

人間活動に伴い環境中に放出された汚染元素の化学形態別分析に関する研究 (第3報)

尿中のセレン未知化合物の同定

研究代表者 研究員 古田 直紀 (中央大学理工学部)
 共同研究者 研究員 大畑 昌輝 (中央大学理工学部)
 共同研究者 客員研究員 鍋島 貴之 (日立ハイテクノロジーズ)
 共同研究者 準研究員 酒井 和広 (中央大学大学院理工学研究科博士前期課程)
 共同研究者 準研究員 長崎 和之 (中央大学大学院理工学研究科博士前期課程)
 共同研究者 準研究員 堀込 純 (中央大学大学院理工学研究科博士前期課程)
 共同研究者 準研究員 町田 亮 (中央大学大学院理工学研究科博士前期課程)

1 緒言

セレン (Se) は環境基準にも定められる有害元素であるが、生体中においては必須元素であり、抗ガン作用もあることが最近の研究で明らかになってきた [1,2]。セレンに限らず多くの元素がこのような正反対の性質を併せ持っており、動物及び人体への毒性、環境への影響は元素の化学形態に大きく依存している。しかし、セレンの生体中での挙動及びその化学形態はまだ明らかになっていないことが多いため、生体試料中に含まれるセレンの化学形態別分析は極めて重要であると考えられる。そこで、本研究では移動相に混合イオン対試薬を使用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICPMS) を組み合わせた測定システム HPLC-ICPMS を開発 [3] し、マウスの尿中に含まれるセレンの化学形態別分析を行った。そして、マウス尿中に検出された未知のセレン化合物の分離及び濃縮法を確立し、エレクトロスプレー四重極飛行時間型質量分析法 (ESI-Q-TOFMS) を用いて未知セレン化合物の同定を目指した。

2 実験

2.1 装置

マウスの尿の分析には HPLC と ICPMS をオンラインで接続した HPLC-ICPMS を使用した。ESI-Q-TOFMS で測定するフラクションは、二次元クロマトグラフィー [4] を用いて分離・濃縮を行った (Fig. 1)。二次元クロマトグラフィーとは HPLC での分離・濃縮という作業を 2 回行うことである。これによって、マトリックスが少なく、セレンが高濃度で存在する未知セレン化合物フラクションを得ることができる。ポンプは日本分光社製 PU-1580i, 分離カラムは GL Science 社製 LiChrosorb RP-18, ICPMS は横河アナリティカルシステムズ社製 HP4500, ESI-Q-TOFMS は Micromass 社製 Q-Tof Micro を用いた。

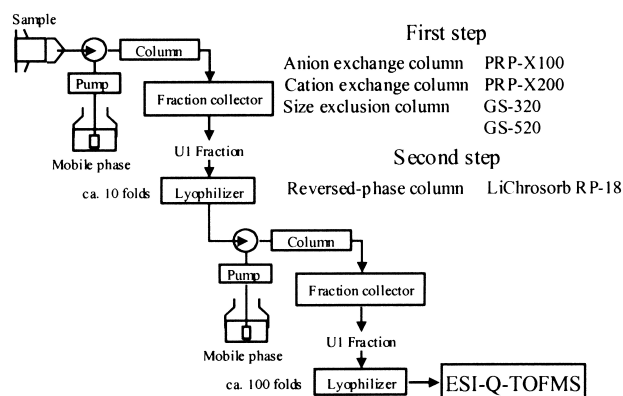


Fig.1 Two-dimensional HPLC Separation and Preconcentration.

2.2 マウスの尿の測定

マウスの尿を測定する際の液体クロマトグラフィーの分離条件として、移動相は 1-ブタンスルホン酸ナトリウム (98%, Aldrich) 2.5mM, 水酸化テトラメチルアンモニウム (10%, Merck) 4mM, マロン酸 (97%, 関東化学) 4mM, メタノール (99.9%, 関東化学) 0.05%を超純水 (日本ミリポア) に各濃度溶解し、硝酸 (70%, 関東化学) で pH4.5 に調整した。流速は 1.0ml/min, 導入量は 20 μ l, カラム温度は室温とした。また、フラクションを採取時には、カラムとフラクションコレクターを接続した。導入量は 100 μ l, 移動相はメタノール 5%水溶液を用いた。その後、凍結乾燥機 (東京理化工機) を用いて濃縮し、ESI-Q-TOFMS で測定した。

3 結果及び考察

3.1 標準物質の測定

Fig. 2 (a) は 7 つのセレンの標準物質の混合溶液を HPLC-ICPMS で測定したクロマトグラムである。保持時間は selenate (Se(VI)), selenite (Se(IV)), selenocystine (SeCys), trimethylselenonium ion (TMSe⁺), se-

lenomethionine (SeMet), selenocystamine (SeCM), selenoethionine (SeEt) の順になっている。どのピークも対称で鋭く良いピークであることから、この測定システムを用いて、セレンの化学形態別分析が十分に行えることが分かる。Fig. 2 (b) は同様にマウスの尿を測定したクロマトグラムである。主に、3つのピークが現れた。1つ目のピークは Se (IV)、2つ目のピークは TMS⁺Se⁺ であるが、3つ目のピークはどの標準物質とも違う保持時間を示しているために未知のセレン化合物であると推測される。以後、この物質を U1 (Unknown 1) と呼ぶことにする。

