

## 高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による生物試料中フラーレンの分析法の開発

久保田領志<sup>#</sup>, 田原麻衣子, 清水久美子, 杉本直樹, 広瀬明彦, 西村哲治

### Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in biological samples

Reiji Kubota<sup>#</sup>, Maiko Tahara, Kumiko Shimizu, Naoki Sugimoto, Akihiko Hirose, and Tetsuji Nishimura

Wide application of fullerenes in various areas would increase the risk of occupational and environmental exposure to human. However, information about toxicity and biological behavior of fullerenes is not sufficient for the risk assessment at present. For the determination of fullerene C<sub>60</sub> in biological samples, an analytical method using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and extraction procedure from tissues of experimental animals was established in this study. Using LC-MS/MS with an atmospheric pressure chemical ionization in negative mode, C<sub>60</sub> were identified and quantified. After optimization of mobile phase and separation column, good separation of peak of fullerene and sensitivity were obtained in case of using toluene and acetonitrile as the mobile phases and Develosil RPFULLERENE as the separation column. For method validation, rat brain, kidney, liver, lung, spleen tissues and blood were used for recovery tests. Good results were obtained and the recovery percentages were found to be between 98.1% and 106.5%.

Keywords: fullerene, analytical method, LC-MS/MS, biological Sample, extraction

#### 1. はじめに

近年, ナノテクノロジー素材である人工ナノ粒子 (Engineered nanoparticles, ENPs) は新機能や優れた物理化学的特性を持つことから, 情報・通信, 医療, 環境, エネルギー等の様々な分野において次世代を担うキーテクノロジーとして期待され, 急速に種類や生産量が増加しつつある. 代表的なENPsとしては, カーボンナノ粒子 (フラーレンやカーボンナノチューブ等), 金属・合金・金属酸化物のナノ粒子, ポリマーナノ粒子, 量子ドット等があり, 賦形剤, 乳白剤, 触媒, 半導体等の工業分野だけでなく, ヒトに直接関係する製薬, 食品, 化粧品等の分野においても用いられている<sup>1)</sup>. 一方で, それらENPsのヒトへの健康影響や環境への放出, 生態系への影響については多くの点で未解明のままであり, 特にENPsによるヒトに対する健康影響評価への関心が高まっているのが現状である<sup>2,3)</sup>.

カーボンナノ粒子のフラーレンは, グラファイト, ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体であり, 他の炭素同素体とは異なる多数の五角面と六角面を持つ閉多面体か

ご型構造の分子である<sup>4)</sup>. その独特な構造と特性のためにフラーレンと内包フラーレンや化学修飾フラーレンなどの誘導体は, 他の炭素同素体とは異なりフリーラジカールスカベンジャー<sup>5)</sup>, 光誘起DNA切断<sup>6)</sup>, HIV-1プロテアーゼ活性阻害<sup>7)</sup>, ヒト細胞 (ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF細胞), ヒト肝ガン由来細胞 (HepG2細胞), およびヒト星状細胞 (NHA細胞) における細胞毒性<sup>8)</sup>を示すことが報告されている. フラーレンとその誘導体の急速な商用化により, ヒトが職業や環境から経口, 経皮, 経気道曝露するリスクが増大することが推測されている. しかしながら, 曝露によるヒト健康への影響は殆ど明らかにされておらず, 有害影響評価や体内動態に関する研究は十分ではない. *in vivo*<sup>9)</sup>や*in vitro*<sup>10)</sup>によるフラーレンやその誘導体の有害影響を正しく評価するためには, フラーレンの曝露評価が不可欠である. そのためには, フラーレンの高感度, 高精度および選択性が高い分析化学的手法が必要である. しかしながら, 分析化学的手法を用いた生物試料中のフラーレンやその誘導体の測定に関する研究は数例あるだけで<sup>11-13)</sup>, これらの研究を行う上でも, 分析法の開発が急務となっている.

