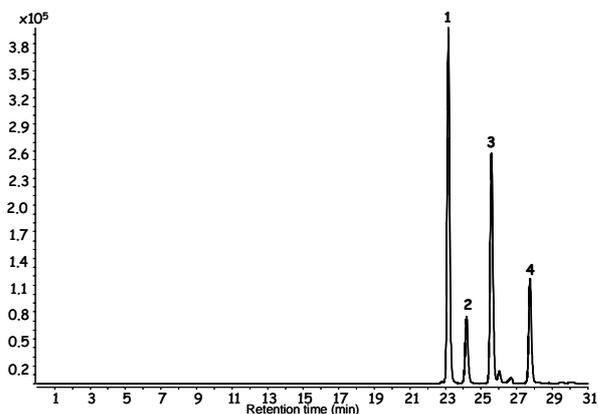


図. 4 *Stachybotrys chartarum* 抽出液の積算 MRM クロマトグラム

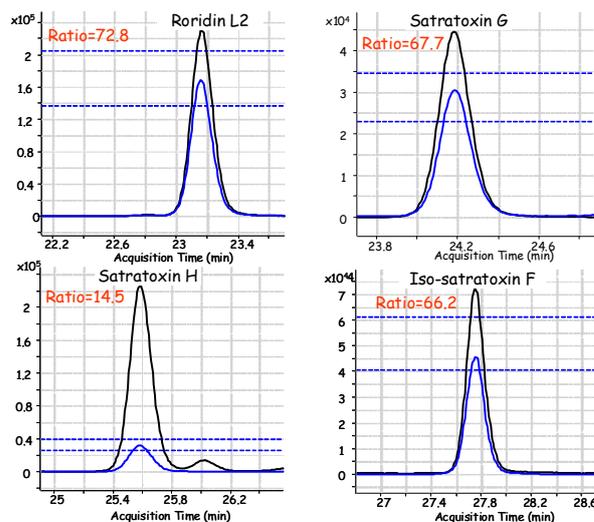


図. 5 *Stachybotrys chartarum* 抽出液中各 MTR の MRM クロマトグラム

表. 2 *Stachybotrys chartarum* 抽出液中各 MTR 定量値

No	MTR	定量値(ppb)
1	Roridin L2	113.0
2	Satratoxin G	53.0
3	Satratoxin H	116.0
4	Iso-satratoxin F	63.0

4. まとめ

今回、LC-MS/MS を用いた 6 種類の大環状トリコセン類の分析法を紹介しましたが、MRM 法を使用することで 1ppb 以下の高感度分析が可能でした。また *Stachybotrys chartarum* 菌糸抽出液中で菌糸由来成分による影響なく 4 種類大環状トリコセン類が検出され、MRM 法の高い選択性が実証できました。

【LCMS-200804TK-001】

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



Agilent Technologies