3.2 二次元クロマトグラフィーの評価

二次元クロマトグラフィーの第二段のカラムには Li Chrosorb RP-18 を使用した。第一段のカラムには陰イオン

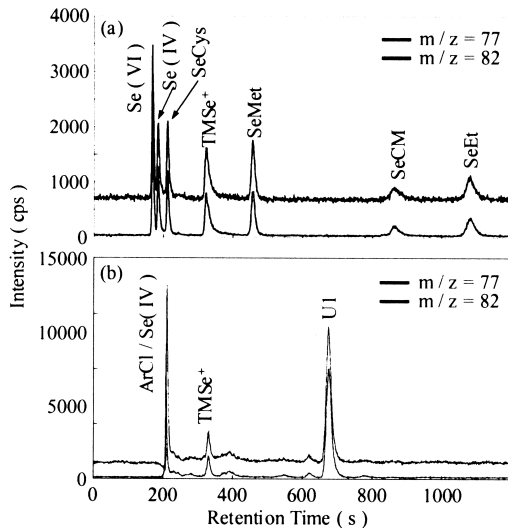


Fig.2 HPLC-ICPMS chromatograms (a) Se standards and (b) mouse urine.

ン交換カラムの PRP-X100, 陽イオン交換カラムの PRP-X200, サイズ排除カラムの GS-320 と GS-520 の4つのカラムから検討した結果, GS-320 を使用することにした。

3.3 ESI-Q-TOFMS による分析

Fig. 3 (a) は二次元クロマトグラフィーで分離・濃縮したフラクションを ESI-Q-TOFMS で測定したスペクトルである。測定に使用した ESI-Q-TOFMS は衝突解離機能 (CID) を持ち、ナノスプレーを搭載しているため、僅なサンプル量でも多くの情報が得られた。矢印で示した2つの部分にセレンの同位体比のピークパターンが見られる。これにより U1 は m/z 約 322 と約 338 の2つの形態を取るセレン化合物であることが分かった。Fig. 3 (b) は、同様のサンプルを 322 付近の m/z のみを CID 機能を使って解離させて測定したスペクトルである。m/z 約 226 にピークが出ているのが確認できる。

3.4 U1 の構造式の決定

ESI-Q-TOFMS による結果から、U1 の構造式を Fig. 4 (a) のセレノシュガーだと予想した。この物質に Na と K がそれぞれ付加したものが、測定された前駆体イオンに相当すると思われる [5,6]。また、CID を行った時、生成したフラグメントイオンの構造は Fig. 4 (b) のような、セレノシュガーから SeCH₄ が取れ二重結合が形成された構造に Na が付加したものと予想できる。

次に、測定で得られた分子量から予想される候補と、予想されたセレノシュガーの理論的な分子量がどのくらいずれているのかを調べたものを Table 1 に示す。全て 10ppm 以内の誤差範囲に入っているのだからかなり信頼できる値であると思われる。

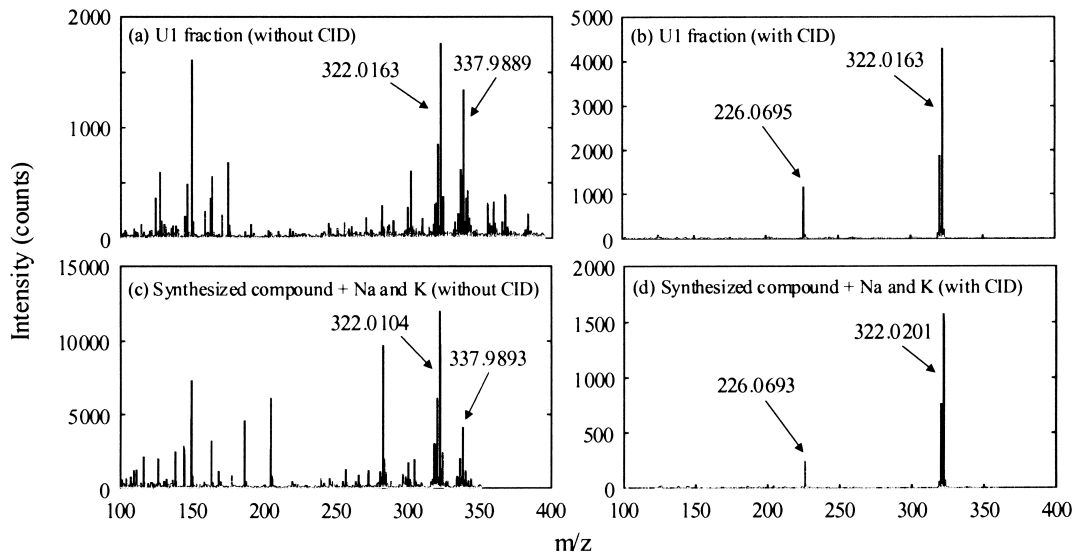


Fig.3 ESI-Q-TOFMS spectra for the U1 fraction ((a) and (b)), and for the synthesized compound + Na and K ((c) and (d)). (a) and (c) were measured without CID, and (b) and (d) were measured with CID after passing through at around m/z 322.

