

Agilent 6460 によるカエンタケ中 大環状トリコテセン類の分析



<要旨> 毒キノコの一つであるカエンタケの毒性成分であるサトラトキシシン H、サトラトキシシン H モノ酢酸エステル及びサトラトキシシン H ジ酢酸エステルの高速溶媒抽出(ASE)法及び Agilent 6460 LC/MS-MS 法を用いた分析法を開発しました。本分析法を用いて新潟県で採取されたカエンタケを測定した結果、含有量はサトラトキシシン H が 658~1031 $\mu\text{g/g}$ 、サトラトキシシン H 酢酸エステルが 331~605 $\mu\text{g/g}$ 、サトラトキシシン H ジ酢酸エステルが 880~1528 $\mu\text{g/g}$ でした。

key words: キノコ、カエンタケ、大環状トリコテセン、高速溶媒抽出、LC/MS-MS

1. はじめに

カエンタケ (*Podostroma cornu-damae*) はニグサキン科ツノタケ属に属するキノコの一つであり、日本及び中国で夏から秋にかけて広葉樹林に自生します。このキノコは古くから毒キノコと言われていましたが学術的に証明されていなかったことから長い間、食毒不明でした。しかし 1990 年代に中毒・死亡事故が発生したことから猛毒であることが判明し、毒性成分はサトラトキシシン H、サトラトキシシン H の酢酸エステル類、ロリジン E、ベルカリン J など大環状トリコテセン類 (MTRs) であることが判明しました。特に近年、カシノナガクイムシが運ぶ糸状菌によるナラ枯れが急増することで立ち枯れたナラでカエンタケの繁殖が急増しており誤食による食中毒が懸念されています。しかし毒性成分であるサトラトキシシン H 類の標準品が入手できないことからその含有量の報告はほとんどされていません。そこで主成分であるサトラトキシシン H、サトラトキシシン H モノ酢酸エステル及びサトラトキシシン H ジ酢酸エステルについてカエンタケ抽出液から分取、精製を検討し標準品を作製することで LC/MSMS 法を用いた定量分析を行ったので紹介します。

2. 測定条件及び試料調製

分析用カラムには Agilent 製 ZORBAX Eclipse Plus C18 (100mm, 2.1mm, 1.8 μm) を使用し、移動相にアセトニトリル及び 0.1% 酢酸+10mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いたグラジエント溶出を行いました。分析条件は表.1 の通りです。

試料は 2009 年 9 月に新潟県村上市、胎内市で採取した生カエンタケを使用し、粉碎後高速溶媒抽出装置 Dionex 製 ASE150 を使用して大環状トリコテセン類の抽出を行いました。抽出溶媒にはアセトニトリルを使用し、抽出温度;100 $^{\circ}\text{C}$ 、抽出時間;5 分とし、精製には Romer Labs 社製 MultiSep#227 を使用しました。

標準品はカエンタケ (50g) をアセトニトリル (200mL) でホモジナイズ抽出 (5 分) を行い、抽出液 100mL を ODS によるカラムクロマトグラフィーで精製を行いました。精製液は全量を凍結乾燥後、アセトニトリルで再溶解し分取 HPLC でサトラトキシシン H、サトラトキシシン H モノ酢酸エステル及びサトラトキシシン H ジ酢酸エステル画分を分取し、再結晶化しました。得られた標準品はメタノールで溶解後、ELCD 検出器を用いた HPLC で純度を確認したところ全て 99%以上と良好でした。

表.1 カエンタケ中大環状トリコテセン類の分析条件

HPLC	: Agilent 1290				
Column	: ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(100,mm,2.1mm,1.8 μm)				
Mobile phase	: A:0.1% HCOOH +10mM HCOONH_4 B:ACN 10%B---(40min)---80%B				
Column temp	: 40 $^{\circ}\text{C}$				
Flow rate	: 0.3 mL/min				
Injection volume	: 3 μL				
MS	: Agilent 6460 Triple Quad LC/MS				
Ionization	: AJS (positive)				
Sheath gas	: 12L/min at 400 $^{\circ}\text{C}$				
Drying gas	: 10 L/min at 300 $^{\circ}\text{C}$				
Nebulizer gas	: 345kPa				
Fragmentor	: 100V				
Vcap	: 4000V				
大環状トリコテセン類	プリカーサーイオン	プロダクトイオン		コリジョンエネルギー	
		ターゲット	クオリファイア	ターゲット	クオリファイア
サトラトキシシン H	546	529	245	5	15
サトラトキシシン H 酢酸エステル	571	323	249	5	10
サトラトキシシン H ジ酢酸エステル	613	245	231	10	10

図.1 に各化合物の MSMS モードによる質量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またはアンモニウム付加体を選択し測定しましたこれら質量スペクトルから最大強度のプロダクトイオン ($m/z=529, 323, 245$) を SRM の定量用イオン、2 番目強度のイオン ($m/z=245, 249, 231$) を確認用イオンとした。

