

Agilent 6460 による生体試料中コルヒチン およびデメコリチンの分析



＜要旨＞LC/MS-MS 法を用いて血漿中コルヒチン及びデメコリチンの高感度分析法を検討しました。その結果、内部標準にカルバマゼピンを使用することで直線性は 5～500ng/mL の範囲で相関係数が 0.999 以上と良好でした。また、感度は標準血清中で検出限界がコルヒチン:0.001ng/mL, デメコリチン:0.002ng/mL でした。この高感度分析法を救急救命センターに搬送された中毒患者の診断に適応しました。

Key Words: イヌサフラン、グロリオサ、コルヒチン、食中毒

1. はじめに

イヌサフランや観賞用植物であるグロリオサはコルヒチンと呼ばれるアルカロイドを含有している毒植物です。これら植物はイヌサフランの葉がギョウジャニンニク、グロリオサの球根がヤマイモに類似していることから誤食による食中毒がしばしば発生し、死亡例も報告されています。また、グロリオサはコルヒチンだけでなく類似のデメコリチンも含有しており、グロリオサ誤食による中毒患者の診断に血液などの生体試料中のこれらアルカロイドの分析が重要です。そこで本研究では LC/MS-MS を用いた血清中のデメコリチン及びコリヒチンの高感度分析法を確立し救急救命センターに運ばれた中毒患者の分析に適応した例を紹介致します。

表.1 LC/MS-MS 条件

LC	: Agilent 1290LC
Column	: Inertsil OD54(150mm, 2.1mm, 2um)
Mobile phase	: A: 0.1% HCOOH+10mM HCOONH ₄ , B: ACN 20%B---(20min)---100%B
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 5uL
Flow rate	: 0.25mL/min
MS	: Agilent 6460 LC-MS
Ionization	: AJS (Positive)
Drying gas	: 10L/min at 350°C
Sheath gas	: 12L/min at 400°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

No	Compounds	Precursor	Tragte	Qualifier	CE(T)	CE(Q)	Segment
1	Demecolcine	372	310	340	14	10	1
2	Colchicine	400	358	310	10	22	2
3	Carbamazepine(I.S)	237	194	179	18	40	3

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りです。LC 条件はカラムに 2.0µm 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 AJS を使用し、正イオンモードで測定しました。血清中の定量にはカルバマゼピンをサロゲート物質とした標準血清によるマトリックス検量線を用いた内部標準法で行いました。図.1 にデメコリチンとコルヒチンのプリカーサーイオンを $m/z=372$ (デメコリチン)、 400 (コルヒチン) とした MS/MS スペクトルを示しましたが、MRM 用プロダクトイオンには $m/z=310, 340$ (デメコリチン) と $m/z=358, 310$ (コルヒチン) を選択しました。

試料調製は血清(1mL)を飽和アンモニア水(1mL)と 5%IPA/塩化メチレン(5mL)で 5 分間振とう抽出後、有機溶媒相を窒素気流下で蒸発乾固し、残渣をメタノール(0.1mL)にて再溶解しました。

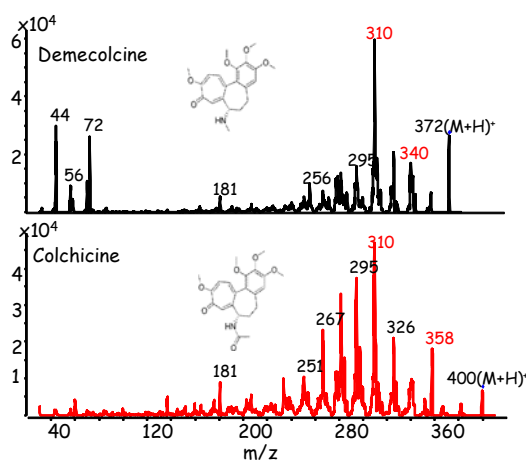


図.1 デメコリチン、コルヒチンの MS/MS スペクトル



3.結果

検量線用標準血清溶液中デメコルチン及びコルヒチンのMRMクロマトグラムは図.2に示しました。このクロマトグラムでのデメコルチンとコルヒチンのS/N比はデメコルチン:150及びコルヒチン:300でした。この結果から血清中各化合物の検出下限はデメコルチン:0.002ng/mL,コルヒチン:0.001ng/mLでした。カルバマゼピンをサロゲート物質とした内部標準法による検量線は図.3に示しましたが、決定係数は0.999以上と良好な結果でした。