Table 1 Estimated molecular formula and the error between found and calculated values of the unknown Se compounds (U1)

m/z	322.0163	Calculated	Δ [ppm]
○	C ₉ H ₁₇ N O ₅ Se Na	322.0170	- 2.1
	C ₇ H ₁₅ N ₄ O ₄ Se Na	322.0156	2.1
	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O Se Na	322.0183	- 6.2
m/z	337.9889	Calculated	Δ [ppm]
○	C ₇ H ₁₅ N ₄ O ₄ Se K	337.9896	- 1.9
○	C ₉ H ₁₇ N O ₅ Se K	337.9909	- 5.9
	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O Se K	337.9922	- 9.9
m/z	226.0695	Calculated	Δ [ppm]
○	C ₈ H ₁₃ N O ₅ Na	226.0691	1.6
	C ₉ H ₉ N ₅ O Na	226.0705	- 4.3
	C ₆ H ₁₁ N ₄ O ₄ Na	226.0678	- 7.5

3.5 U1 標準物質の分析

Fig. 4 で予想した構造式が正しいことを確認するために、U1 の標準化合物を合成したものを千葉大学薬学部の鈴木和夫教授からいただき、Na と K を加えた溶液を作成し、同様の条件で測定し、U1 フラクシオンのデータと比較した。その結果を Fig. 3 (c) に示す。m/z 約 322 と約 338 付近にセレンの同位体比のピークパターンが検出されているという、とてもよく似ているスペクトルが得られた。同様に CID 機能を用いた測定の結果を Fig. 3 (d) に示す。こちらも m/z 約 226 付近にフラグメントイオンが出ているという似た挙動を示している。この結果から、前項で予想した U1 がセレノシュガーであるという同定が正しいことを確認することができる。

4 結論

- ・マウス尿中に未知セレン化合物である U1 が検出された。
- ・ESI-Q-TOFMS で測定された U1 はセレノシュガーの一種に Na または K が付加した化合物であった。
- ・標準化合物が手に入らない場合、二次元クロマトグラフィーによる精製と ESI-Q-TOFMS による分析は、化学形態を決定するための情報を与える。

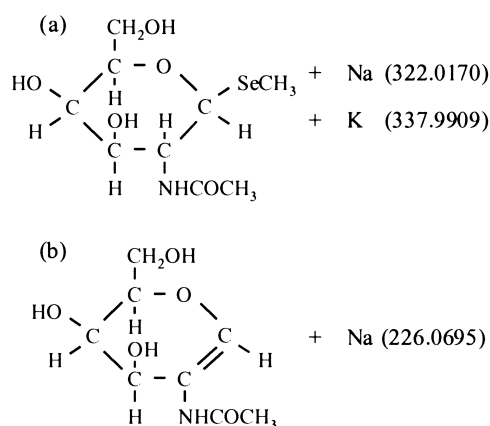


Fig.4 Identification of the unknown Se compounds (U1) (a) precursorion and (b) fragmented ion.

参考文献

- [1] C. Ip, D. J. Lisk and G. S. Stowesan: "Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic," *Nutr. Cancer*, **17**, 279–286 (1992).
- [2] Y. Dong, D. Lisk, E. Block and Clement Ip: "Characterization of the biological activity of γ -gurutamyl-Se-methylselenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic," *Cancer Res.*, **61**, 2922–2928 (2001).
- [3] J. Zheng, M. Ohata, N. Furuta: "Reversed-phase liquid chromatography with mixed ion-pair reagents coupled with ICP-MS for the direct speciation analysis of selenium compounds in human urin," *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**, 730–735 (2002).
- [4] S. McSheehy, W. Yang, F. Pannier, J. Szpunar, R. Lobinski, J. Auger and M. Potin-Gautier: "Identification of selenocompounds in yeast by electro-spray quadropole-time of flight mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, **421**, 147-153 (2000).
- [5] Y. Kobayashi, Y. Ogura, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, and K. Suzuki: "Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15932–15936 (2002).
- [6] V. D. Huerta, J. Szpunar, R. Lobinski, M. L. F. Sanchez and A. Sanz-Medel: "Sample preparation for indentification of selenocompounds in urine by electro-spray-MS/MS," *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 1471–1476 (2003).