そこで本研究では, 高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いたフラーレン (C<sub>60</sub>) の高感度測定法の確立の目的とし, 投与した実験動物の

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Reiji Kubota; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel/Fax.: 03-3700-9346; E-mail: reijik@nihs.go.jp

組織からのフラレン類の抽出等の前処理法を検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬

C<sub>60</sub>はMaterials Technologies Research社製(Cleveland, USA)(純度99.98%(メーカー成績値))またはフロンティアカーボン(株)(東京,日本)製ナノムパーブルSUH(純度>99.9%(メーカー成績値))を, C<sub>70</sub>はMaterials Technologies Research社製(Cleveland, USA)(純度99.5%(メーカー成績値))を用いた。高速液体クロマトグラフィー用2-プロパノール, アセトニトリル, およびトルエンは和光純薬工業(株)(大阪,日本)製を用いた。また, 生化学用のドデシル硫酸ナトリウムも和光純薬工業(株)(大阪,日本)製を用いた。標準原液はC<sub>60</sub>またはC<sub>70</sub>を10mg精密に量り取り, それぞれトルエン10mLに加え超音波処理および攪拌して溶解したものとし, 分析まで-20°Cで保存した。標準液は標準原液からトルエンで段階的に希釈したものを用時調製した。

### 2.2 装置

LC-MS/MSには, 高速液体クロマトグラフとしてWaters社(Milford, USA)製Alliance 2695 HPLCシステムを, タンデム質量分析装置として同社製Micromass Quattro micro APIトリプル四重極質量分析計を連結したものをを用いた。

### 2.3 LC-MS/MSの分析条件

移動相の最適化は, 以下の2組の条件(条件1:A1-A2, 条件2:B1-B2)で比較検討した。条件1では, 移動相A1=トルエンおよびA2=2-プロパノールを, A1/A2の割合を27%/73%, 36%/64%および45%/55%に設定した。条件2では, 移動相B1=トルエンおよびB2=アセトニトリルを, B1/B2の割合を50%/50%, 60%/40%および70%/30%に設定した。条件1, 2共にアイソクラティックモードで送液し, 流速は0.2および1.0 mL/minとした。カラムオープンの温度は40°C(一部30°Cも用いた)を用いた。オートサンプラーは10°Cで維持し, 注入量は5 $\mu$ Lもしくは20 $\mu$ Lで行った。

イオン化法は, 大気圧化学イオン化法(APCI)のネガティブイオンモードを用い, Multiple Reaction Monitoring(MRM)モードにより高感度定量分析を行った。対象物質の分離カラムによる分離条件を比較検討するためにWaters社製Atlantis dC18(3 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm)(極性化合物の保持にすぐれ, 100%水系移動相でも使用できるC18系逆相カラム)および野村化学(株)(瀬戸,日本)製Develosil RPFULLERENE(5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm)(C18

系)に比べ, 保持が大きく, 高い耐久性を示すC30系逆相カラム)を用いた。LC-MS/MSのシステム制御, データ収集および解析にはWaters MassLynx version 4.0を用いた。

MRM測定条件は, 標準液を直接注入し, イオン検出強度が最大になるように最適化した。以下に条件を示す。APCIのコロナ電流は15 $\mu$ A, ソース温度, APCIプローブ温度はそれぞれ120°C, 400°Cを用いた。デズルベーションガス流量およびコーンガス流量はそれぞれ600L/hr, 50L/hrとした。インタースキャンディレイは0.1secs, インターチャンネルディレイは0.05secsに設定し, ドウェルタイムは0.5secsを用いた。フラレンのプレカーサイオン, プロダクトイオンについては, C<sub>60</sub>が $m/z = Q1\ 720 \rightarrow Q3\ 720$ , サロゲート物質として回収率補正に用いるC<sub>70</sub>では $m/z = Q1\ 840 \rightarrow Q3\ 840$ とし, コリジョンエネルギーはC<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>ともに60eV, コーン電圧は120Vを採用した。

