

内閣府食品安全委員会
平成15年度食品安全確保総合調査

アマメシバ粉末中の毒性成分分析調査報告書

平成16年3月

(株)東レリサーチセンター

目 次

1. 目的	4
2. 試料	7
3. 試験材料	7
3.1 標準物質	7
3.2 溶媒	8
3.3 試薬	8
3.4 調製試薬	8
4. 使用機器等	9
5. 試験方法	9
5.1 LC/MS/MS	9
5.2 GC/MS	12
5.3 SDS-PAGE	13
5.4 ウェスタンブロッティング	14
5.5 質量分析	14
6. 結果	15
6.1 LC/MS/MS	15
6.2 GC/MS	15
6.3 リシンの測定	16
7. 考察	16
8. 参考文献	17
9. 添付資料	21

要 旨

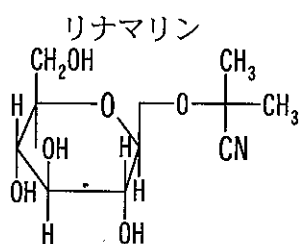
アマメシバ粉末試料 3 種類と、生アマメシバ 1 種類について、シアン配糖体 2 化合物 (リナマリ、アミグダリン)、ホルボール及びそのエステル 5 化合物 (ホルボール 12, 13-ジアセテート、ホルボール 12, 13-ジブチレート、ホルボール 12-ミリステート-13-アセテート、ホルボール 12, 13-ジペンゾエート、ホルボール 12, 13-ジデカノエート)、リシニンの含有量調査を行った。測定の結果、いずれの試料からも、シアン配糖体のリナマリがアマメシバ粉末試料で 60 ~ 110 $\mu\text{g/g}$ 、生アマメシバで 0.39 $\mu\text{g/g-wet}$ の濃度で検出された。

また、毒性タンパク質であるリシンについては、同じ試料を用いて、SDS-PAGE、抗リシン抗体を用いたウェスタンブロッティング及び質量分析による測定を行ったが、いずれの試料からもリシンは検出されなかった。

1. 目的

アマメシバ粉末試料 3 種類と、生アマメシバ 1 種類について、シアン配糖体 2 化合物 (リナマリ、アミグダリン)、ホルボール及びそのエステル 5 化合物 (ホルボール 12, 13-ジアセテート、ホルボール 12, 13-ジブチレート、ホルボール 12-ミリステート-13-アセテート、ホルボール 12, 13-ジベンゾエート、ホルボール 12, 13-ジデカノエート)、リシニン、リシンの含有量を調査することを目的とした。

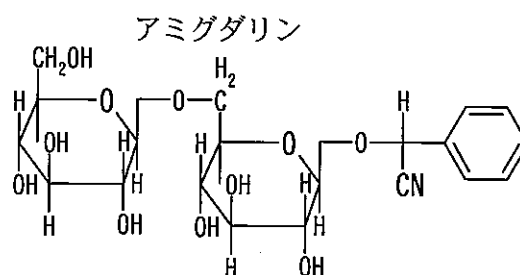
測定対象物質の構造式、組成式及び分子量等を以下に示した。



組成式 : $C_{10}H_{17}NO_6$

分子量 : 247

CAS No. : 554-35-8

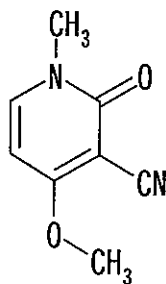


組成式 : $C_{20}H_{27}NO_{11}$

分子量 : 457

CAS No. : 29883-15-6

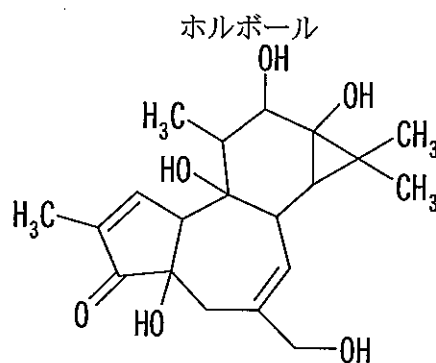
リシニン



組成式 : $C_8H_8N_2O_2$

分子量 : 164

CAS No. : 524-40-3

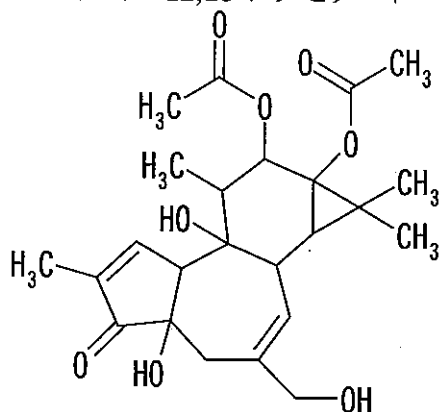


組成式 : $C_{20}H_{28}O_6$

分子量 : 364

CAS No. : 17673-25-5

ホルボール 12,13-ジアセテート

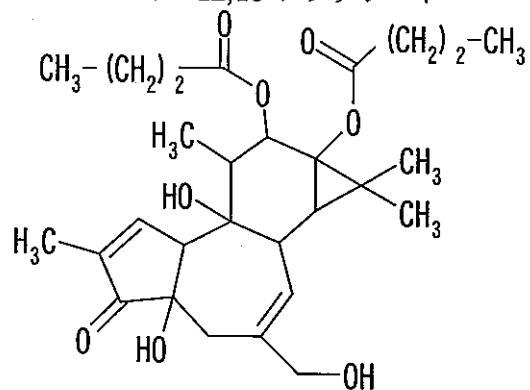


組成式 : $C_{24}H_{32}O_8$

分子量 : 448

CAS No. : 24928-15-2

ホルボール 12,13-ジブチレート

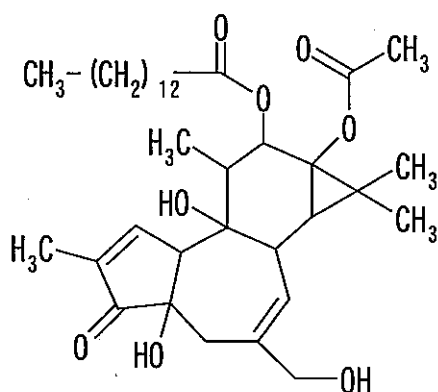


組成式 : $C_{28}H_{40}O_8$

分子量 : 504

CAS No. : 37558-16-0

ホルボール 12-ミリステート-13-アセテート

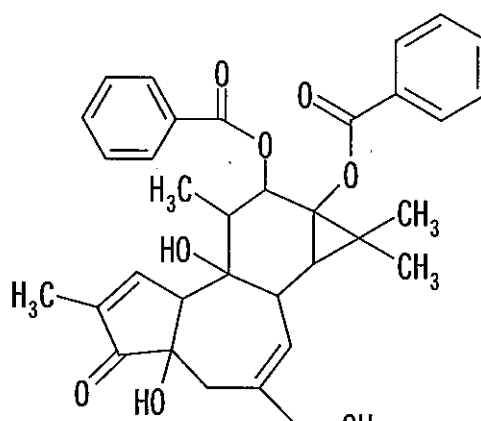


組成式 : $C_{36}H_{56}O_8$

分子量 : 616

CAS No. : 16561-29-8

ホルボール 12,13-ジベンゾエート

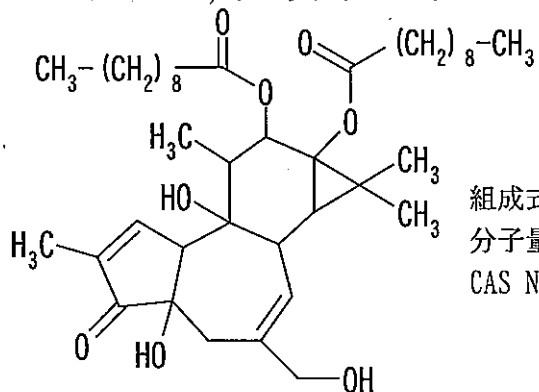


組成式 : $C_{34}H_{36}O_8$

分子量 : 572

CAS No. : 25405-85-0

ホルボール 12,13-ジデカノエート



組成式 : $C_{40}H_{64}O_8$

分子量 : 672

CAS No. : 27536-56-7

リシン

リシンのアミノ酸配列を以下に示した。分子量約 65,000 の糖タンパク質で、A 鎖部分 (36~302) と B 鎖部分 (315~576) がジスルフィド結合で結ばれた構造とされている。

10	20	30	40	50	60
mkpggntivi wmyavatwlc fgstsgwsft lednnifpkq ypiinfntag atvqsytnfi					
70	80	90	100	110	120
ravrgrlttg advrheipvl pnrvglpinq rfilvelsnh aelsvtlald vtnayvgyr					
130	140	150	160	170	180
agnsayffhp dnqedaait hlftdvqnry tfafggnydr leqlagnlre nielngnple					
190	200	210	220	230	240
eaisalyyys tggatqlptla rsfiiciqmi seaarfgyie gemrtriryn rrsapdpsvi					
250	260	270	280	290	300
tlenswgrls taiquesnaga faspqlqrr ngskfsvydv silipiialm vycappss					
310	320	330	340	350	360
qfslirpvv pnfadvcmnd pepivrivgr nglcvdvrdd rfhngnaiql wpcksntdan					
370	380	390	400	410	420
qlwtlkrdnt irsngkcltt ygyspgvyvm iydentatd atrwqiwdng tiinprsslv					
430	440	450	460	470	480
laatsgnsgr tltvqtniya vsqgwlptnn tqpfvtivg lyglclqans gqvwiess					
490	500	510	520	530	540
ekaeqqwaly adgsirpqn rdncitdsdn iretvvkils cgpssgqrw mfkndgtln					
550	560	570			
lysglvldvr asdpslkqii lyplhgdpnq iwlplf					

* 略記号

a: アラニン、c: システイン、d: アスパラギン酸、e: グルタミン酸、
 f: フェニルアラニン、g: グリシン、h: ヒスチジン、i: イソロイシン、
 k: リシン、l: ロイシン、m: メチオニン、n: アスパラギン、p: プロリン、
 q: グルタミン、r: アルギニン、s: セリン、t: トレオニン、v: バリン、
 w: トリプトファン、y: チロシン

2. 試料

(1) よこださん家のあまめしば (以下 試料 A)

原材料 : あまめしば
製造元 : 日本ランチェスター工業株式会社
販売者 : 株式会社一條
賞味期限 : 05. 01. 07
形状 : 緑色粉末

(2) 天芽パウダー (以下 試料 B)

原材料 : 天芽
製造元 : 沖縄県天芽生産組合
総販売元 : ベルフレッシュ株式会社
賞味期限 : 2004. 04. 25
形状 : 緑色粉末

(3) 久司道夫のあまめしば (以下 試料 C)

賞味期限 : 15. 1. 10
形状 : 緑色粉末

名古屋市の70歳代女性(母)、及び50歳代女性(娘)が2002年4月頃に、母娘とも閉塞性細気管支炎を発症し、当該アマメシバ粉末製品が原因の可能性が考えられた。

本試料は、患者同意の上、名古屋市健康福祉局を通じて入手したものである。

(4) 生アマメシバ (以下 試料 D)

入手先 : 沖縄県天芽生産組合
形状 : 生アマメシバ

以上 4 検体

3. 試験材料

3.1 標準物質

Phorbol : Calbiochem, Lot B53858
Phorbol 12, 13-Diacetate : シグマ アルドリッチ, Lot 018H0752
Phorbol 12, 13-Dibutyrate : シグマ アルドリッチ, Lot 102K1382
Phorbol 12, 13-Dibenzoate : シグマ アルドリッチ, Lot 54H1035
Phorbol 12-Myristate, 13-Acetate : シグマ アルドリッチ, Lot 122K1590
Phorbol 12, 13-Didecanoate : 和光純薬, Lot ECM3377
Ricinine : フナコシ, Lot 821. 030
Linamarin : Calbiochem, Lot 810302
Amygdalin : 和光純薬, 1 級, Lot PKL0130
Ricin : 和光純薬, Ricin 120 Solution (2. 5 mg/mL),
Lot ASK7868
Fluoranthene-d₁₀ : 関東化学, 環境分析用

3.2 溶媒

メタノール	: 関東化学、高速液体クロマトグラフィー用
ヘキサン	: 関東化学、残留農薬試験・PCB 試験用
アセトン	: 和光純薬、高速液体クロマトグラフ用
ジクロロメタン	: 関東化学、残留農薬試験・PCB 試験用
アセトニトリル	: 和光純薬、高速液体クロマトグラフ用

3.3 試薬

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液	: 関東化学、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (N/10)
0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液	: 関東化学、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (N/2)
0.5 mol/L 塩酸水溶液	: 関東化学、0.5 mol/L 塩酸 (N/2)
グラジエントゲル	: TEFCO、SDS-PAGE mini
マーカー	: TEFCO、タンパク質分子量マーカー
還元サンプルバッファー (2×)	: TEFCO、SDS バッファーキット SDS-PAGE 用
非還元サンプルバッファー (2×)	: TEFCO、SDS バッファーキット SDS-PAGE 用
CBB 染色液・脱色液	: TEFCO、染・脱色バッファーキット
ウェスタンブロットティング検出キット	: Amersham Bioscience、ECL Plus Start Kit
1 次抗体	: Chemicon、Goat 抗 Ricin A Chain ポリクローナル抗体
2 次抗体	: Chemicon、抗 Goat-IgG 抗体-HRP
n-ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	: 和光純薬、生化学用
酢酸	: 国産化学、特級
無水酢酸ナトリウム	: ナカライテスク、特級
無水硫酸ナトリウム	: 関東化学、残留農薬試験・PCB 試験用
酢酸アンモニウム	: 関東化学、特級
ペクトリアーゼ Y-23	: キッコーマン
セルラーゼオノズカ RS	: ヤクルト薬品工業

3.4 調製試薬

(1) 500 m mol/L 酢酸水溶液

酢酸 3.003 g を秤量後、超純水で 100 mL とし、500 m mol/L 酢酸水溶液とした。

(2) 500 m mol/L 酢酸ナトリウム水溶液

無水酢酸ナトリウム 4.102 g を秤量し、超純水で 100 mL とし、500 m mol/L 酢酸ナトリウム水溶液とした。

(3) 酢酸ナトリウムバッファー

500 m mol/L 酢酸水溶液と 500 m mol/L 酢酸ナトリウム水溶液を合わせた後、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液または 0.5 mol/L 塩酸水溶液を用いて、pH を 4.5 に調整し、酢酸ナトリウムバッファーとした。

(4) 抽出用酵素液

ペクトリアーゼ Y-23 を 10.0 mg、セルラーゼオノズカ RS を 10.0 mg を秤量し 100 mL 容量のメスフラスコに入れた。少量の酢酸ナトリウムバッファーで溶解し、同溶媒を標線まで加え、抽出用酵素液とした。

(5) 2 % SDS

n-ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 2 g を秤量し、超純水で 100 mL とし、2 % SDS とした。

(6) 10 % SDS

n-ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 10 g を秤量し、超純水で 100 mL とし、10 % SDS とした。

4. 使用機器等

ホモジナイザー	: POLYTRON、PT 2100
セミマイクロ電子天秤	: METTLER TOLEDO AG204 (表示最小値 0.1 mg)
電子上皿天秤	: 島津製作所、LIBROR EB-3200H (表示最小値 0.01 g)
遠心分離器	: 日立工機、himac CF 16 RX
ロータリーエバポレーター	: 東京理化器械、N-1000V
微量高速冷却遠心器	: トミー、MR-150
ボルテックスミキサー	: VORTEX、GENIE 2
超純水製造装置	: MILLIPORE、Milli-Q

LC/MS/MS

高速液体クロマトグラフ	: 島津製作所、LC-10 Avp
タンデム四重極型質量分析計	: サーマエレクトロン、TSQ-7000

GC/MS

ガスクロマトグラフ	: サーマクエスト、Trace 2000
四重極型質量分析計	: サーマクエスト、Voyager

MALDI-TOF MS	: Bruker daltonics、BIFLEX III
--------------	-------------------------------

5. 試験方法

5.1 LC/MS/MS

5.1.1 対象成分

シアン配糖体 (リナマリン、アミグダリン)、リシニン、ホルボール及びそのエステル (ホルボール 12, 13-ジアセテート、ホルボール 12, 13-ジブチレート、ホルボール 12-ミリステート-13-アセテート、ホルボール 12, 13-ジベンゾエート、ホルボール 12, 13-ジデカノエート)

5.1.2 標準溶液の調製

(1) 標準物質保存溶液

標準物質をメタノールに溶解し、下の表に示す濃度に調製して、使用まで、-30 °C で保管した。

標準物質保存溶液の濃度

測定対象物質	保存溶液濃度
Phorbol	0.50 mg/mL
Phorbol 12, 13-Diacetate	0.50 mg/mL
Phorbol 12, 13-Dibutyrate	0.50 mg/mL
Phorbol 12, 13-Dibenzoate	0.10 mg/mL
Phorbol 12-Myristate, 13-Acetate	0.50 mg/mL
Phorbol 12, 13-Didecanoate	0.10 mg/mL
Ricinine	1.00 mg/mL
Linamarin	1.00 mg/mL
Amygdalin	1.01 mg/mL

(2) 標準物質 Working 溶液

標準物質保存溶液の一定量を、正確にメタノールで希釈し、1 $\mu\text{g/mL}$ と 10 $\mu\text{g/mL}$ の Working 溶液を調製した。標準物質 Working 溶液は、用事調製した。

測定対象物質	1 $\mu\text{g/mL}$ Working 溶液		10 $\mu\text{g/mL}$ Working 溶液	
	保存溶液 採取量	調製後の濃度	保存溶液 採取量	調製後の濃度
Phorbol	20 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	200 μL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Phorbol 12, 13-Diacetate	20 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	200 μL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Phorbol 12, 13-Dibutyrate	20 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	200 μL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Phorbol 12, 13-Dibenzoate	100 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	1mL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Phorbol 12-Myristate, 13-Acetate	20 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	200 μL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Phorbol 12, 13-Didecanoate	100 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	1 mL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Ricinine	10 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	100 μL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Linamarin	10 μL	1.00 $\mu\text{g/mL}$	100 μL	10.0 $\mu\text{g/mL}$
Amygdalin	10 μL	1.01 $\mu\text{g/mL}$	100 μL	10.1 $\mu\text{g/mL}$

*Working 溶液は、全量 10 mL に調製した。

5.1.3 前処理

測定方法は、Vogg[1]らの手法を参考に行った。

試料 A、B、C をそれぞれ、1.00 g、試料 D を 6.34 g 秤量し、50 mL 容量のガラス製遠沈管に入れた。遠沈管にメタノール 40 mL を加え、氷水中で遠沈管を冷却しながら、ホモジナイザーで 5 分間抽出した。抽出後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}\text{C}$) し、上清を