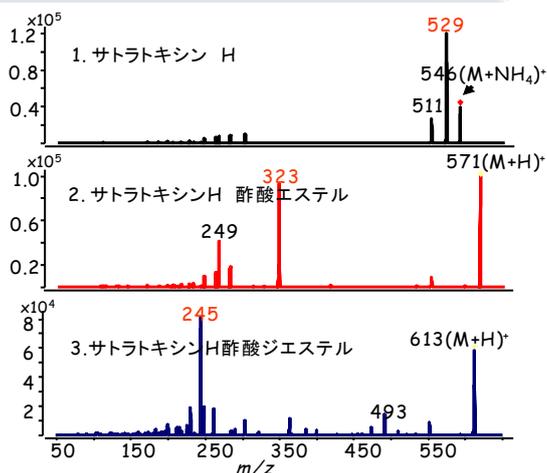


図.1 サトラトキシシンH類の MSMS スペクトル

3. 結果及び考察

今回、カエンタケから抽出、精製して作成した標準品を使用して感度の確認を行いました。図.2 にサトラトキシシンH類の SRM クロマトグラムを示します。結果、10ng/mL 標準液で定量イオン、確認イオン共に S/N>50 で検出可能でした。検量線は図.3 に示しましたが決定係数は全て 0.999 以上と良好でした。

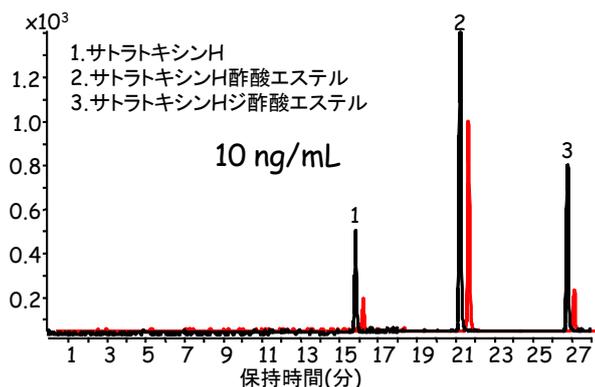


図.2 サトラトキシシンH類の SRM クロマトグラム

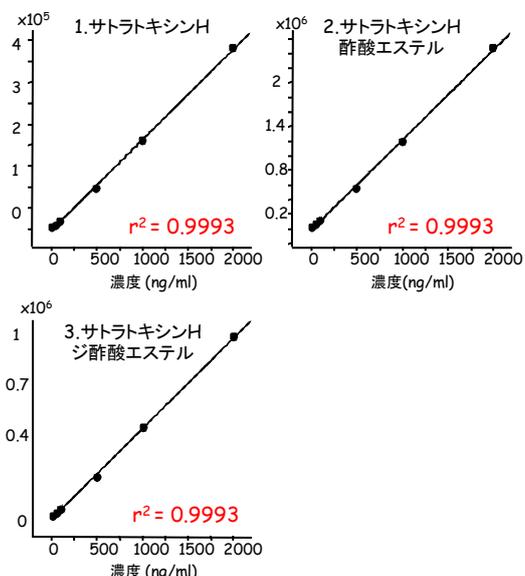


図.3 サトラトキシシンH類の検量線

カエンタケからサトラトキシシンH類の抽出には ASE を使用しましたが、抽出溶媒にアセトニトリルを用いることで共雑物が少なくサトラトキシシンH類を迅速に抽出することが可能でした。また、精製には多機能カラムである MultiSep#227 を用いることで安易に精製が可能でした。そこで確立した方法を用いて新潟県 3 か所で採取した生カエンタケを抽出、精製を行い SRM モードで測定を行いました。結果は図.4 に各サトラトキシシンH類の SRM クロマトグラムを示し、定量結果は表.2 に示しました。

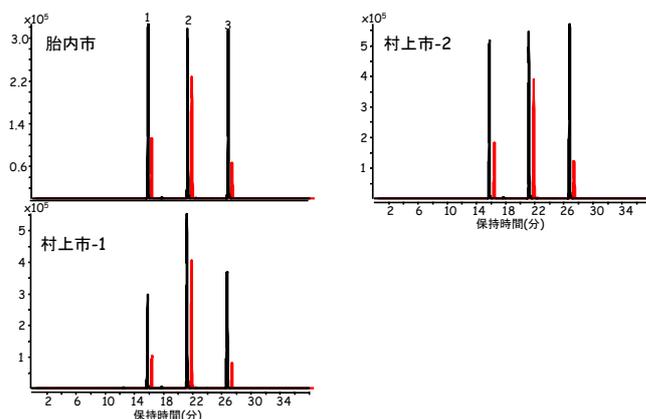


図.4 カエンタケ中サトラトキシシンH類の SRM クロマトグラム

表.2 カエンタケ中各サトラトキシシンH類の定量値

サトラトキシシンH	胎内市		村上市-1		村上市-2	
	定量値	T/Q比	定量値	T/Q比	定量値	T/Q比
サトラトキシシン H	791	38	658	37	1031	35
サトラトキシシン H 酢酸エステル	331	69	605	73	596	71
サトラトキシシン H ジ酢酸エステル	880	24	978	23	1528	21

濃度: $\mu\text{g/g}$

4. まとめ

今回、新潟県で採取したカエンタケから精製したサトラトキシシンH、サトラトキシシンH酢酸エステル及びサトラトキシシンHジ酢酸エステルを用いて新潟県で採取した 3 か所のカエンタケ中サトラトキシシンH類の定量分析を行いました。その結果、含有量はサトラトキシシンHが 658~1031 $\mu\text{g/g}$ 、サトラトキシシンH酢酸エステルが 331~605 $\mu\text{g/g}$ 、サトラトキシシンHジ酢酸エステルが 880~1528 $\mu\text{g/g}$ でした。

【LCMS-201012TK-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