### 2.4 試料の前処理法

生物試料からのC<sub>60</sub>の抽出はMoussaら(1997)<sup>14)</sup>の方法を簡便化して行った。分析まで冷凍保存していた臓器の重量を測定し, ホモジナイズし, 50~200mgをガラス製のホモジナイズ管に量り取った。これに0.1Mのドデシル硫酸ナトリウム0.5mL, および内部標準物質溶液として1.0mg/L C70トルエン溶液0.5mLを添加し, 穏やかにホモジナイズした。ホモジネートをガラス製の遠沈管に移し, ホモジナイズ管を1.0mLのトルエンで5回洗浄し, その洗液をホモジネートに合わせた。次にホモジネートを合わせた遠沈管に0.5mLの酢酸を加え遮光し, 室温で5時間295/minで振とう後, 30分間3500rpmで遠心した。遠心後, 上澄みを分取し, LC/MS/MS分析用試料とした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 移動相の最適条件の検討

フラレンの分離における移動相の最適条件を検討した。まず, C18系逆相カラムのAtlantis dC18カラムを用い, 2組の移動相の条件でそれぞれ100 $\mu$ g/LのC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のトルエン混合標準液を測定し, それぞれのピークの分離状況を比較した。Fig.1に移動相の条件1:A1-A2を用いた場合のMRMクロマトグラムを示す。A1およびA2の比率を変動させてC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>の分離状況を比較した結果, A1/A2=45%/55%の条件では, C<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークが完全に重なり, 両者のピークの分離は得られなかったが, A1/A2=36%/64%ではC<sub>60</sub>のピークにC<sub>70</sub>のショルダーピークが観察されるようになり, さらにA1/A2=27%/73%ではC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークは完全に分離した。

Fig.2に移動相の条件2:B1-B2を用いた場合のMRMク

ロマトグラムを示す。B1 / B2の比率を変動させてC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>の分離状況を比較した結果、B1 / B2=70% / 30%の条件ではC<sub>60</sub>のピークにC<sub>70</sub>のショルダーピークが観察された。一方、B1 / B2=60% / 40%の条件ではC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークは完全に分離し、B1 / B2=50% / 50%の条件ではC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークの間隔がさらに広がった。

C<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークは条件1に比べ、条件2の移動相でより良好なピークの実分離が観察された。また、条件1に比べ条件2においてC<sub>70</sub>のピーク形状がシャープであり、検出感度も良好であった。以上の結果から、移動相としてトルエンとアセトニトリルを用いることとした。

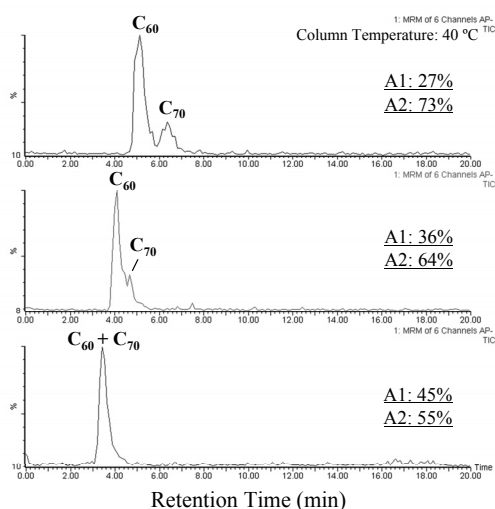


Fig. 1 Comparison of separation of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> by Atlantis dC18 separation column, A1: 2-Propanol/Toluene (1:9 v/v); A2: 2-Propanol, flow rate: 0.2mL/min, injection volume: 5 μ L

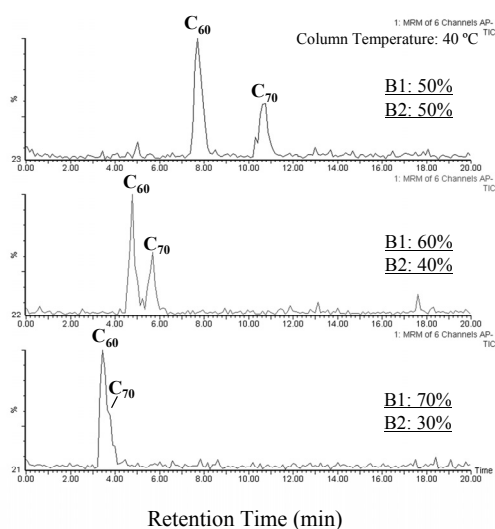


Fig. 2 Comparison of separation of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> by Atlantis dC18 separation column, B1: Toluene; B2: Acetonitrile, flow rate: 0.2mL/min, injection volume: 5 μ L