ナス型フラスコに入れた。沈殿物に、更にメタノール 40 mL を加え、氷水中で冷却しながら、ホモジナイザーで 5 分間抽出した。遠心分離 (3,000 rpm、5 分間、4 °C) 後、上清を先のナス型フラスコに加えた。上清を、ロータリーエバポレーター (38 °C) で約 5 mL まで濃縮した。遠心分離 (3,000 rpm、5 分間、4 °C) し、メタノールで正確に 10 mL とし、抽出溶液とした。

5.1.4 測定

シアン配糖体、リシニン、ホルボール及びそのエステル類の標準物質 Working 溶液と、試料溶液 10 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムから検量線を作成し、試料 A~D 中の各測定対象物質の濃度を調査した。

LC/MS/MS 測定条件

LC 部

装置	: 高速液体クロマトグラフ LC-10 Avp (島津製作所)
分析カラム	: Mightysil RP-18 GP 100 mm $\times$ 2.0 mm I.D.、粒子径 5 μ m (関東化学)
ガードカラム	: Mightysil RP-18 GP 5 mm $\times$ 2.0 mm I.D.、粒子径 5 μ m (関東化学)

移動相

溶離液 A	: 1 m mol/L 酢酸アンモニウム水溶液
溶離液 B	: 1 m mol/L 酢酸アンモニウムアセトニトリル溶液
グラジエント条件	: A/B 90/10 (開始時) $\rightarrow$ 70/30 (10 分後) $\rightarrow$ 10/90 (18 分後) $\rightarrow$ 28 分後まで保持
流速	: 0.2 mL/min
カラム槽温度	: 40 °C
注入量	: 10 μ L

MS 部

装置	: タンデム四重極型質量分析計 TSQ-7000 (Thermo Electron)
イオン化法	: エレクトロスプレー大気圧イオン化法 (ESI)
検出方法	: Positive SRM 法
キャピラリー温度	: 250 °C
ESI スプレー電圧	: 4.5 kv
コリジョンガス	: アルゴン 1.5 m Torr

モニターイオン

	測定対象 化合物名	Parent Ion (m/z)	Daughter Ion (m/z)	Width (m/z)	Scan Time (s)	Collision Energy
測定条件 1	Amigdalinal	475	163	0.6	0.2	20
	Ricinine	165	138	0.6	0.2	22
	Linamarin	265	103	0.6	0.2	23
	Phorbol	382	365	0.6	0.2	15
測定条件 2	Phorbol 12, 13- diacetate	466	311	0.6	0.2	15
	Phorbol 12, 13- dibutyrate	417	311	0.6	0.2	15
	Poorbol 12-Myristate 13-Acetate	389	311	0.6	0.2	20
	Phorbol 12, 13- dibenzoate	451	311	0.6	0.2	20
	Phorbol 12, 13- didecanoate	501	311	0.6	0.2	20

*測定条件：測定は条件1と2の2回測定を行い、測定条件1でアミグダリン、リシニン、リナマリン、ホルボールを、測定条件2でホルボール 12, 13-ジアセテート、ホルボール 12, 13-ジブチレート、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート、ホルボール 12, 13-ジベンゾエート、ホルボール 12, 13-ジデカノエートを測定した。

5.2 GC/MS

5.2.1 対象成分

リシニン

5.2.2 標準溶液の調製

(1) 標準物質保存溶液

5.1.2 (1) に同じ。

(2) 標準物質 Working 溶液

5.1.2 (2) に同じ。

(3) 内標準物質保存溶液の調整

Fluoranthene-d₁₀ 10.0 mg を精秤し、10 mL 容量のメスフラスコに入れ、少量のメタノールで溶解した。同溶媒を標線まで加え、内標準物質保存溶液とした。内標準物質保存溶液は - 30 ℃ で保管した。

(4) 内部標準物質 Working 溶液の調製

内部標準物質保存溶液 10 μ L を、10 mL 容量メスフラスコに入れ、メタノールを標線まで加え、内部標準物質 Working 溶液を調製した。内部標準物質 Working 溶液は、用事調製した。

5.2.3 前処理

(1) 抽出

5.1.3 に同じ。

(2) 精製

抽出溶液 1 mL を正確に採取し、試験管に入れ、ヘキサン 1 mL を加えた。ボルテックスミキサーで攪拌後、ヘキサン層を取り除いた。更に、ヘキサン 1 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、ヘキサン層を取り除いた。残留した抽出溶液を、窒素気流下で約 0.2 mL まで濃縮した後、ジクロロメタン 1 mL を加えた。無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間, 4 $^{\circ}$ C) した。上清を採取し、試験管に入れた。回収した溶液に、Microman M50 を用いて内部標準物質 Working 溶液 50 μ L を添加 (50 ng Fluoranthene- d_{10} 相当) し、リシニンの GC/MS 測定用溶液とした。

5.2.4 測定

リシニンの標準物質 Working 溶液 1 μ L を GC/MS に注入し、得られたクロマトグラムから検量線を作成し、リシニン含有量を測定した。

GC/MS 測定条件

装置	: GC 部 Trace 2000 (サーモクエスト) MS 部 Voyager (サーモクエスト)	
分離カラム	: BPX-50 25 m $\times$ 0.22 mm I.D. $\times$ 0.25 μ m Film	
注入方法	: スプリットレス注入法 (スプリットレス時間 1 分間)	
注入量	: 1 μ L	
注入口温度	: 270 $^{\circ}$ C	
キャリアーガス	: He (1.4 mL/min)	
カラム温度	: 60 $^{\circ}$ C (1 分間保持) -- 10 $^{\circ}$ C/min 昇温 -- >300 $^{\circ}$ C (3 分間保持)	
インターフェース温度	: 280 $^{\circ}$ C	
イオン源温度	: 250 $^{\circ}$ C	
モニターイオン	: リシニン	m/z 164, m/z 121
	: フルオランテン- d_{10}	m/z 212

5.3 SDS-PAGE

5.3.1 対象成分

リシニン

5.3.2 前処理

測定方法は Darby [2] らの手法を参考に行った。

試料 A、B、C それぞれ 5.0 mg を秤量し、抽出用酵素液を 100 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C の水浴中で 16 時間反応させた。反応後の溶液に、0.1 mol/L NaOH 水溶液 2 μ L、10 % SDS を 25 μ L 加えてホモジナイザーで破碎した。遠心分離 (14,000 rpm、3 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清をリシン測定用タンパク質抽出溶液とした。

試料 D 1.9 g をはさみで細断後、乳鉢でペースト状になるまですりつぶした。抽出用酵素液を 5 mL 加え、37 $^{\circ}$ C の水浴中で 16 時間反応させた。反応後の溶液に、0.1 mol/L NaOH 水溶液を 100 μ L、10 % SDS を 1.625 mL 加えてホモジナイザーで破碎後、遠心分離 (14,000 rpm、3 分間、4 $^{\circ}$ C) し、上清をリシン測定用タンパク質抽出溶液とした。

5.3.3 測定

試料 A、B、C 及び D のリシン測定用タンパク質抽出溶液と、超純水で 5 倍希釈した標準物質 (0.5 mg/mL) それぞれを 10 μ L 採取し試験管に入れた。10 μ L 各溶液を 2 つずつ用意し、一方に還元サンプルバッファー (2 $\times$) 10 μ L を添え、一方に非還元サンプルバッファー (2 $\times$) 10 μ L を添えた。試験管内の溶液全量を、4 - 20 % グラジエントゲルを用いて、18 mA 定電流で 90 分間泳動した。

電気泳動終了後、CBB 染色液で 30 分染色し、脱色液で脱色した。

5.4 ウェスタンブロッティング

5.4.1 対象成分

リシン

5.4.2 前処理

5.3.2 に同じ。

5.4.3 測定

試料 A、B、C 及び D のリシン測定用タンパク質抽出溶液と、5、50、500 ng になるように超純水で希釈した標準物質について、それぞれ 10 μ L 採取し、試験管に入れた。10 μ L 各溶液を 2 つずつ用意し、一方に還元サンプルバッファー (2 $\times$) 10 μ L を添え、一方に、非還元サンプルバッファー (2 $\times$) 10 μ L を添え、電気泳動に供する試料溶液とした。試験管内の溶液全量を、4 - 20 % グラジエントゲルを用いて、18 mA 定電流で 90 分間泳動した。

ウェスタンブロッティング検出キットを用い、PVDF メンブレンフィルターに 100 V 定電圧で 1 時間転写した。メンブレンフィルターをブロッキングバッファーに浸し、室温で 1 時間振盪した後、1 次抗体 (希釈倍率 1:1000)、2 次抗体 (希釈倍率 1:100000) を順次加えて、各 1 時間反応させた。検出はウェスタンブロッティング検出キット内の、ECL-Plus 検出試薬を用いて 30 分間露光させて行った。

5.5 質量分析

5.5.1 対象成分

リシン

5.5.2 前処理

5.3.2 に同じ。

5.5.3 測定

試料 A、B、C 及び D のリシン測定用タンパク質抽出溶液 10 μ L を採取し、試験管に入れた。氷冷アセトン 100 μ L を加え、 -80°C で 1 時間静置し、遠心分離 (14,000 rpm、15 分間、 4°C) した。沈殿物を超純水に溶解し、遠心分離 (14,000 rpm、15 分間、 4°C) した。上清を新しい試験管に移し替え、試料溶液とした。試料溶液とリシン標準物質それぞれ 0.5 μ L に 10 mg Sinapinic acid/mL (0.1 % TFA 水溶液:アセトニトリル=1:1) を混合し、以下の条件で質量分析を行った。

装置	: BIFLEX III (Bruker daltonics)
イオン化	: N_2 レーザー (337 nm)
加速電圧	: 19 kV
測定モード	: Positive/Linear
マトリックス	: Sinapinic acid
質量校正	: Protein calibration standard II (Bruker daltonics)
以下の 3 点で校正	
Trypsinogen ($[\text{M}+\text{H}]^+=23982$)	
Protein A ($[\text{M}+\text{H}]^+=44613$)	
Albumin-Bovine ($[\text{M}+\text{H}]^+=66431$)	

6. 結果

6.1 LC/MS/MS

シアン配糖体、リシニン、ホルボール及びそのエステル類について LC/MS/MS 法で同時測定を行った。図 1~3 のように、ホルボール 12,13-ジデカノエートは 0.05 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で、その他の成分は 0.05 ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性が認められた。検出下限値は 0.05 $\mu\text{g/mL}$ であり、試料重量当たりの検出下限値は、試料 A、B 及び C で 0.5 $\mu\text{g/g}$ 、試料 D で 0.08 $\mu\text{g/g-wet}$ と算出された。

試料について測定した結果、いずれの試料からもリナマリンが、試料 A、B、C でそれぞれ 76、60、110 $\mu\text{g/g}$ 、試料 D で 0.39 $\mu\text{g/g-wet}$ の濃度で検出された (表 1)。その他の化合物についてはいずれの試料からも検出されなかった。

なお、リナマリンの同定に当たっては、試料溶液とリナマリン Working 溶液のクロマトグラム上のピークのリテンションタイムが同じであること、リナマリン (分子量 247) にアンモニウムイオンが付加した Parent ion (m/z 265) に対し、衝突誘起解離により生成した Daughter ion (m/z 103) が一致していることから、検出された成分がリナマリンである確率は非常に高いと考えられた。

6.2 GC/MS

リシニンについて、GC/MS 法で測定した。結果 (図 4) に示すように、0.05 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性が認められた。検出下限値は 0.05 $\mu\text{g/mL}$ であり、試料重量当たりの検出下限値は、試料 A、B 及び C で 0.5 $\mu\text{g/g}$ 、試料 D で 0.08 $\mu\text{g/g-wet}$ と算出された。

試料について測定した結果、いずれの試料からもリシニンは検出されなかった(表 1)。

6.3 リシンの測定

6.3.1 SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング

試料 A、B、C の SDS-PAGE 泳動像を添付資料 18 に示した。標準物質においては、還元条件下では 32 ~ 34 kDa 付近に 3 本のバンドが確認され、非還元条件下では 150 ~ 180 kDa と 65 kDa 付近にバンドが確認された。試料 A、B、C においては、30 kDa と 55 kDa にやや濃いバンドが確認されたが、標準物質と同じ分子量には還元条件、非還元条件ともバンドは確認されなかった。

また、試料 A、B、C のウェスタンブロッティングの結果を添付資料 19 に示した。標準物質の結果は SDS-PAGE の結果と一致した。試料 A、B、C については、標準物質と同じ分子量にはバンドは確認されなかった。その他のバンドについては、(1) 標準物質と分子量が異なること、(2) SDS-PAGE で濃く検出されたバンドであること、(3) 使用した 1 次抗体がポリクローナルであることから、非特異的に反応したバンドであると考えられた。

試料 D の SDS-PAGE 泳動像を添付資料 20 に示した。標準物質においては、還元条件下では 32~34 kDa 付近に 3 本のバンドが確認され、非還元条件下では 150~180 kDa と 65 kDa 付近にバンドが確認された。試料 D においては、標準物質と同じ分子量には還元条件、非還元条件ともバンドの確認はできなかった。

試料 D のウェスタンブロッティングの結果を添付資料 21 に示した。標準物質の結果は SDS-PAGE の結果と一致した。試料 D においては、標準物質と同じ分子量には薄いバンドが確認されたが、(1) 非還元条件下の試料でも同じ位置にバンドが確認されたこと、(2) 非還元条件下の標準物質と同じ位置には試料では検出されなかったこと、(3) 使用した 1 次抗体がポリクローナルであることから、非特異的に反応したバンドであると考えられた。

6.3.2 質量分析

標準物質と各試料のマスマスペクトルを添付資料 22~26 に示した。標準物質では 65 kDa にリシンのピークが検出されたが、いずれの試料においてもリシンのピークは検出されなかった。

7. 考察

アマメシバ粉末試料 3 種類と、生アマメシバ 1 種類について、シアン配糖体 2 化合物(リナマリ、アミグダリン)、ホルボール及びそのエステル 5 化合物(ホルボール 12, 13-ジアセテート、ホルボール 12, 13-ジブチレート、ホルボール 12-ミリステート-13-アセテート、ホルボール 12, 13-ジベンゾエート、ホルボール 12, 13-ジデカノエート)、リシニン、リシンの含有量調査を行った。測定の結果(表 1)、いずれの試料からも、シアン配糖体であるリナマリが LC/MS/MS 法で検出された。今回検出された成分は、LC でのリテンションタイム、イオン化時の生成イオン(m/z 265) 及び解離時のフラグメントイオン(m/z 103) が、リナマリンの標準物質測定時と一致したことより、リナマリであると同定した。その他の測定対象化学物質は、いずれの試料からも検出されなかった。

8. 参考文献

[1] G. Vogg, S. Achatz, A. Kettrup, H. Sandermann Jr., J. Chromatogr. A, 855 (1999) 563-573

[2] Shauna M. Darby, Merk L. Miller, Ralph O. Allen, J Forensic Sci 2001 ;46 (5) :1033-1042

表 1 測定結果

試料名 対象物質名	試料 A ($\mu\text{g/g}$)	試料 B ($\mu\text{g/g}$)	試料 C ($\mu\text{g/g}$)	試料 D ($\mu\text{g/g-wet}$)	測定方法
アミグダリン	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
リシニン	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	GC/MS
リナマリ	76	60	110	0.39	LC/MS/MS
ホルボール	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
ホルボール 12, 13-ジアセテート	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
ホルボール 12, 13-ジブチレート	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
ホルボール 12, 13-ジベンゾエート	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
ホルボール 12, 13-ジデカノエート	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	LC/MS/MS
リシン	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	SDS-PAGE
	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	ウェスタン ブロッティング
	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	質量分析計

N. D. : 検出下限値未満

* 試験は $n = 1$ で行った。

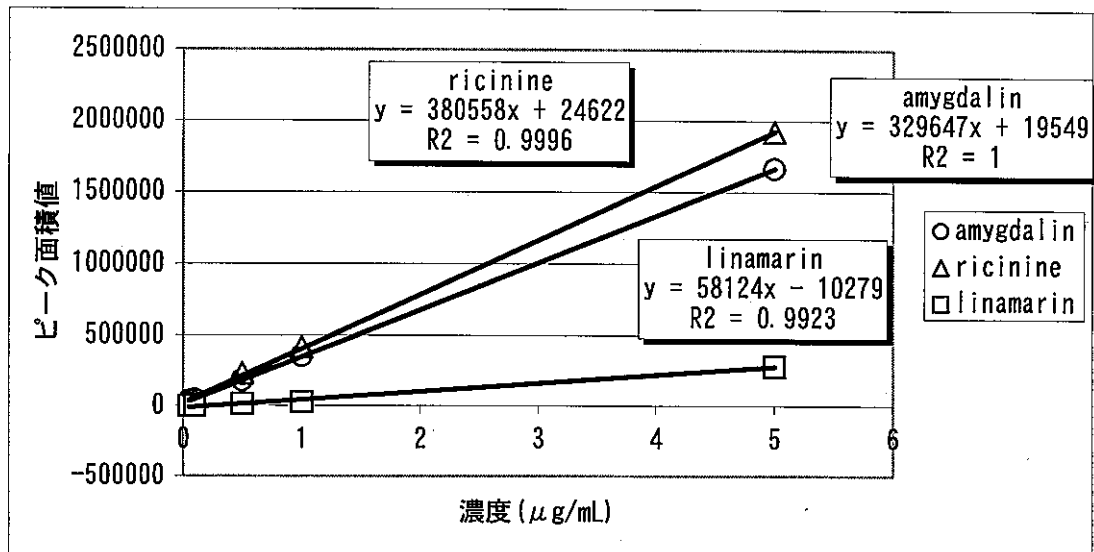


図 1 アミダグリン、リナマリン、リシニンの検量線 (LC/MS/MS 法)

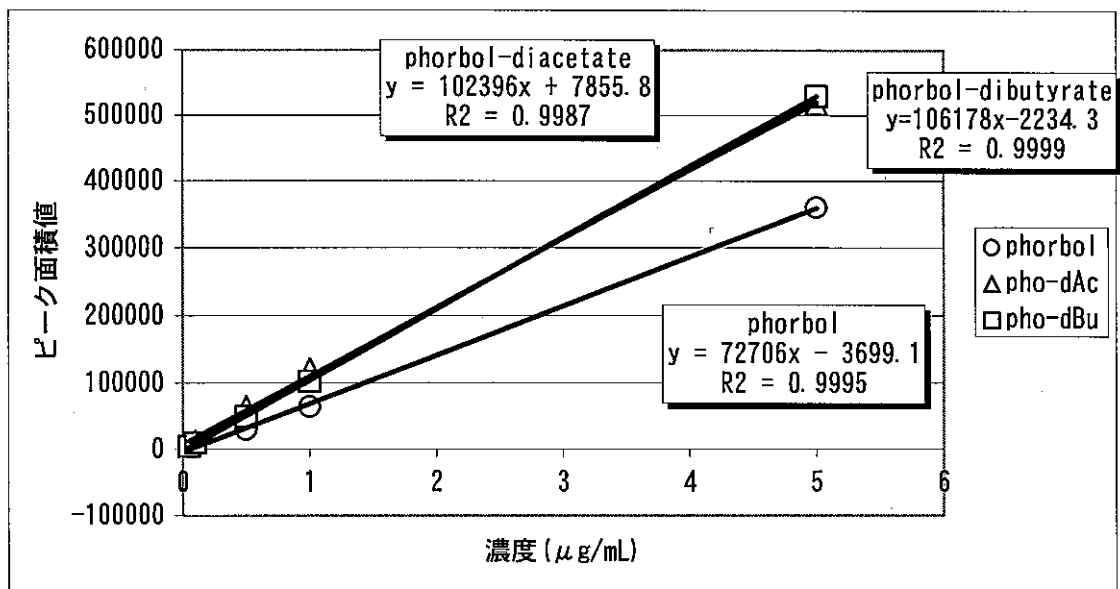


図 2 phorbol、phorbol 12,13-diacetate、phorbol 12,13-dibutyrate の検量線
(LC/MS/MS 法)