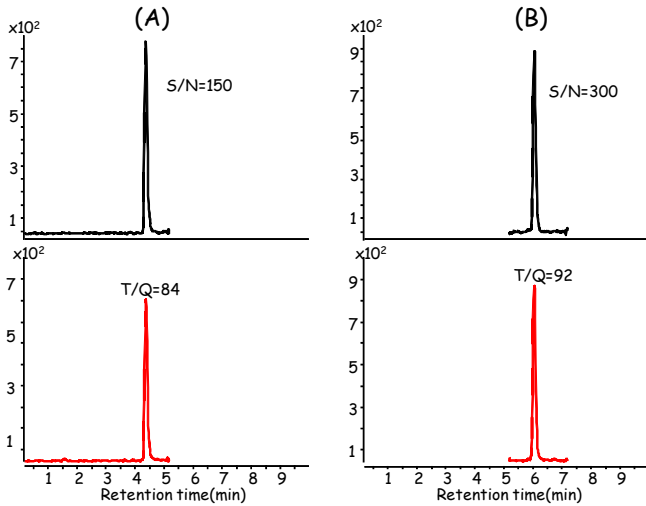


図.2 標準血清液中デメコルチン(A)、コルヒチン(B)のMRMクロマトグラム 濃度:0.1ng/mL(血清中)
上段:定量イオン 下段:確認イオン
T/Q=定量用イオン/確認用イオン

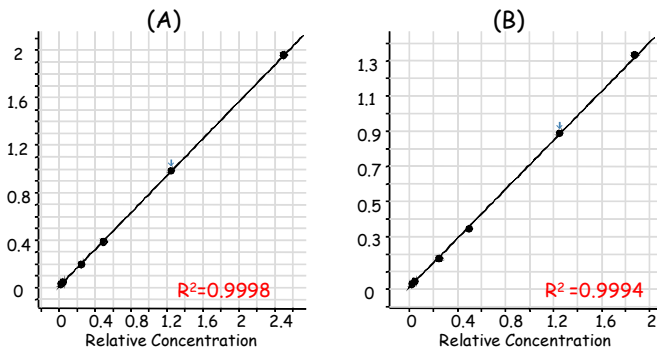


図.3 デメコルチン(A)、コルヒチン(B)の検量線

救急救命センターに運ばれた中毒患者の血清を前述の方法で処理した血清抽出液の結果は図.4にデメコルチンとコルヒチンのMRMクロマトグラムを示し、表.2に定量結果を示しました。MRMクロマトグラムは標準血清と同様に血清由来の妨害ピークも検出されず良好なクロマトグラムが得られた。また、定量用イオンと確認用イオンの比率についても標準品と一致し今回設定した確認用イオンがデメコルチン、コルヒチンの確認に有効であることがわかりました。

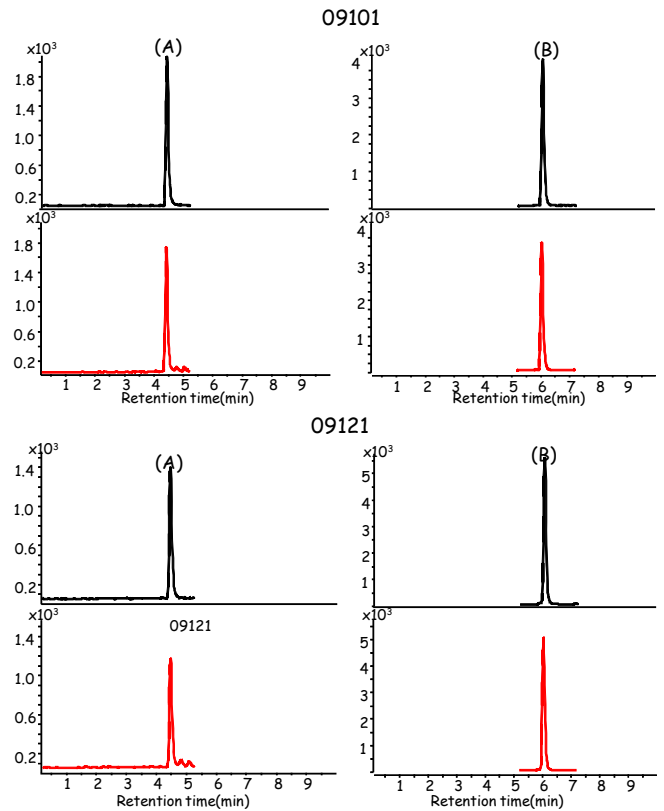


図.4 中毒患者の血清中デメコルチン(A)、コルヒチン(B)のMRMクロマトグラム
上段:定量イオン 下段:確認イオン
T/Q=定量用イオン/確認用イオン

表.2 中毒患者血清中デメコルチン、コルヒチンの定量結果 (濃度:ng/mL)

No	Compounds	09101		09071	
		定量値	T/Q	定量値	T/Q
1	デメコルチン	0.32	85	0.72	82
2	コルヒチン	39.7	93	1.9	91

T/Q:定量用イオン/確認用イオン比

4.まとめ

今回、グロリオサの球根を誤食による中毒症の診断を行う目的で、グロリオサの主要アルカロイドであるデメコルチン及びコルヒチンの中毒患者血清中微量分析法の検討を行いLC/MS-MS法を用いた高感度分析法を確立しました。この方法での血清中検出限界はデメコルチン:0.002ng/mL,コルヒチン:0.001ng/mLでした。この手法を実際の中毒患者に適応した結果、良好な結果が得られました。

【LCMS-201008TK-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