### 3.2 分離カラムの検討

分離カラムの検討を行った。Atlantis dC18カラムおよびC30系逆相カラムのDevelosil RPFULLERENEカラムを用いてそれぞれ100μg/LのC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のトルエン混合標準液を測定し、ピークの実分離状況を比較した。Develosil RPFULLERENEカラムで、移動相がB1 / B2=50% / 50%ではC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークは20分以内に溶出せず、B1 / B2=60% / 40%ではC<sub>60</sub>のみ20分以内に溶出した（データ示さず）。一方、B1 / B2=70% / 30%、カラムオープン温度が40°Cの条件において、20分以内に両ピークとも溶出され、シャープなピークが観察された。また、C<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークはそれぞれのピークトップの間隔が3分程度というように十分な分離能が確認され、検出感度も良好であった (Fig. 3)。一方、同じ条件において、Atlantis dC18カラムではC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークの実分離は不十分でありピーク形状も良くなかった (Fig.2)。さらに、Develosil RPFULLERENEカラムにおいてカラムオープン温度を30°Cにして分離状況を比較したところ、40°Cに比べC<sub>60</sub>とC<sub>70</sub>のピークはそれぞれのピークトップの間隔が4分程度というようにより良好に分離することが確認された (Fig.3)。以上の結果から、LC-MS/MSの諸条件を下記にまとめた。

装置 : Waters Alliance 2695,

Waters Micromass Quattro micro API

分離カラム : Develosil RPFULLERENE (5 μm, 4.6 ×

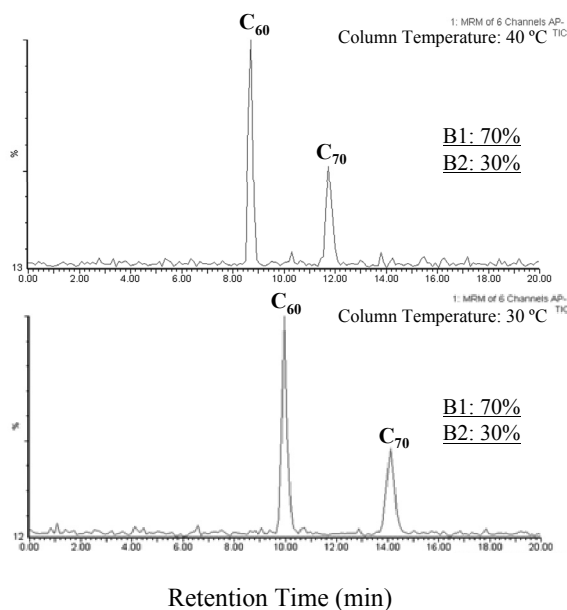


Fig. 3 Comparison of separation of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> by Develosil RPFULLERENE separation column, B1: Toluene; B2: Acetonitrile, flow rate: 1mL/min, injection volume: 20 μ L

250 mm)

移動相：トルエン／アセトニトリル=70%／30%

アイソクラティック法

流速：1mL/min

カラムオープン温度：30℃

試料注入量：20 $\mu$ L

イオン化法：APCIネガティブイオンモード

この条件では定量下限値は10 $\mu$ g/Lであった。すなわち組織重量に換算すると1.1 $\mu$ g/g wet wt.であった。

### 3.3 生物試料を対象としたフラーレンの抽出方法の検討

実験動物の臓器からのフラーレンの抽出方法を確立するため、実験動物の臓器組織を用いたフラーレンの添加回収試験を行った。検討には日本SLC(株)から購入したSlc:Wistar(SPF)ラット雄6週齢から得た肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳、および血液を用いた。血液および全ての臓器においてC<sub>60</sub>の回収率は100%前後(平均値±標準偏差:102.7±3.9%)と良好な結果が得られた(Fig.4)。また、MRMクロマトグラムにおいても、全ての臓器から抽出した試料において良好なピーク形状が得られ、また、妨害ピークや干渉等は認められなかった。C<sub>70</sub>の回収率についても100%前後と良好な結果(平均値±標準偏差:98.6±4.5%)が得られたことから、C<sub>70</sub>をサロゲートとして用いることが妥当であることが示された。C<sub>70</sub>の回収率を用いC<sub>60</sub>の回収率補正を行った結果、補正前(102.7±3.9%)と補正後(104.4±6.6%)でC<sub>60</sub>の回収率はほぼ同程度であった。以上の結果より、曝露評価のために本研究で示したトルエンによる振とう抽出法によって組織中のC<sub>60</sub>の分析を行うことができ、生物試料を対象と