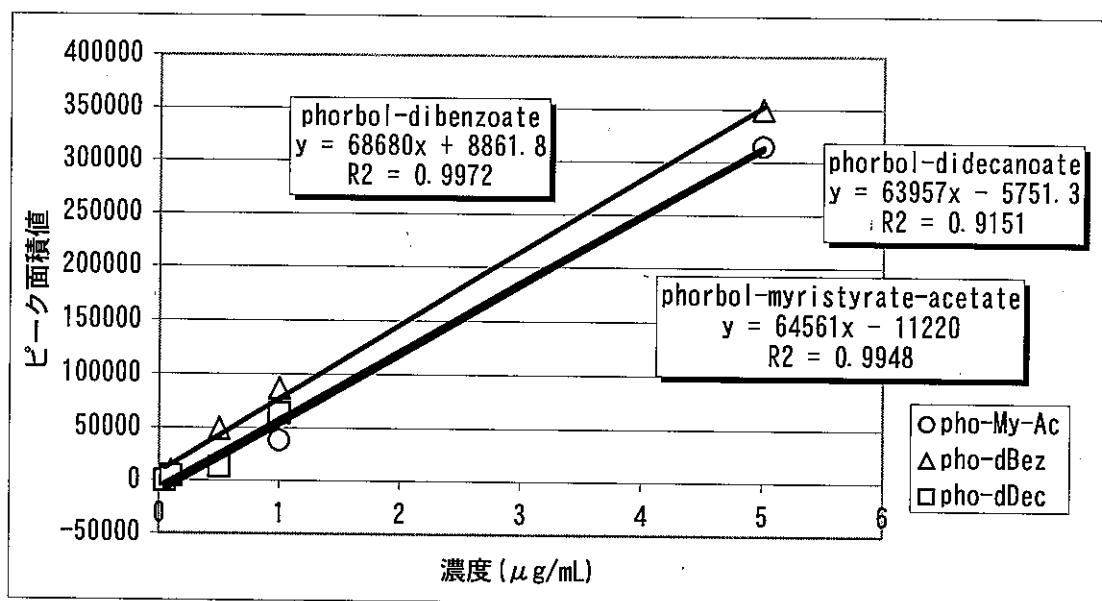


図 3 phorbol 12-myristate 13-acetate、phorbol 12, 13-didecanoate、
phorbol 12, 13-dibenzoate の検量線 (LC/MS/MS 法)

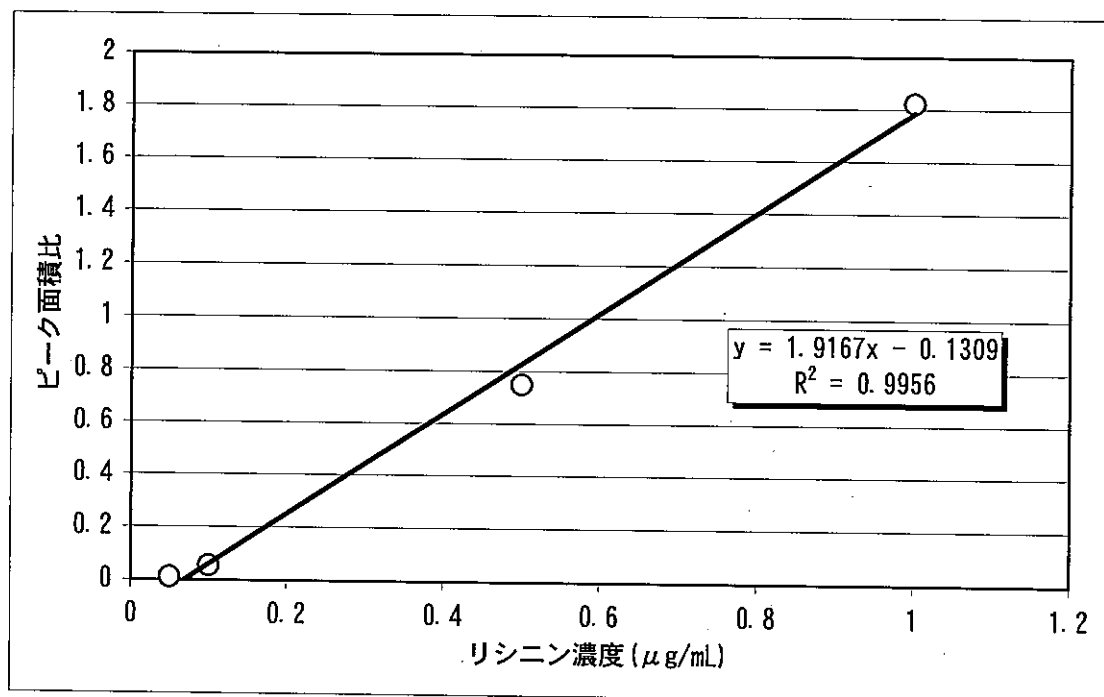


図 4 リシニンの検量線 (GC/MS 法)

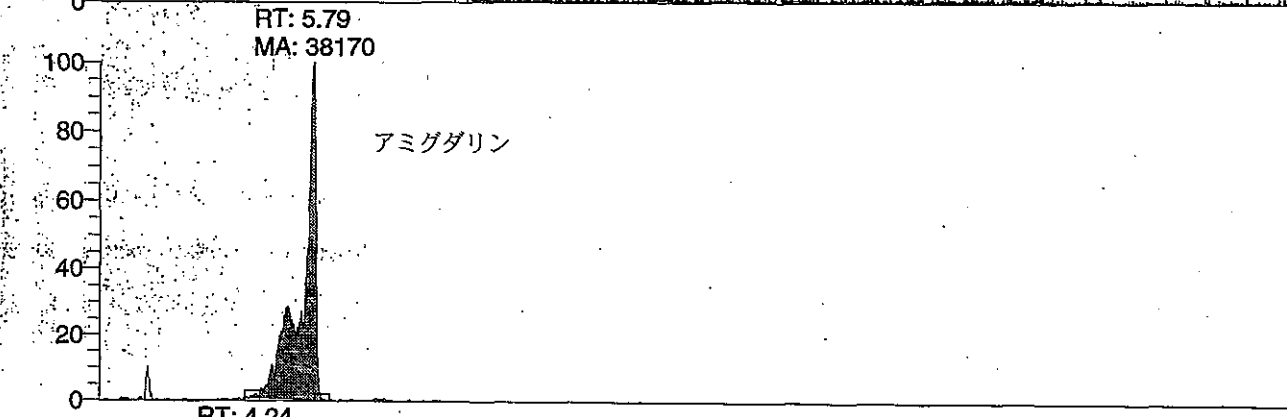
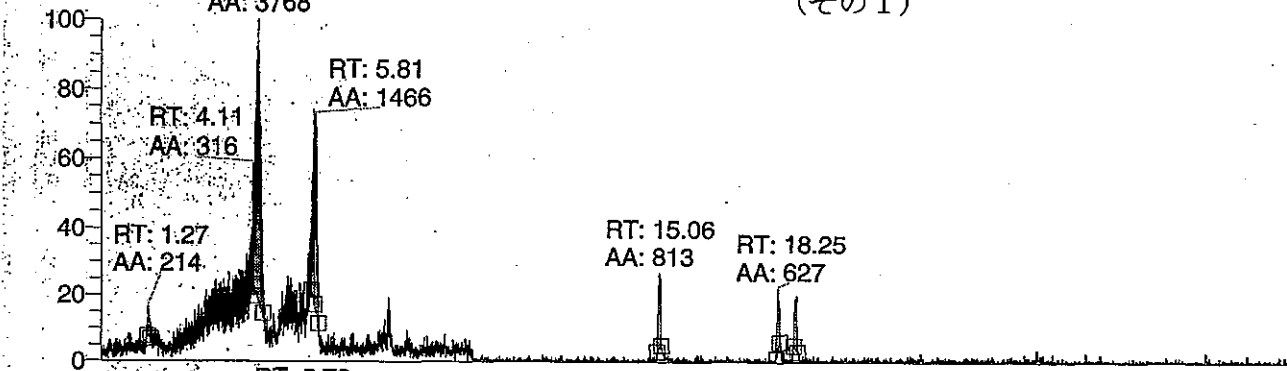
9. 添付資料

- 添付資料 1 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 2 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 3 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 4 1 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 5 5 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 6 試料 A のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 7 試料 B のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 8 試料 C のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 9 試料 D のクロマトグラム (LC/MS/MS)
- 添付資料 10 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 11 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 12 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 13 1 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 14 試料 A のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 15 試料 B のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 16 試料 C のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 17 試料 D のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)
- 添付資料 18 試料 A、B、C の SDS-PAGE 泳動像
- 添付資料 19 試料 A、B、C のウェスタンブロッティング
- 添付資料 20 試料 D の SDS-PAGE 泳動像
- 添付資料 21 試料 D のウェスタンブロッティング
- 添付資料 22 リシン標準物質のマスペクトル
- 添付資料 23 試料 A のマスペクトル
- 添付資料 24 試料 B のマスペクトル
- 添付資料 25 試料 C のマスペクトル
- 添付資料 26 試料 D のマスペクトル

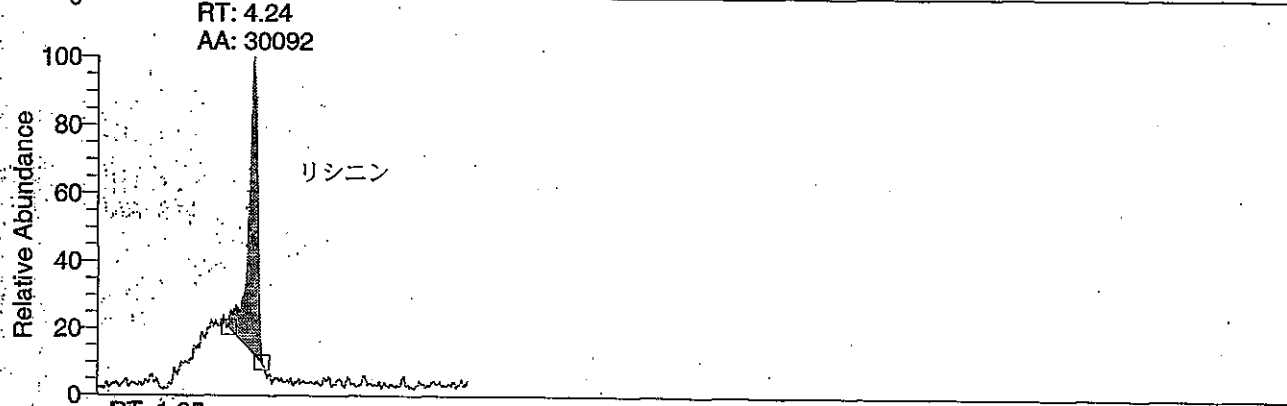
RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B
RT: 4.26
AA: 3768

添付資料 1 0.05 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)

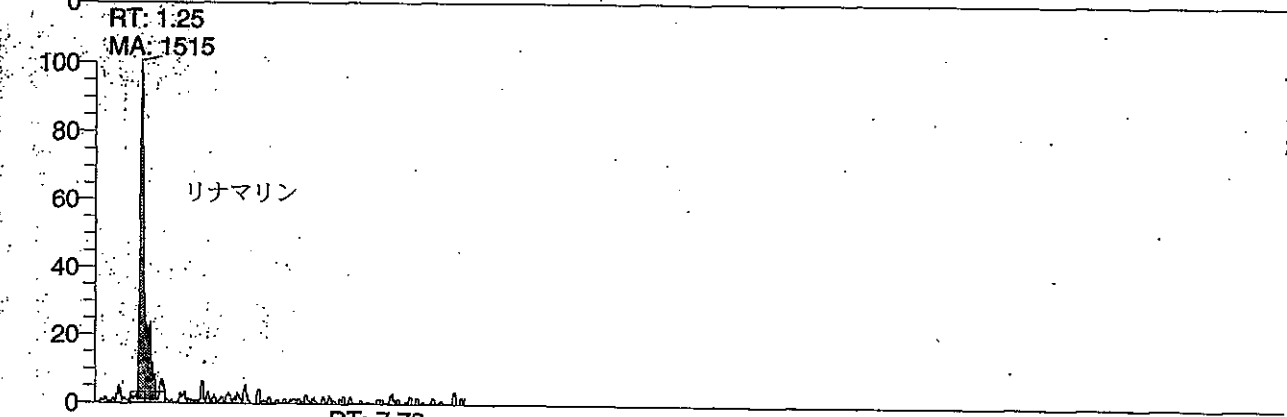
NL:
9.07E2
TIC MS
040323d@02



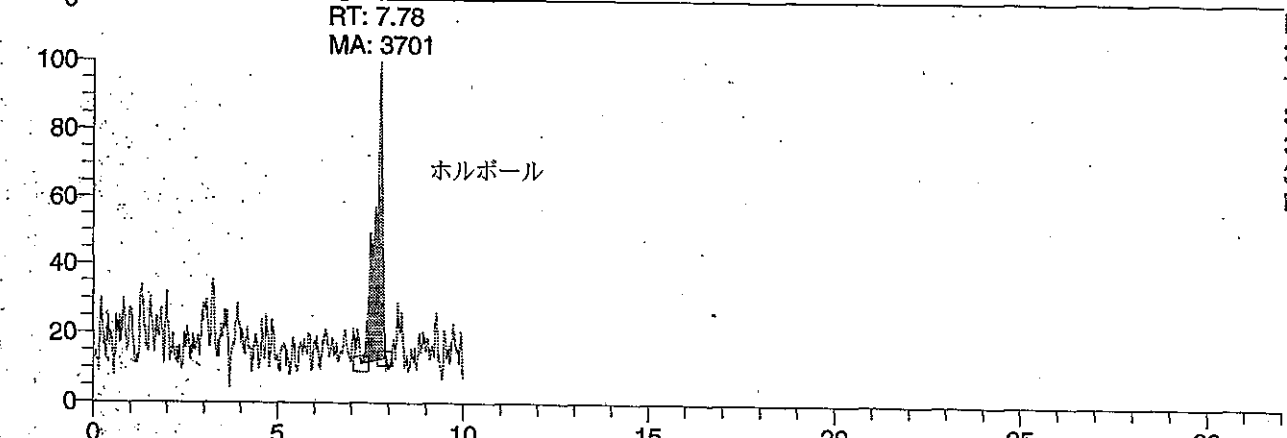
NL:
1.58E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@02



NL:
2.11E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@02



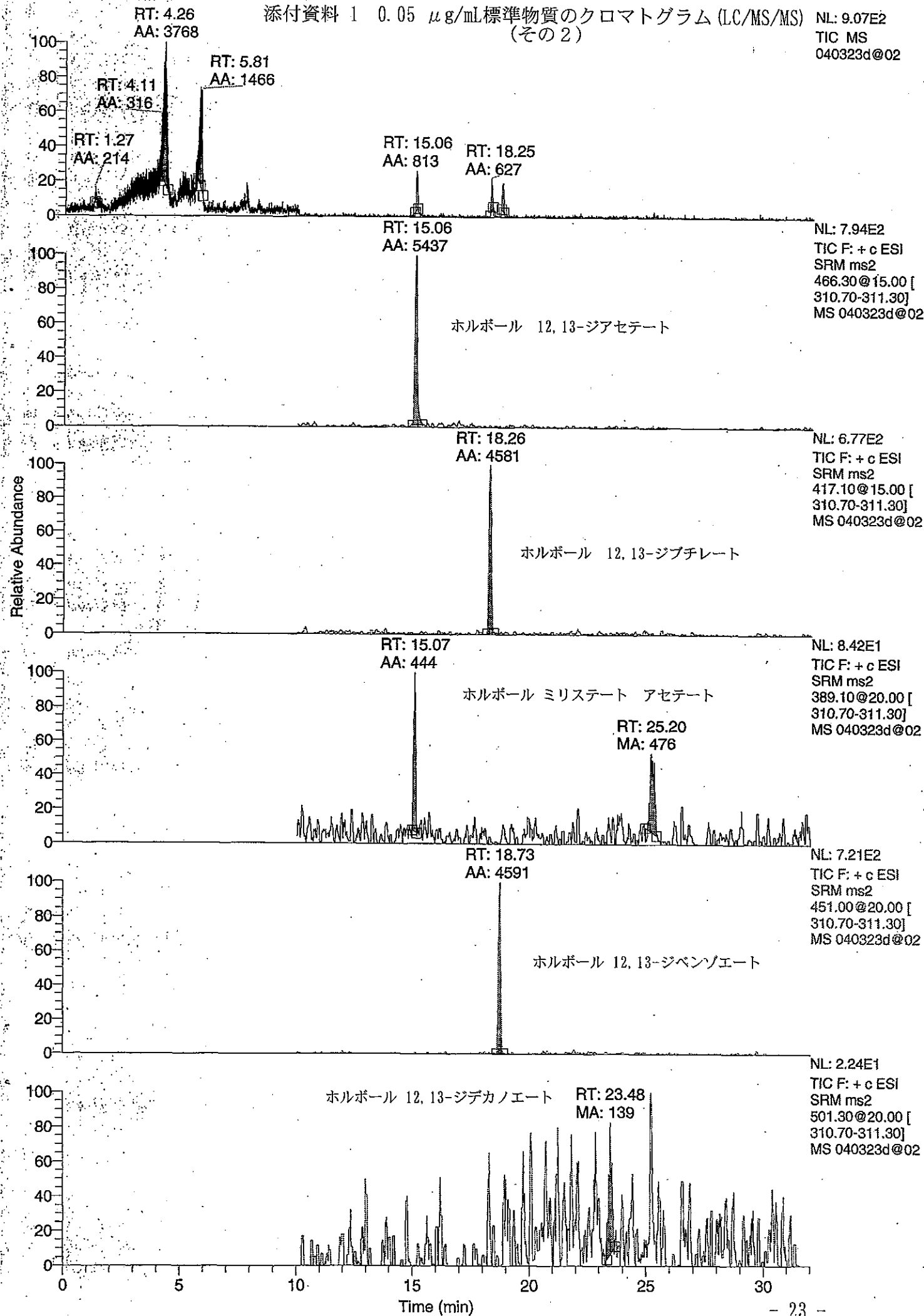
NL:
1.74E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@02