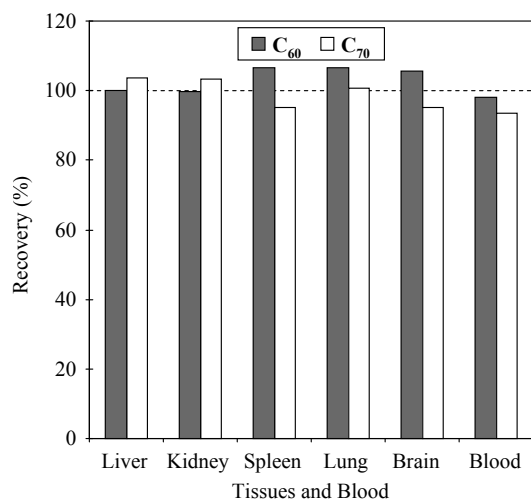


Fig. 4 Comparison of recovery of fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> from tissues and blood of Slc:Wistar(SPF) rat.

する際にC<sub>70</sub>により抽出効率の補正を行うことでより正確な分析が可能であることが示された。

### 4. おわりに

フラーレンのヒトにおける健康影響評価を最終目標に、LC-MS/MSによりC<sub>70</sub>を抽出操作の補正として用いるC<sub>60</sub>の測定法、さらには生物試料を対象としたフラーレンの抽出方法を検討した。本報で示した方法により、生物試料を対象としたフラーレンの分析が可能となり、曝露評価を実施する有効な方法であると言える。

### 参考文献

- 1) Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N.: *Science*, 3, 622-627 (2006).
- 2) Colvin, V. L.: *Nat. Biotechnol.*, 21, 10, 1166-1170 (2003).
- 3) Moore, M.N.: *Environ. Int.*, 32, 967-976 (2006)
- 4) Kroto, H.W., Heath, J.R., O' Brien, S.C., Curl, R.F., SamLley, R.E.: *Nature*, 318, 14, 162-163 (1985)
- 5) Dugan, L. L., Turetsky, D. M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., AlmLi, C. R., Shen, C. K. F., Luh, T. Y., Choi, D. W., Lin, T. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9434-9439 (1997)
- 6) Tokuyama, H., Yamago, S., Nakamura, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 7918-7919 (1993)
- 7) Friedman, S. H., DeCamp, D. L., Sijbesma, R. P., Srdanov, G., Wudl, F., Kenyon, G. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 6506-6509 (1993)
- 8) Sayes, C. M., Gobin, A. M., Ausman, K. D., Mendez, J., West, J. L., Colvin, V. L.: *Biomaterials*, 26, 7587-7595 (2005)
- 9) Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Prato, M.: *Eur. J. Med. Chem.*, 38, 11-12, 913-923 (2003)
- 10) Lovern, S.B., Klaper, R.: *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 4, 1132-1137 (2006)
- 11) Yamago, S., Tokuyama, H., Nakamura, E., Kikuchi, K., Kananishi, S., Sueki, K., Nakahara, H., Enomoto, S., Ambe, F.: *Chem. Biol.*, 2, 385-389 (1995)
- 12) Moussa, F., Pressac, M., Genin, E., Roux, S., Trivin, F., Rassat, A., Célin, R., Szwarc, H.: *J. Chromatogr. B*, 696, 153-159 (1997)
- 13) Xia, X. R., Monteiro-Riviere, N. A., Riviere, J. E.: *J. Chromatogr. A*, 1129, 216-222 (2006)
- 14) Moussa, F., Pressac, M., Genin, E., Roux, S., Trivin, F., Rassat, A., Célin, R., Szwarc, H.: *J. Chromatogr. B*, 696, 153-159 (1997)