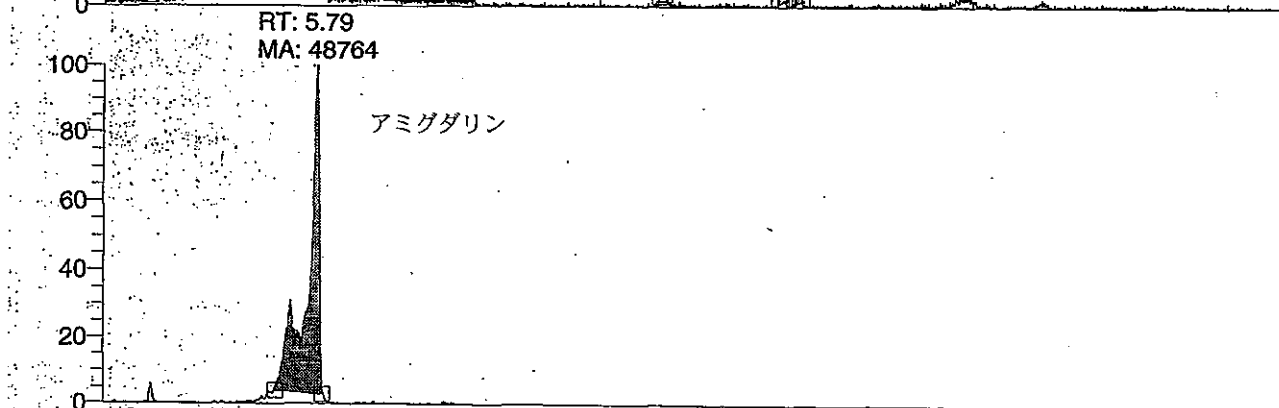
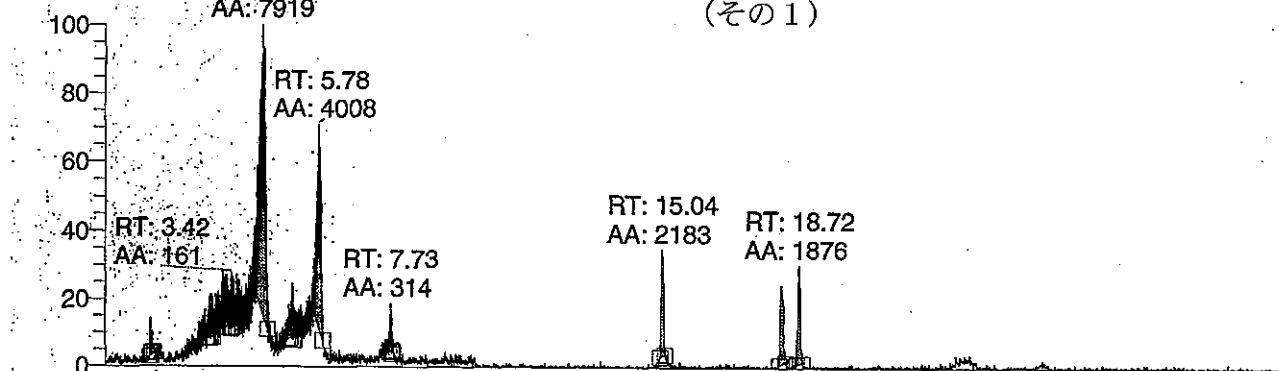
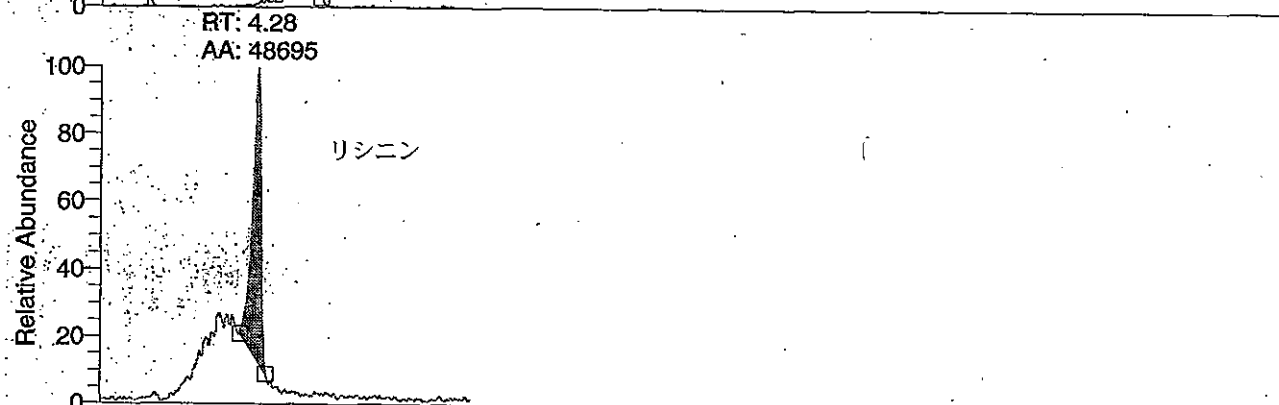
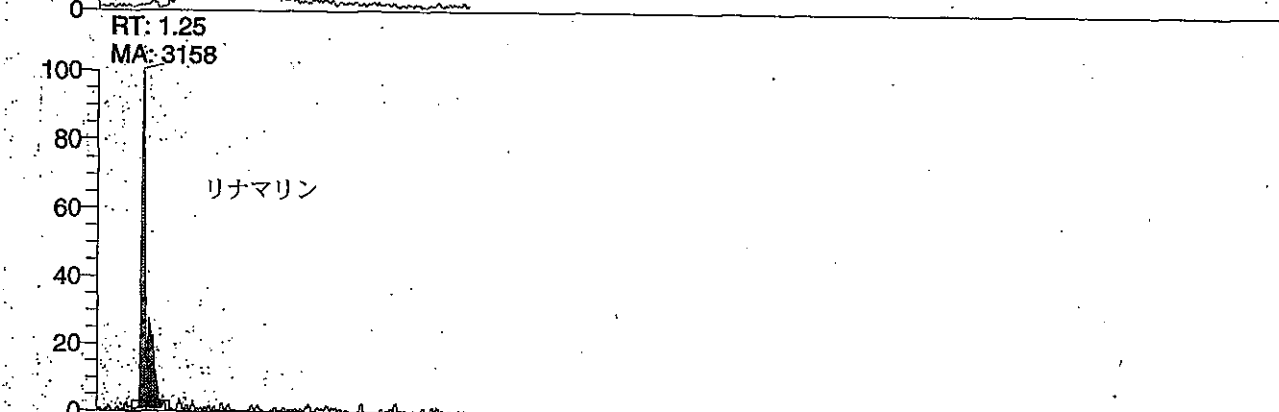
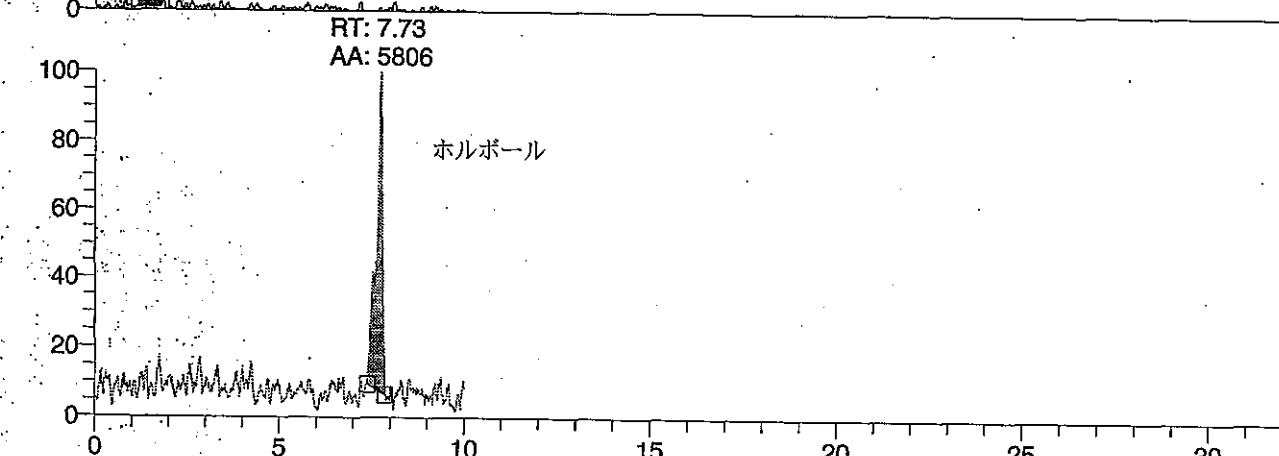
NL:
3.22E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@02

Time (min)

RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

添付資料 1 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)NL: 9.07E2
TIC MS
040323d@02

RT: 0.00 - 32.03 SM: 5B

RT: 4.26
AA: 7919添付資料 2 0.1 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)NL:
1.52E3
TIC MS
040323d@03NL:
2.42E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@03NL:
3.60E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@03NL:
3.43E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@03NL:
5.67E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@03

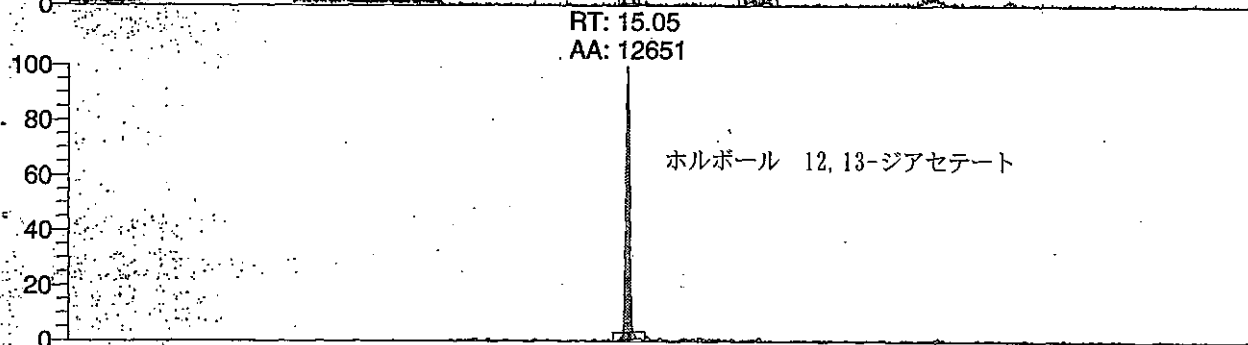
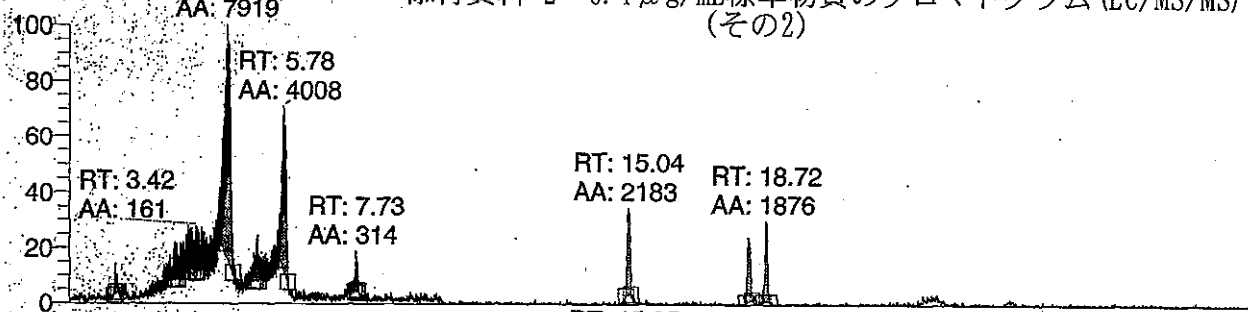
Time (min)

T: 0.00 - 32.03 SM: 5B

RT: 4.26
AA: 7919

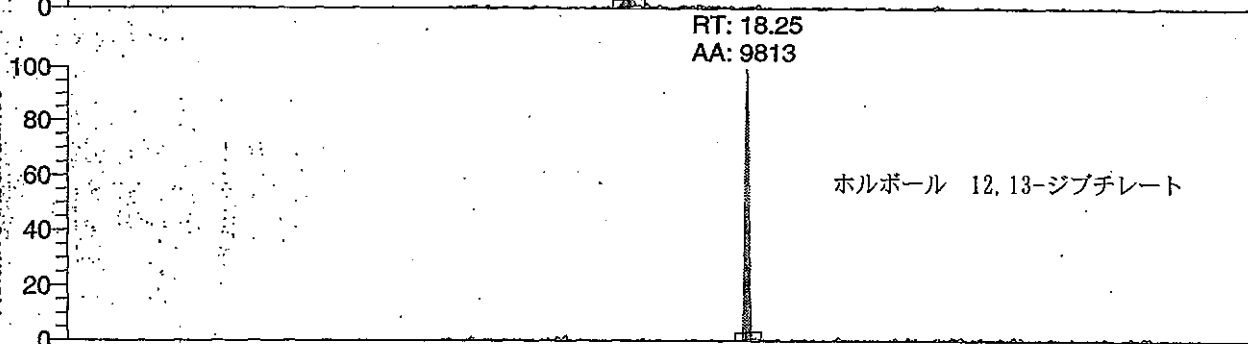
添付資料 2 0.1 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)

NL: 1.52E3
TIC MS
040323d@03



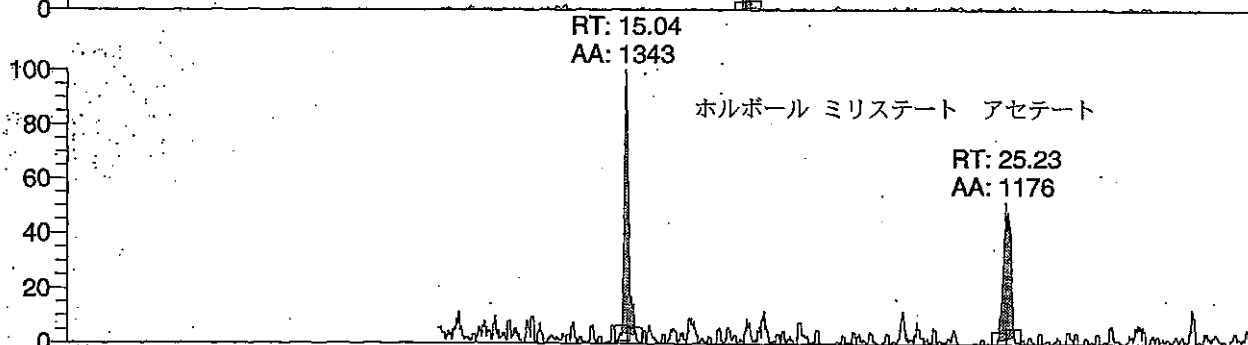
NL: 1.88E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
466.30@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@03

ホルボール 12, 13-ジアセテート



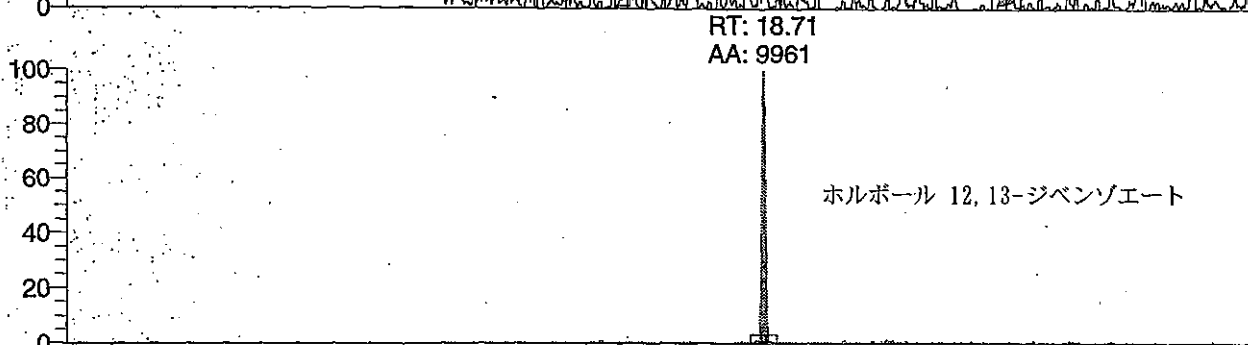
NL: 1.48E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
417.10@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@03

ホルボール 12, 13-ジブチレート



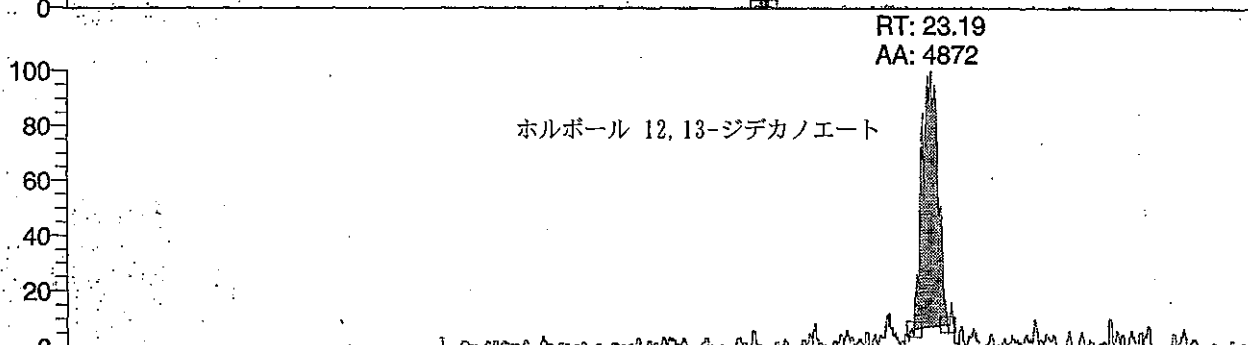
NL: 1.87E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
389.10@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@03

ホルボール ミリステート アセテート



NL: 1.52E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
451.00@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@03

ホルボール 12, 13-ジベンゾエート



NL: 1.83E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
501.30@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@03

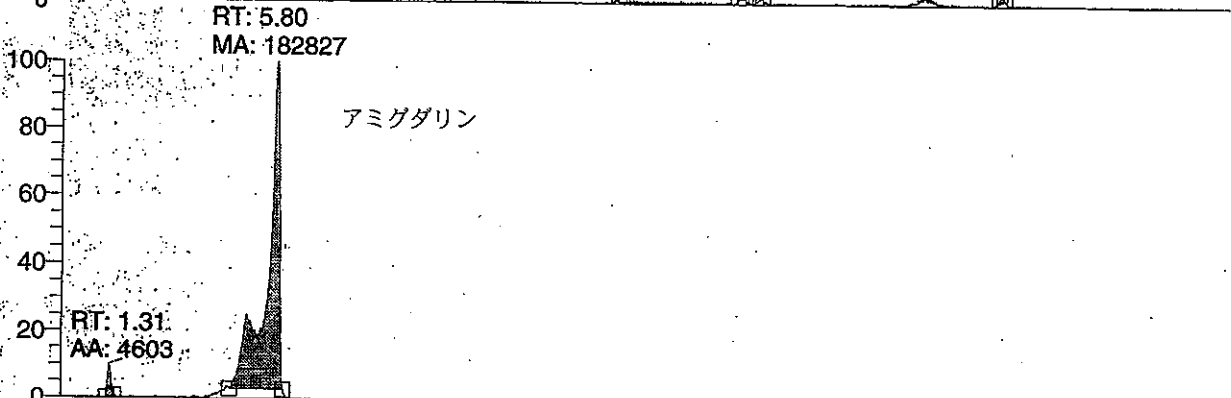
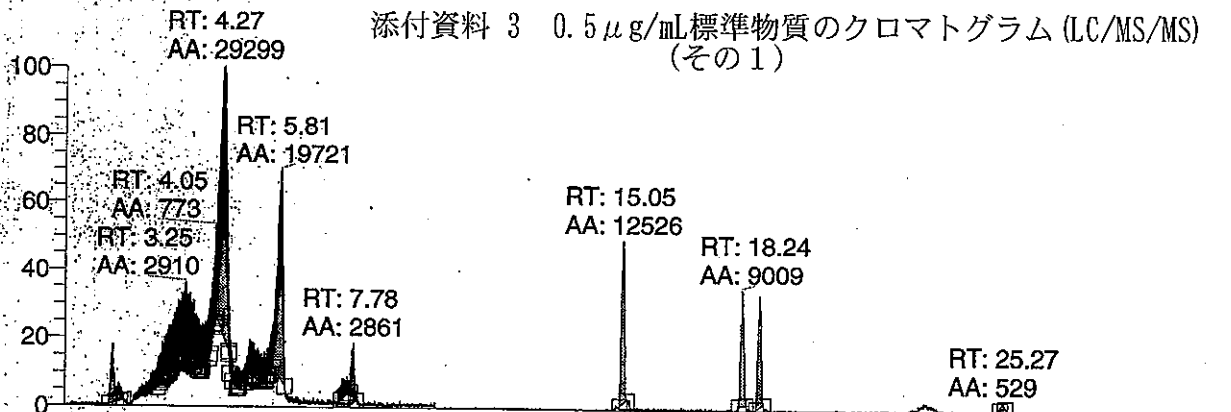
ホルボール 12, 13-ジデカノエート

Time (min)

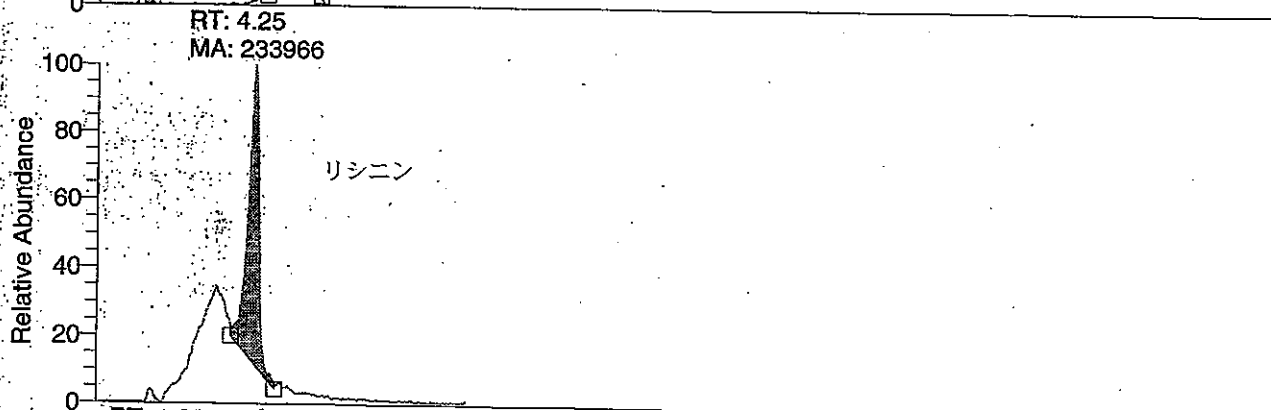
RT: 0.00 - 32.01 SM: 5B

添付資料 3 0.5 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)

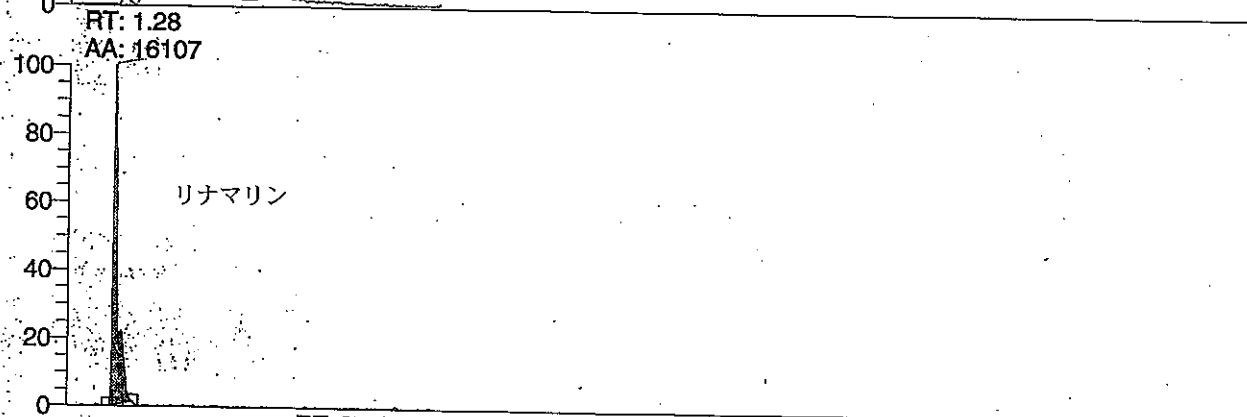
NL:
5.31E3
TIC MS
040323d@04



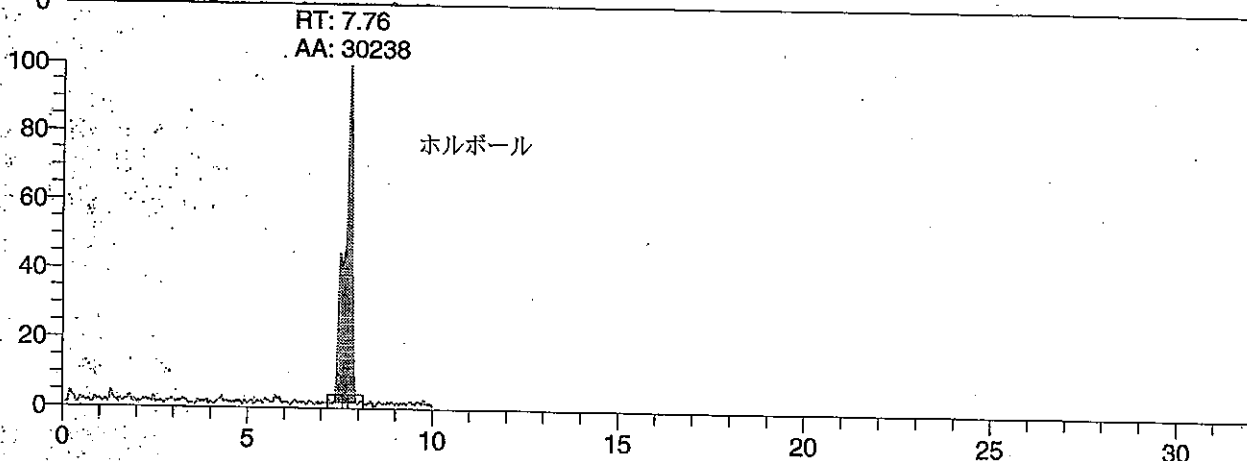
NL:
8.62E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@04



NL:
1.31E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@04



NL:
1.87E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@04



NL:
2.20E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@04

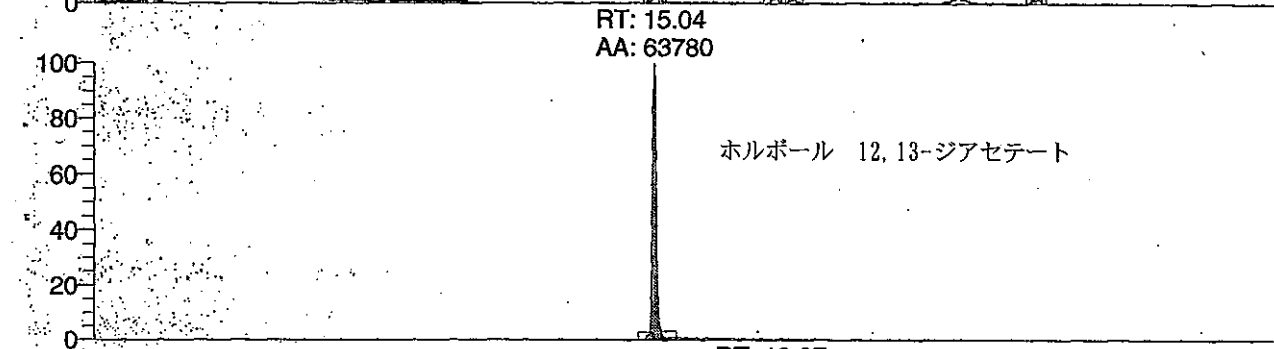
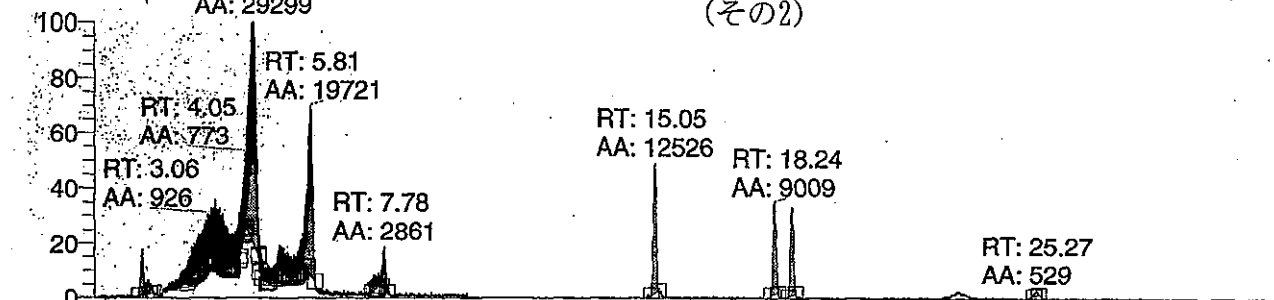
Time (min)

T: 0.00 - 32.01 SM: 5B

RT: 4.27
AA: 29299

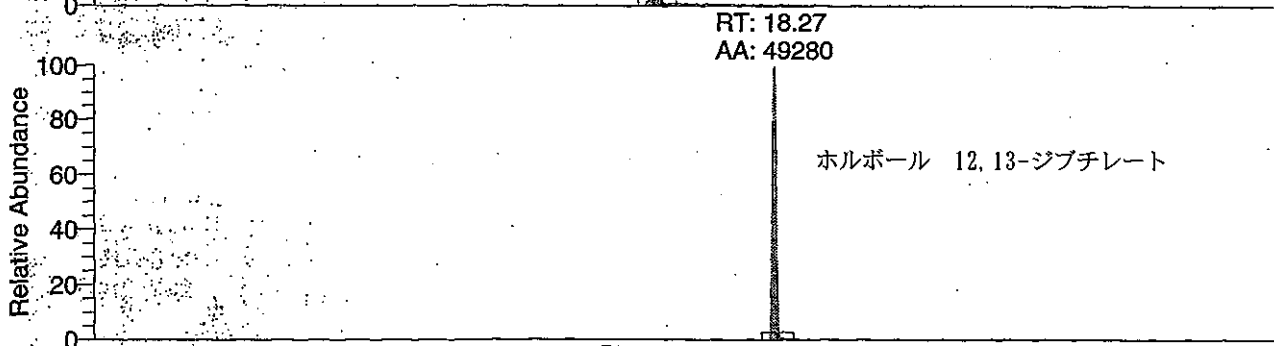
添付資料 3 0.5 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)

NL: 5.31E3
TIC MS
040323d@04



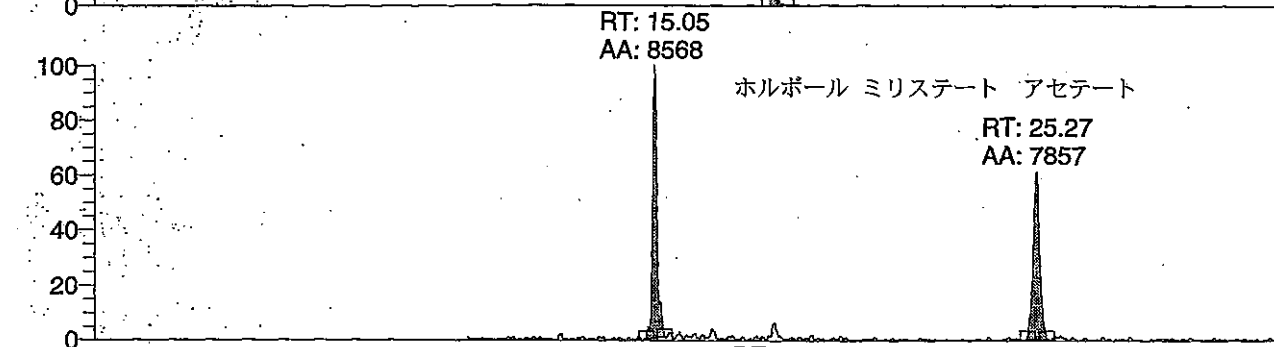
NL: 8.93E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
466.30@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@04

ホルボール 12, 13-ジアセテート



NL: 7.08E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
417.10@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@04

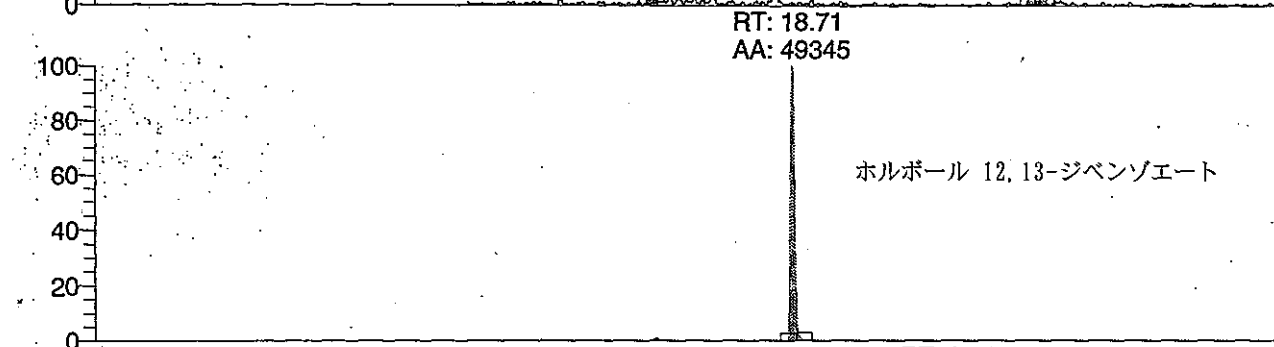
ホルボール 12, 13-ジブチレート



NL: 1.10E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
389.10@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@04

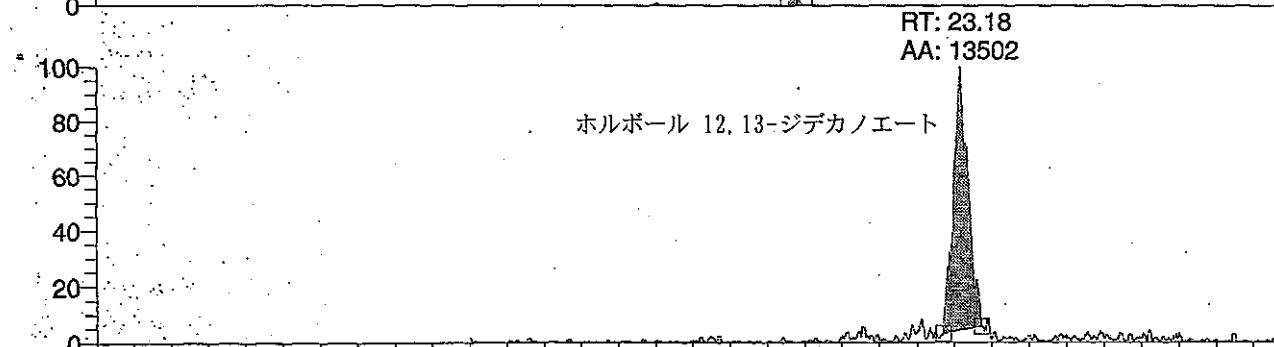
ホルボール ミリステート アセテート

RT: 25.27
AA: 7857



NL: 7.01E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
451.00@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@04

ホルボール 12, 13-ジベンゾエート



NL: 5.41E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
501.30@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@04

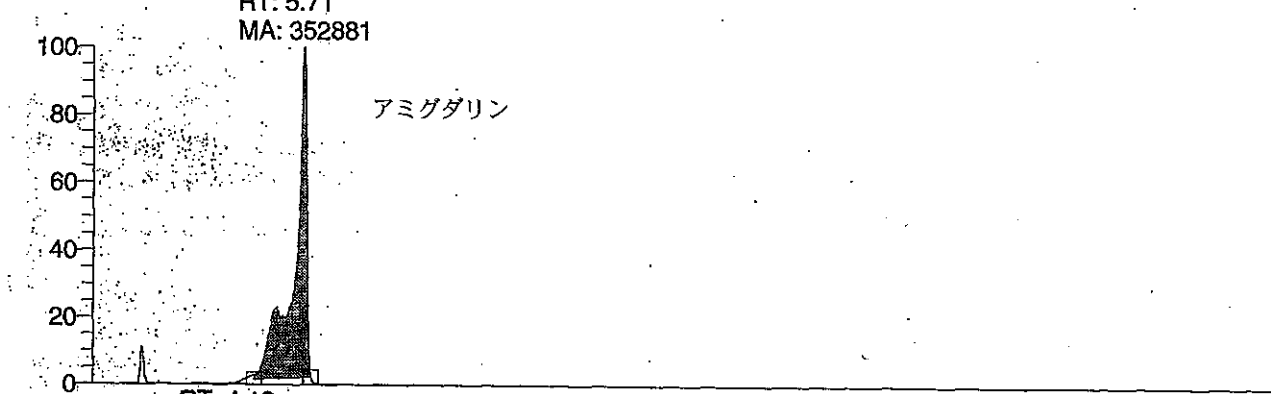
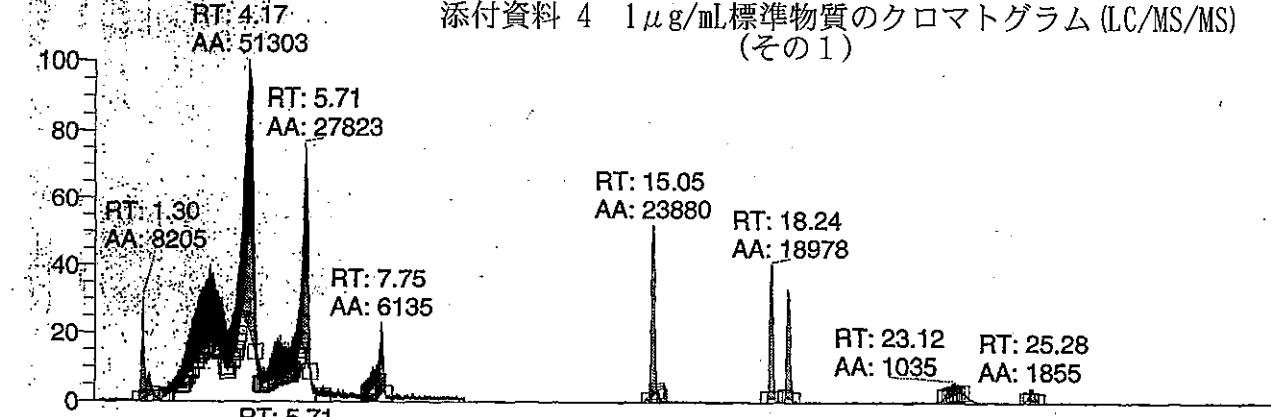
ホルボール 12, 13-ジデカノエート

Time (min)

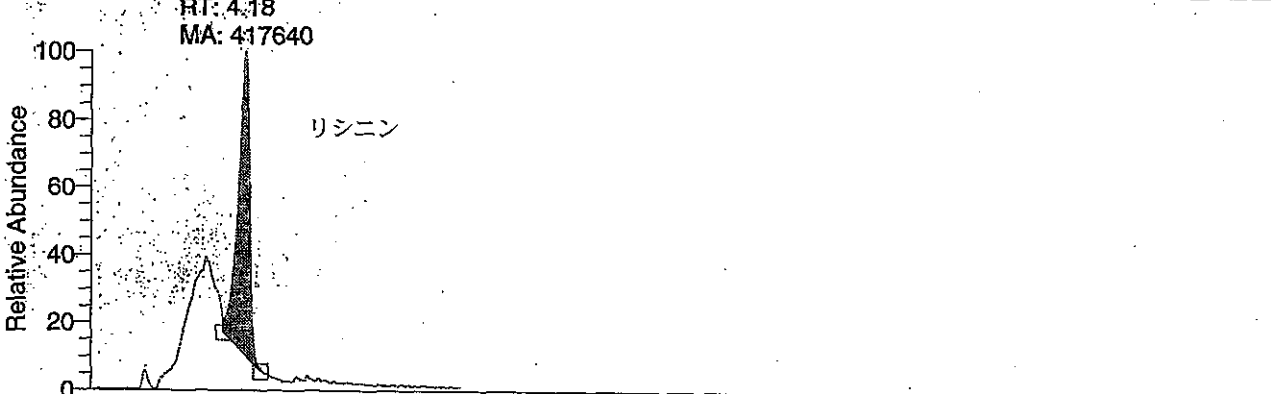
IT: 0.00-32.01 SM: 5B

添付資料 4 1 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)

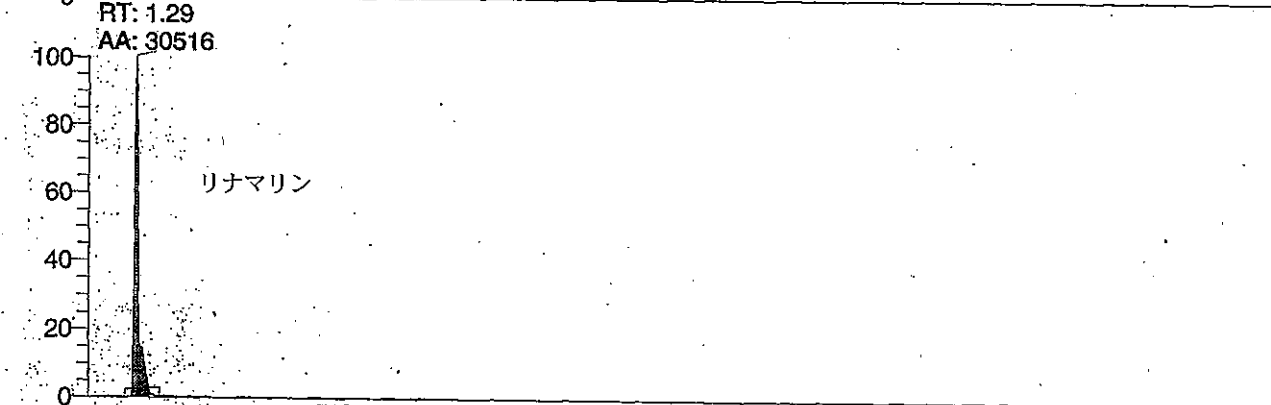
NL:
9.02E3
TIC MS
040323d@05



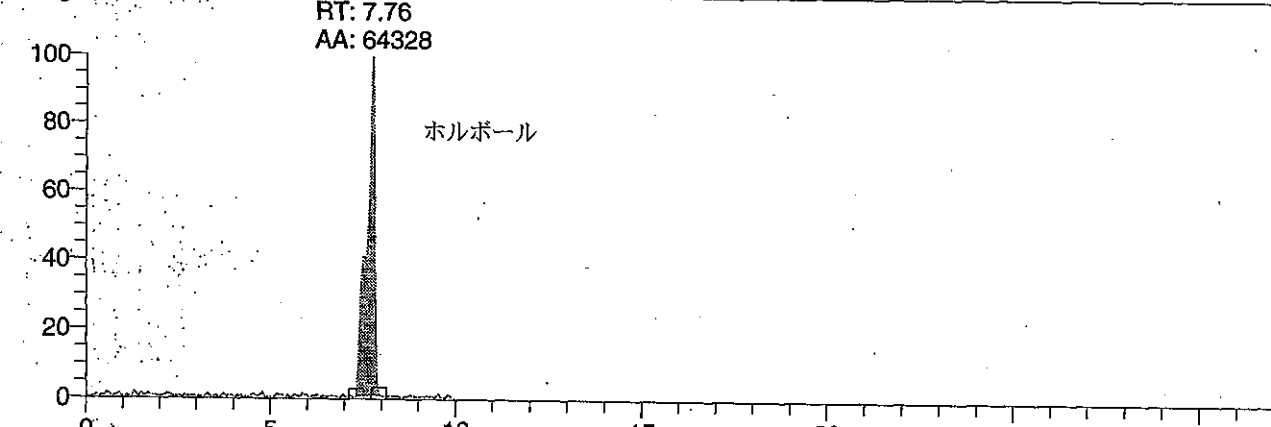
NL:
1.58E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@05



NL:
2.18E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@05

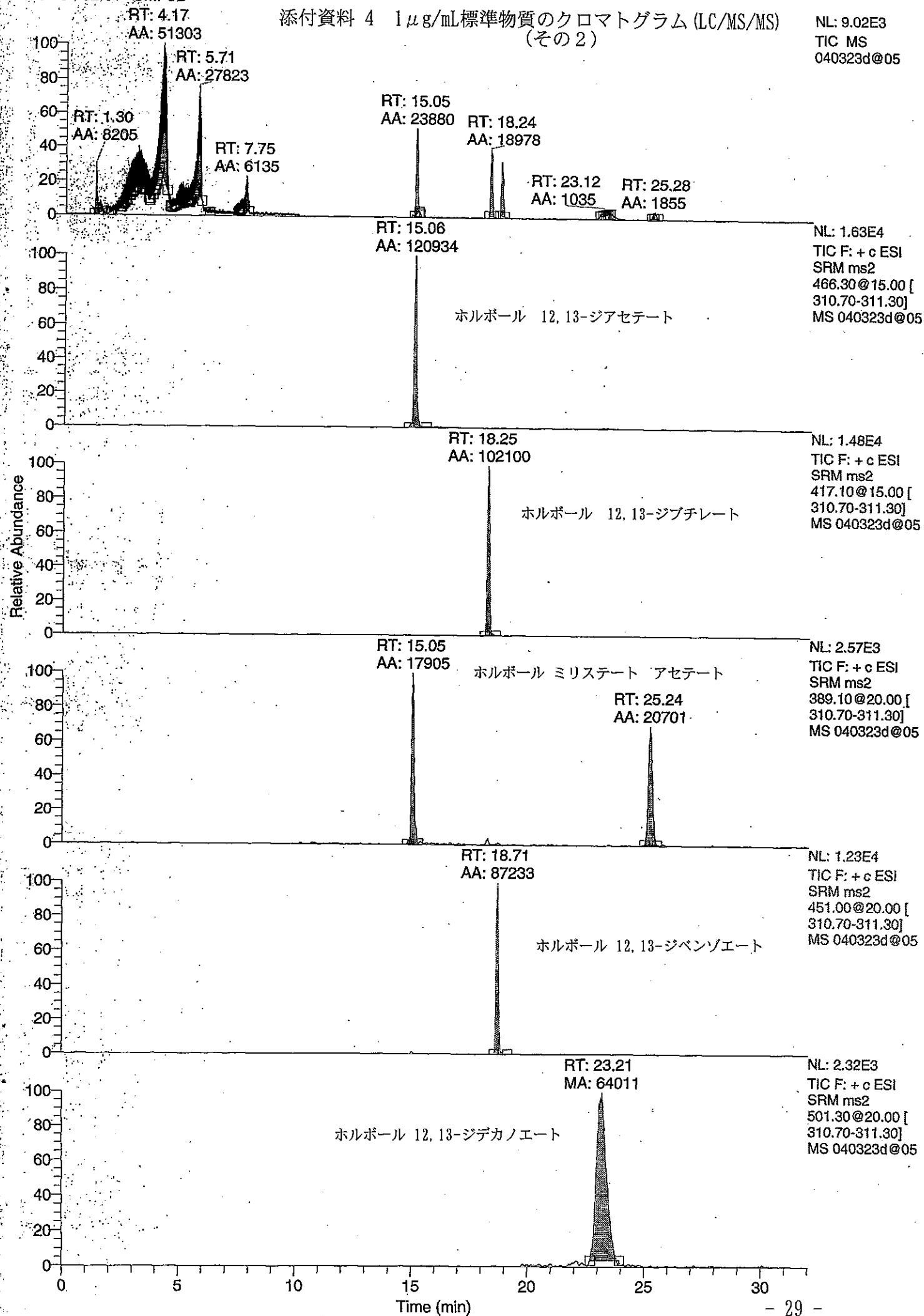


NL:
4.38E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@05

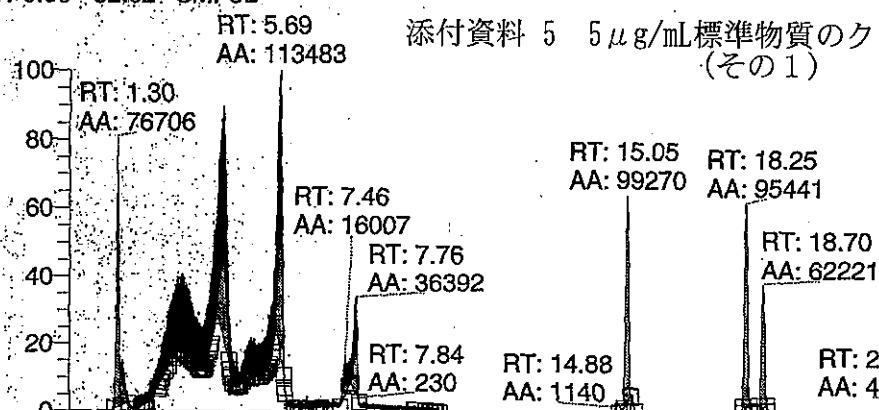


NL:
4.54E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@05

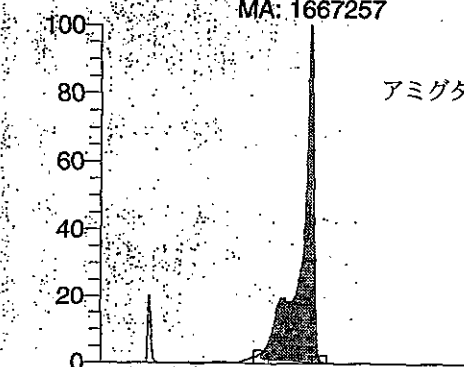
RT: 0.00 - 32.01 SM: 5B

添付資料 4 1 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)NL: 9.02E3
TIC MS
040323d@05

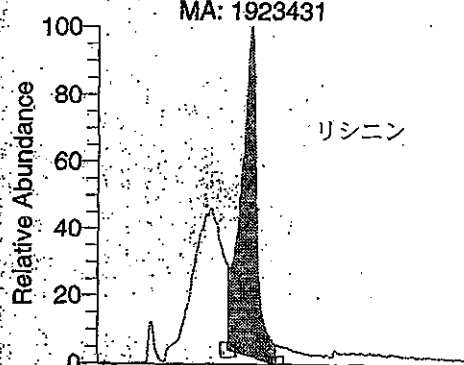
RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

添付資料 5 5 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)NL:
3.05E4
TIC MS
040323d@06RT: 5.67
MA: 1667257

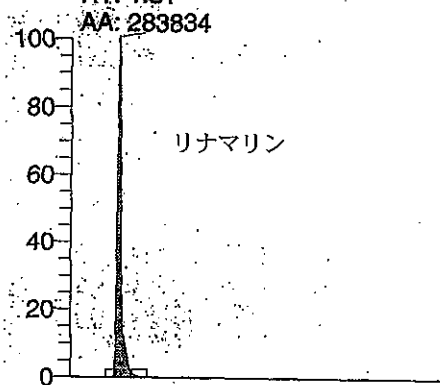
アミグダリン

NL:
7.28E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@06RT: 4.15
MA: 1923431

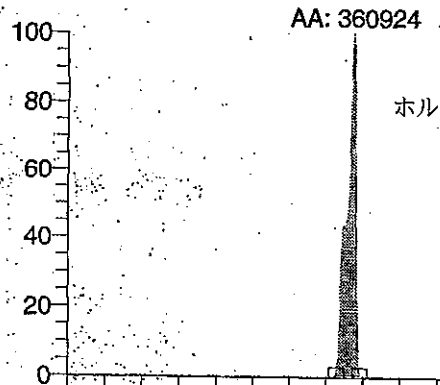
リシニン

NL:
6.63E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@06RT: 1.31
AA: 283834

リナマリ

NL:
3.99E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@06RT: 7.75
AA: 360924

ホルボール

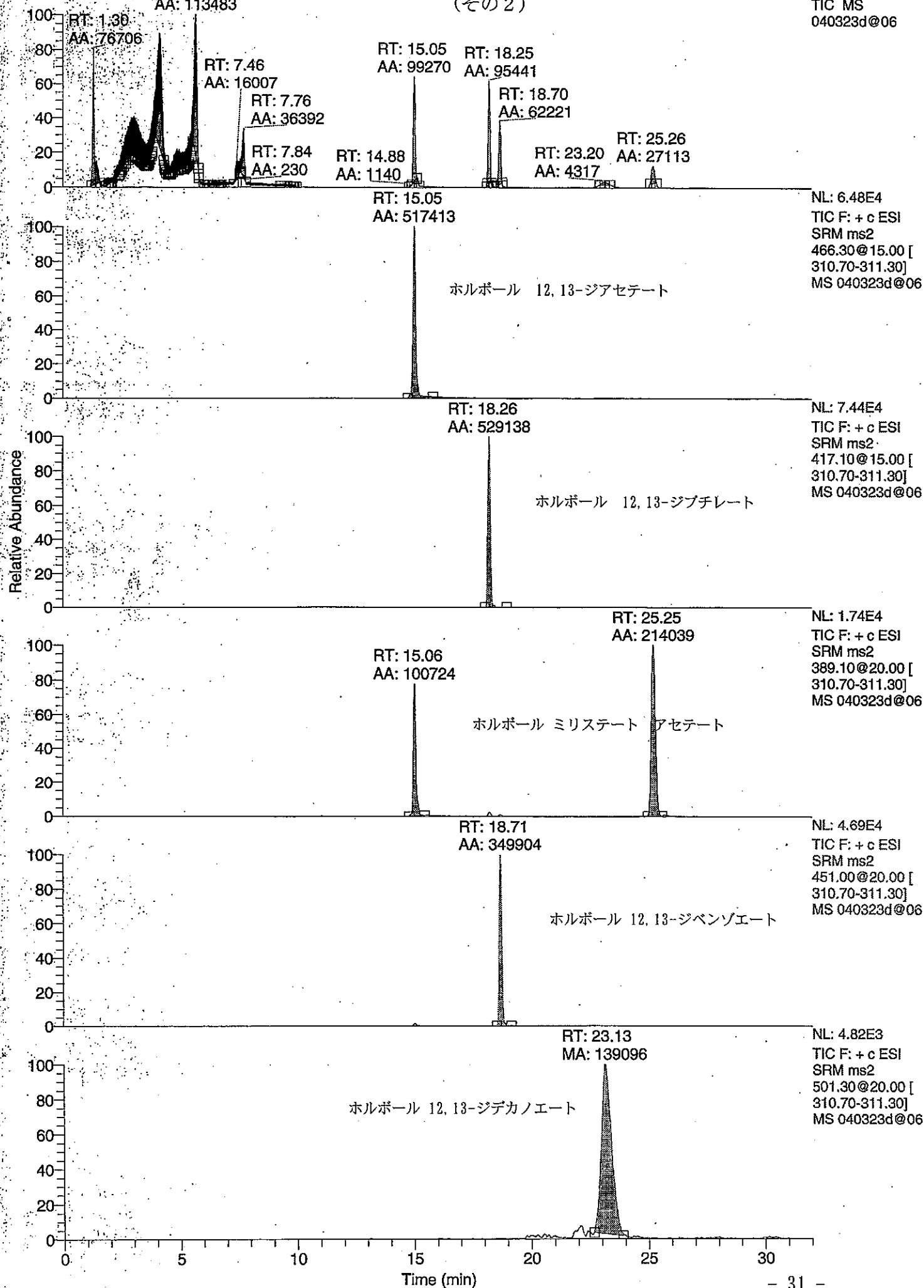
NL:
2.36E4
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@06

Time (min)

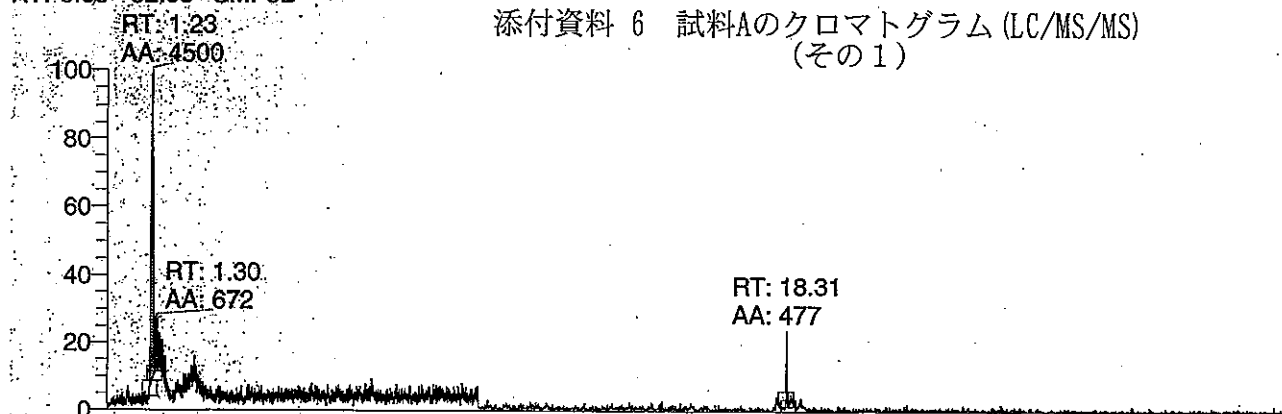
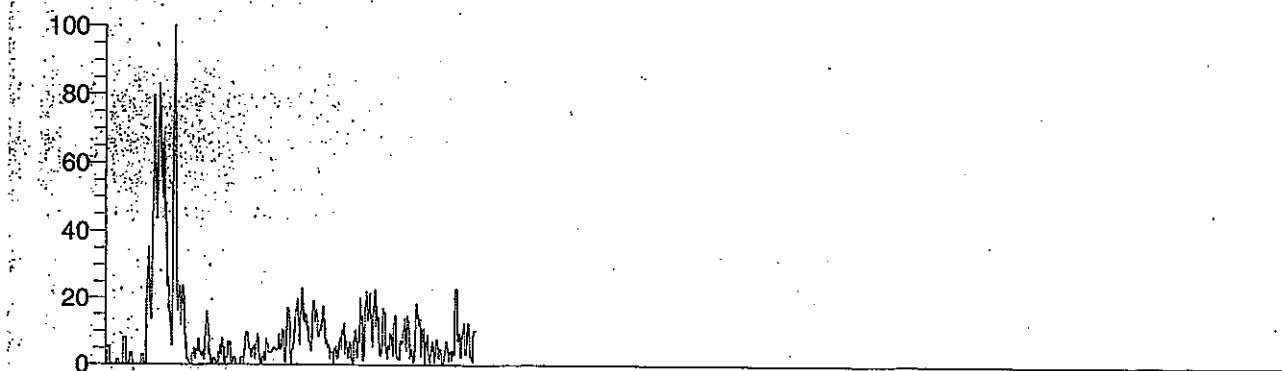
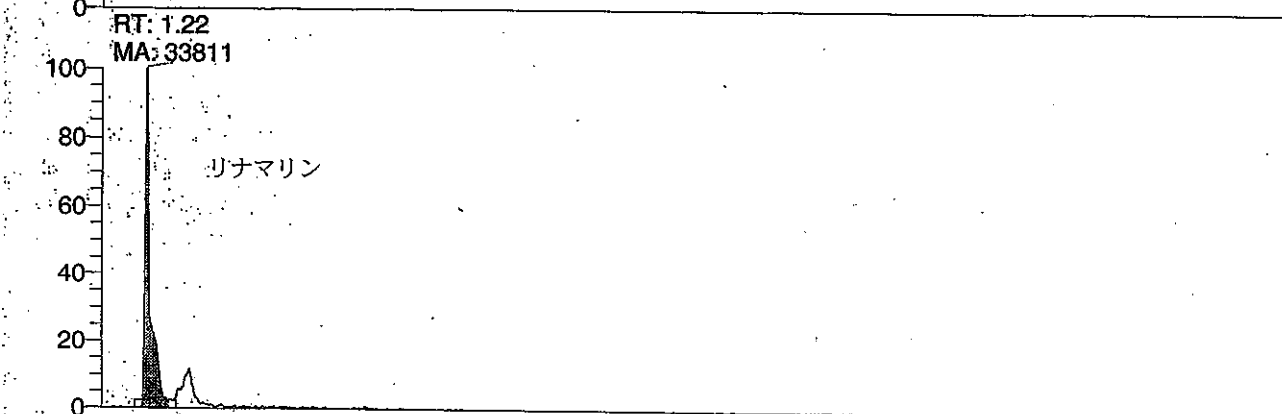
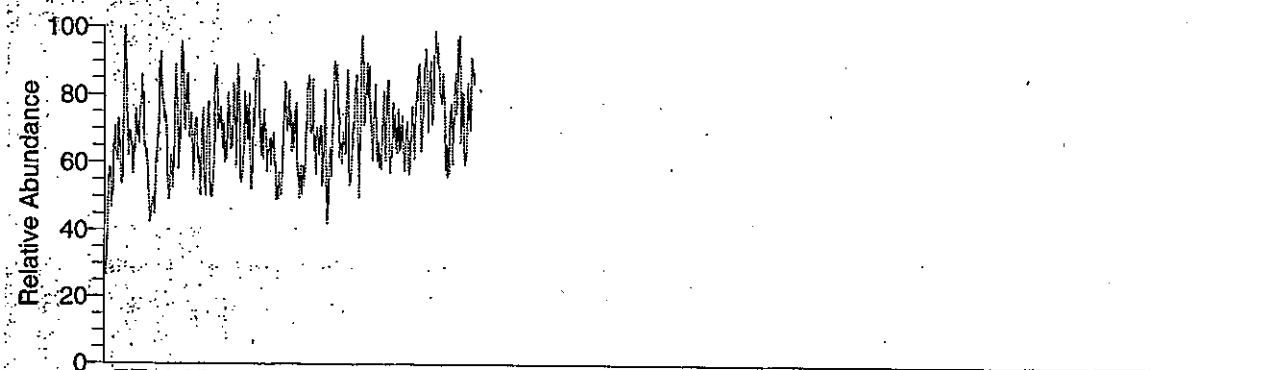
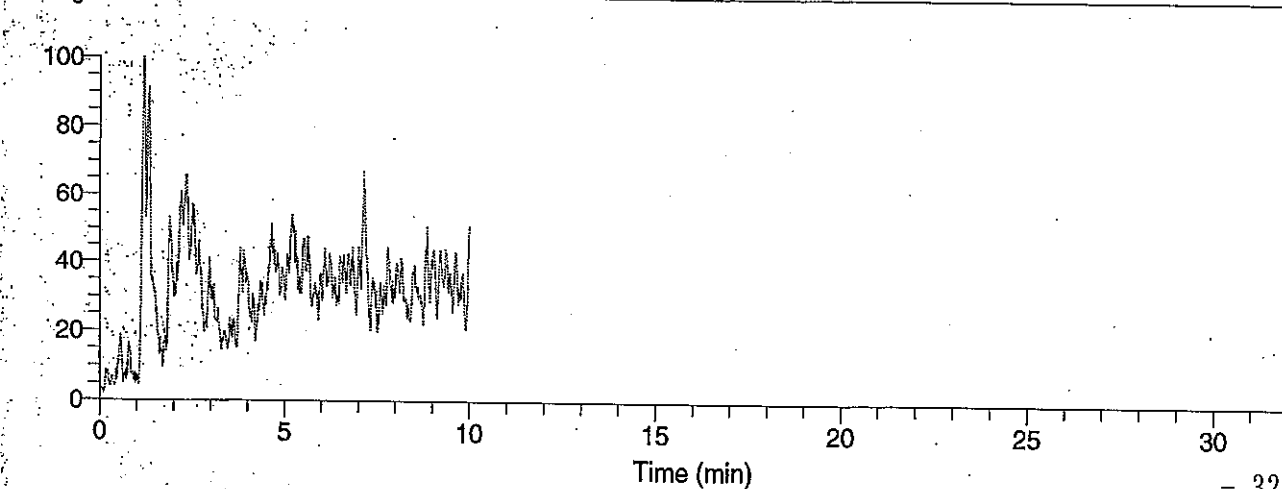
RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

添付資料 5 5 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)

NL: 3.05E4

TIC MS
040323d@06

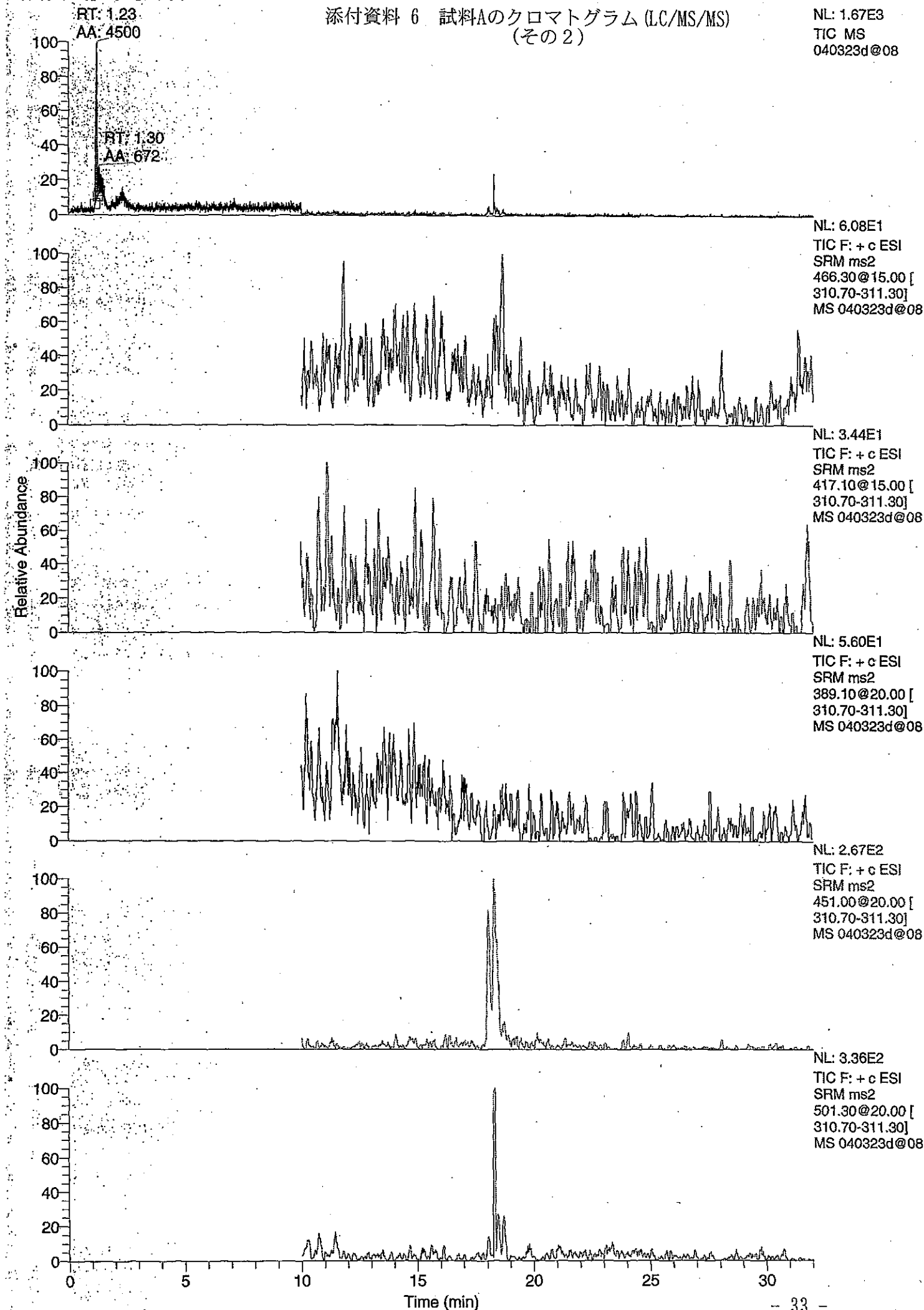
RT: 0.00 32:03 SM: 5B

添付資料 6 試料Aのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)NL:
1.67E3
TIC MS
040323d@08NL:
7.62E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@08NL:
2.11E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@08NL:
3.49E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@08NL:
3.38E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@08

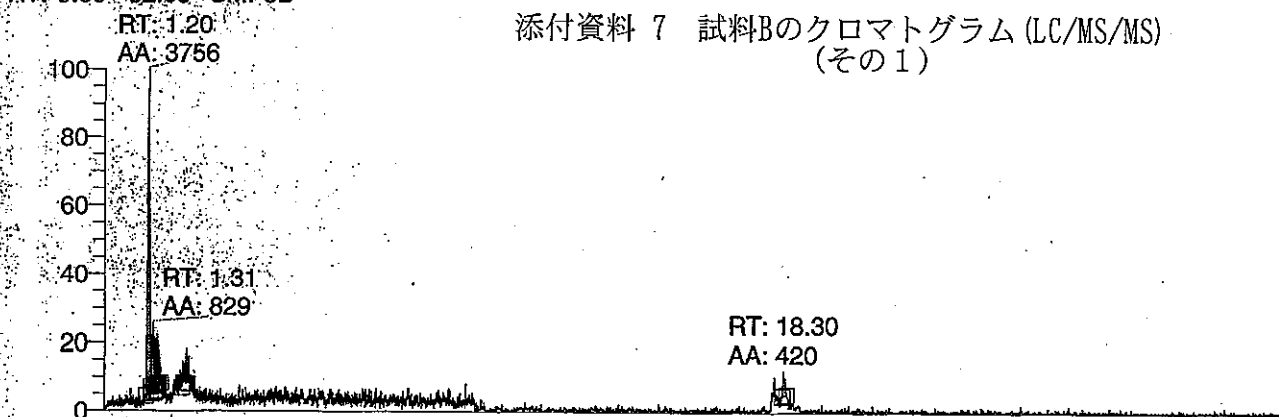
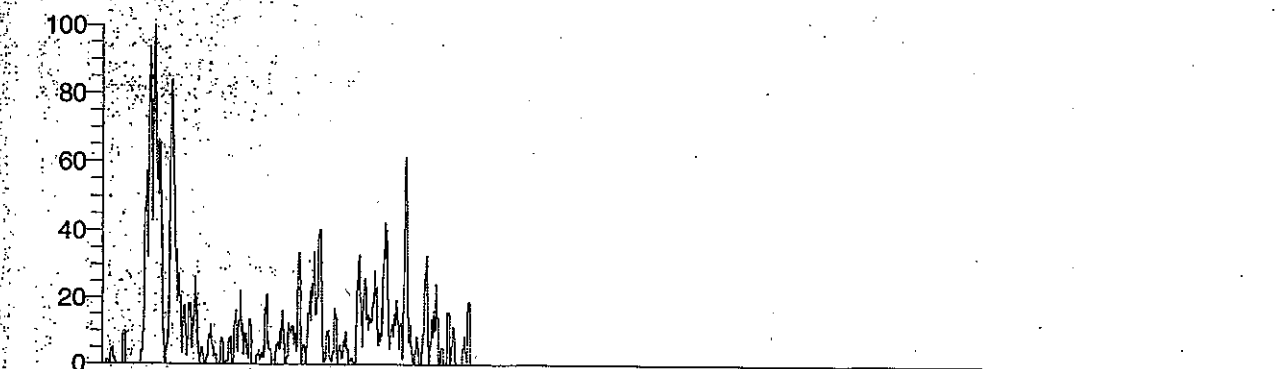
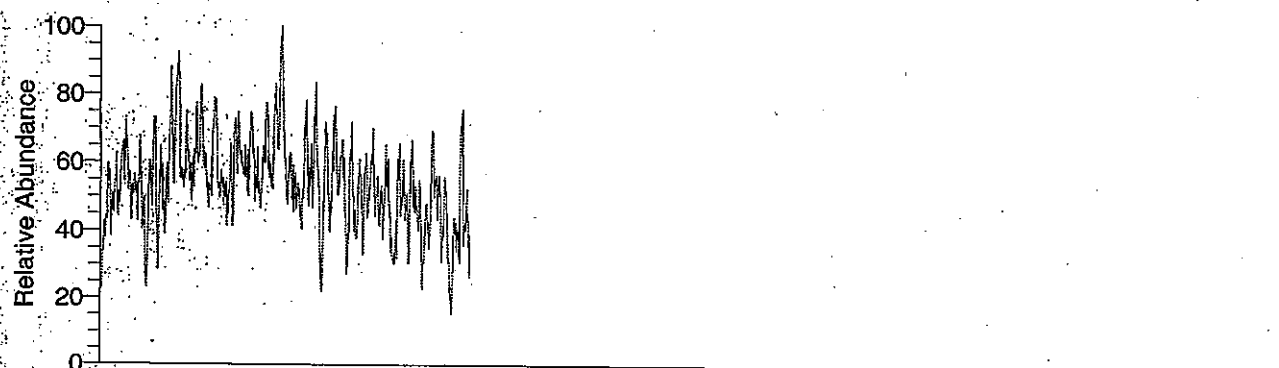
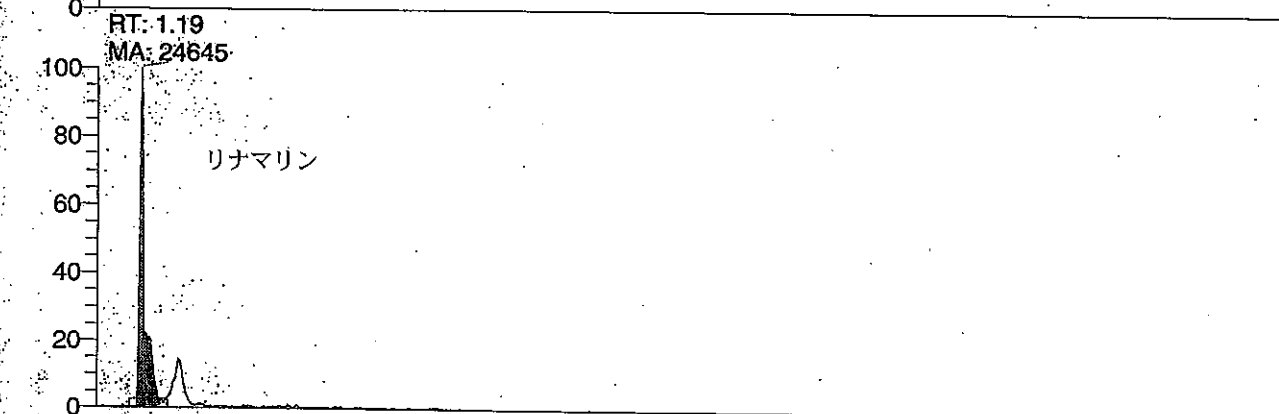
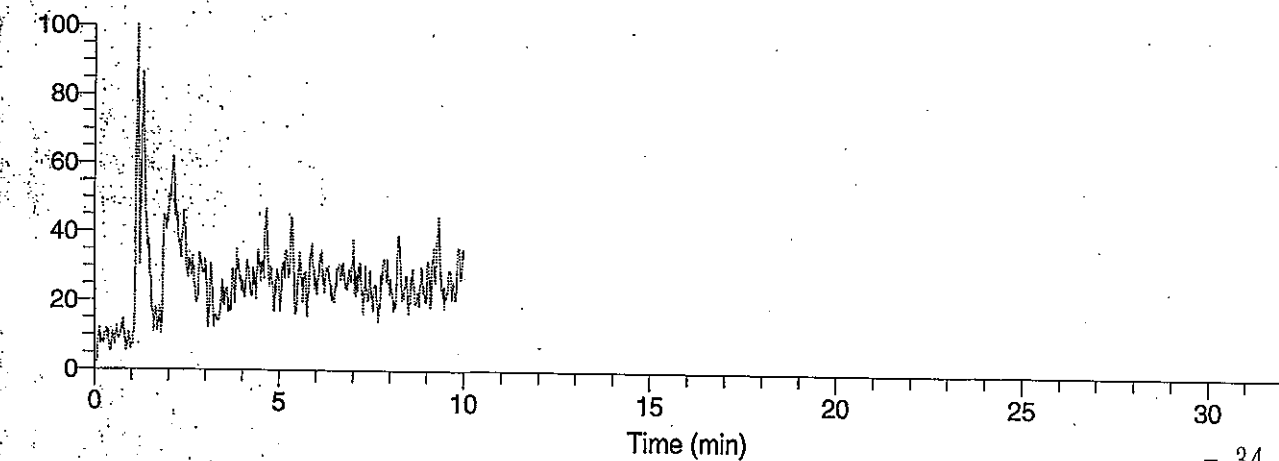
RT: 0.00 - 32.03 SM: 5B

添付資料 6 試料Aのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)

NL: 1.67E3

TIC MS
040323d@08

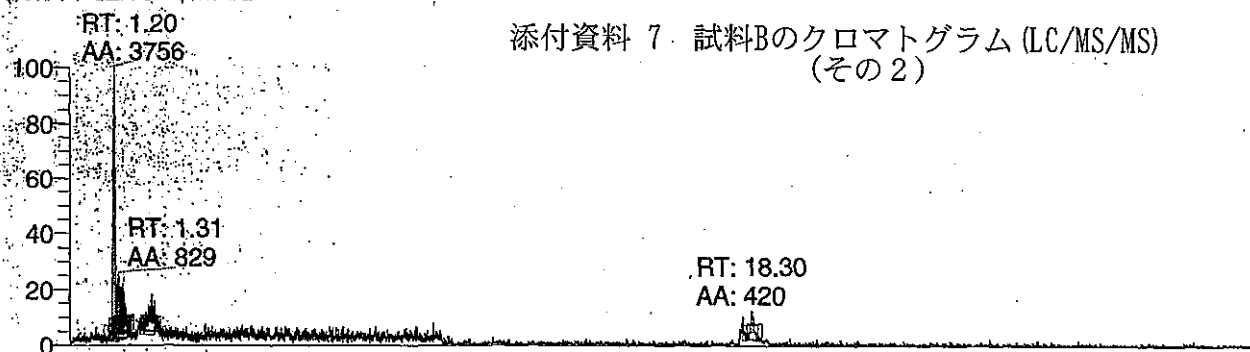
RT: 0.00 - 32.03 SM: 5B

添付資料 7 試料Bのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)NL:
1.40E3
TIC MS
040323d@09NL:
4.96E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@09NL:
1.73E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@09NL:
2.77E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@09NL:
3.44E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@09

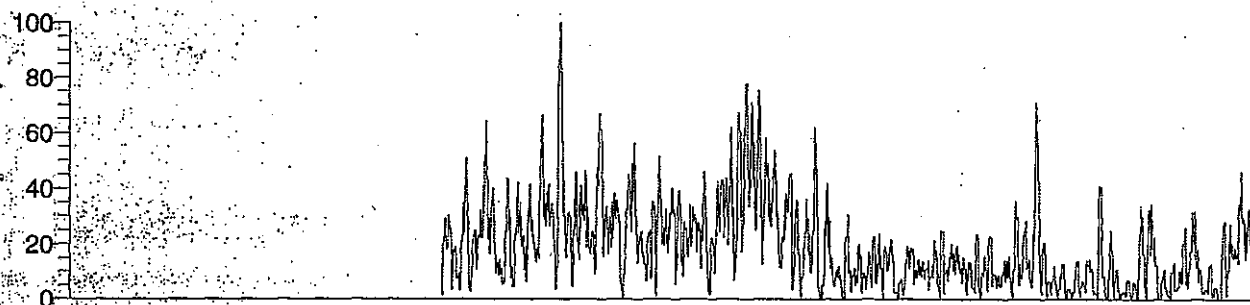
IT: 0.00 32.03 SM: 5B

添付資料 7. 試料Bのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)

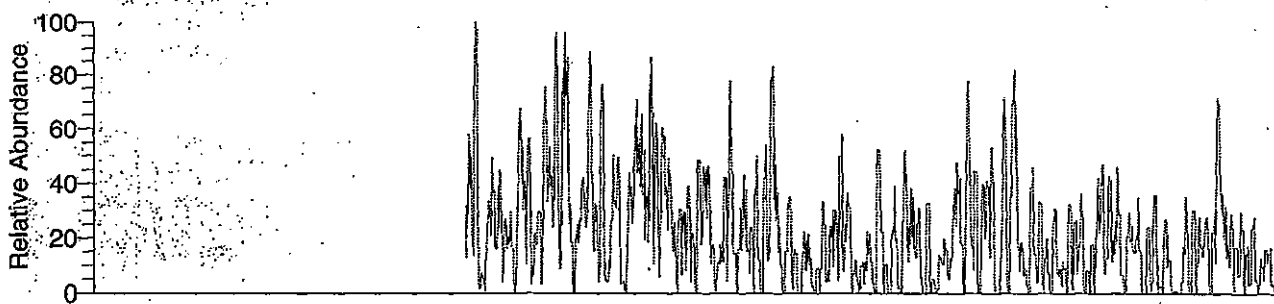
NL: 1.40E3
TIC MS
040323d@09



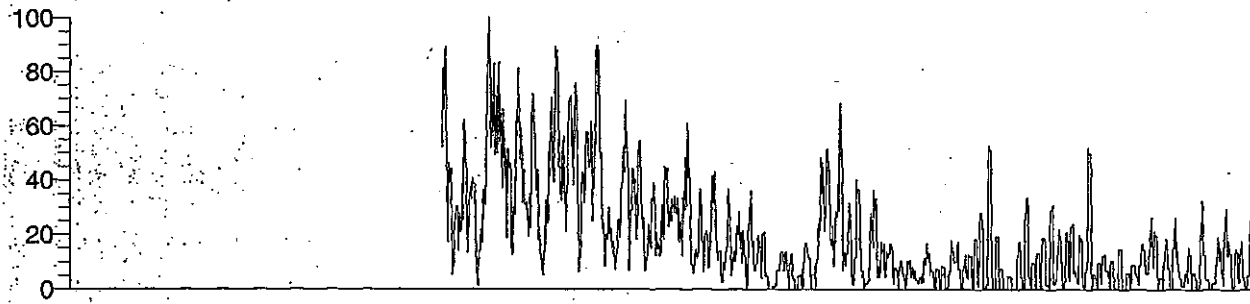
NL: 4.70E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
466.30@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@09



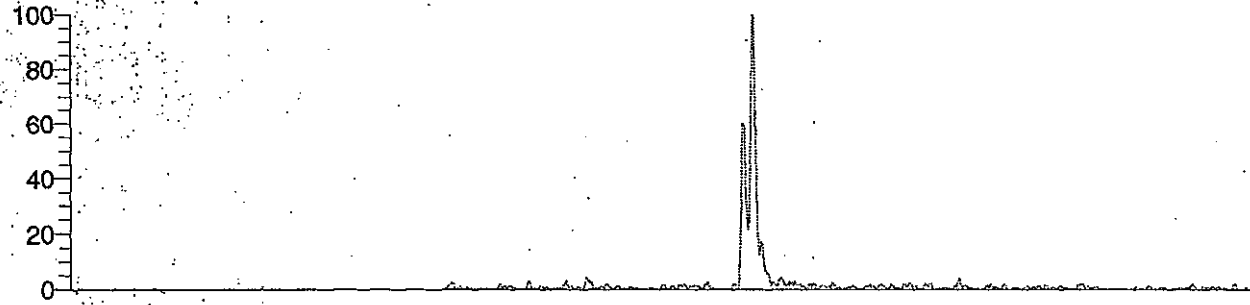
NL: 2.52E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
417.10@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@09



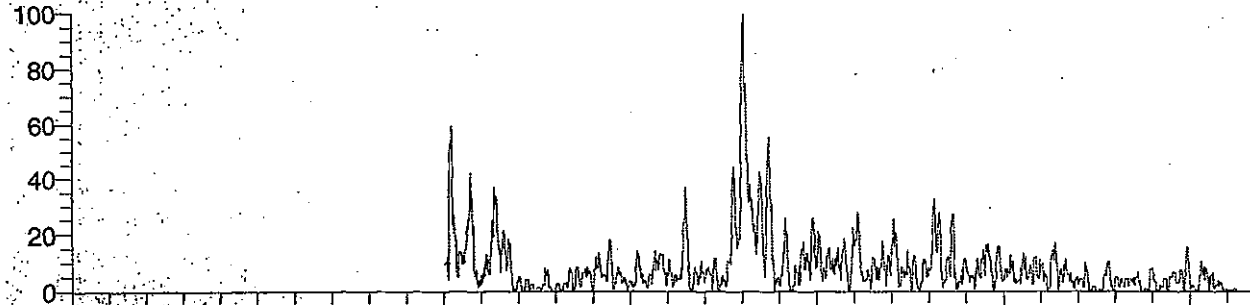
NL: 3.90E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
389.10@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@09



NL: 6.25E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
451.00@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@09

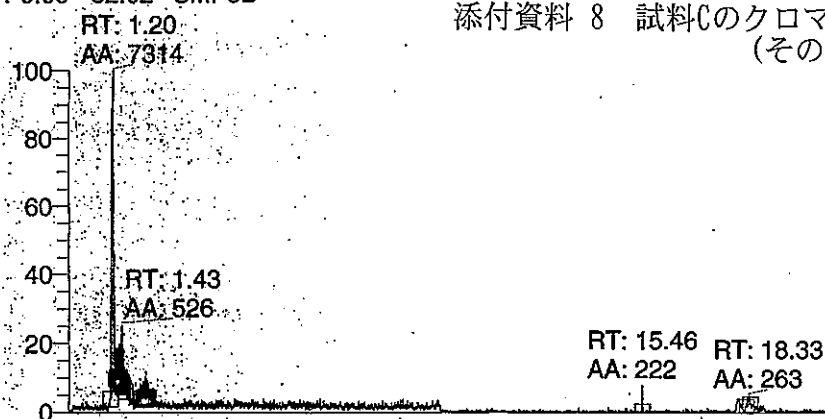
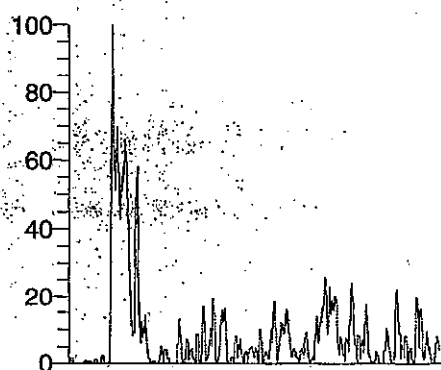
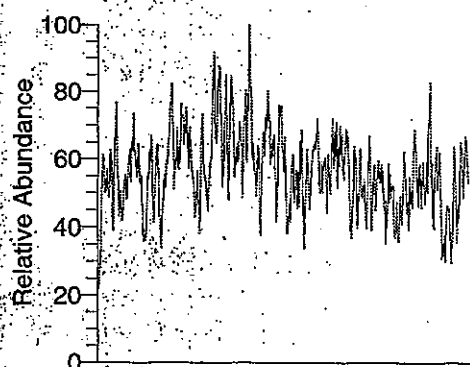


NL: 9.88E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
501.30@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@09

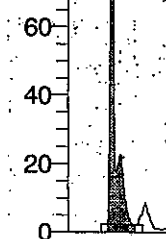
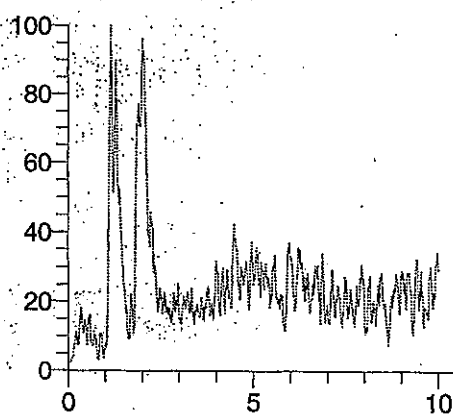


Time (min)

RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

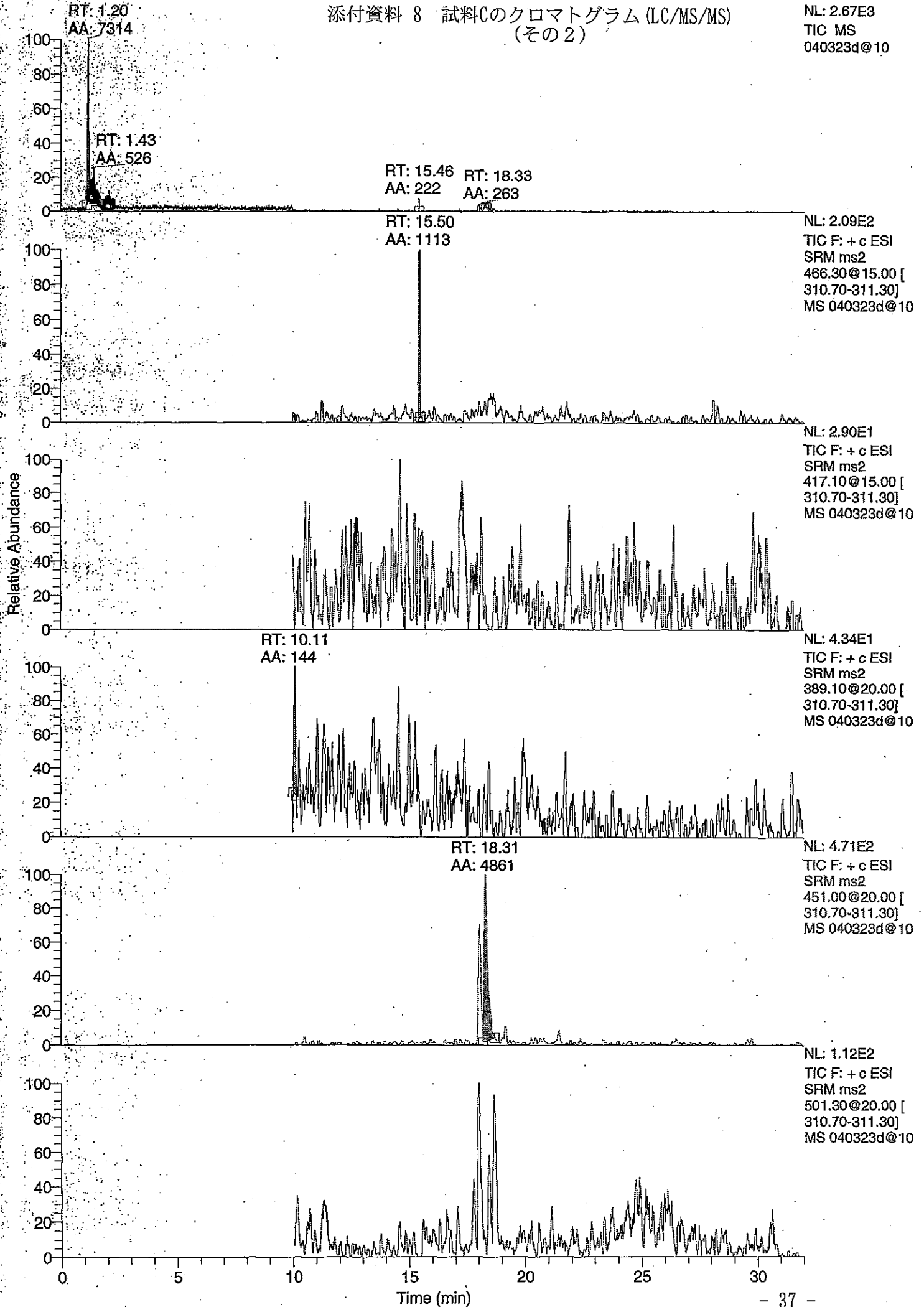
添付資料 8 試料Cのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)NL:
2.67E3
TIC MS
040323d@10NL:
8.20E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@10NL:
1.81E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@10RT: 1.19
MA: 52003NL:
5.61E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@10

リナマリ

NL:
3.53E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@10

Time (min)

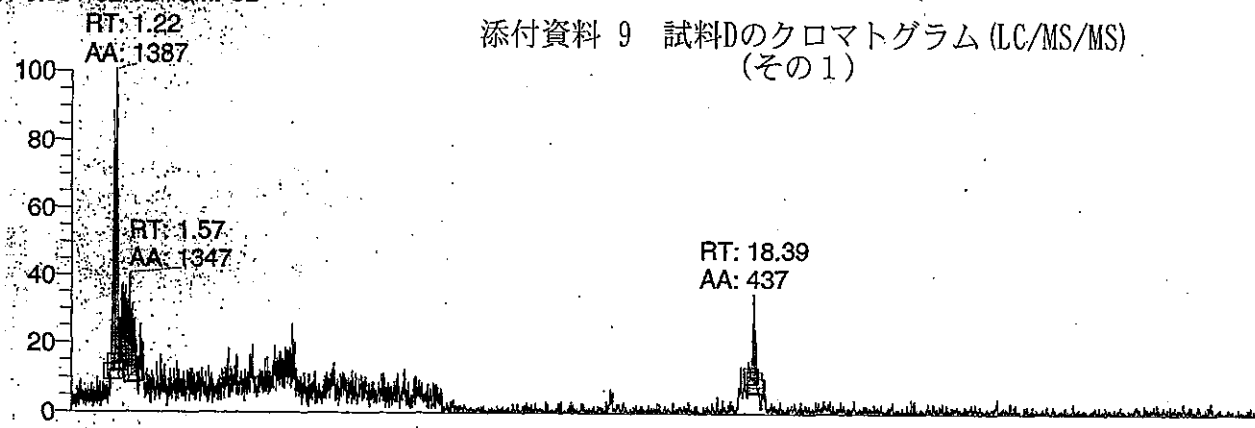
RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

添付資料 8 試料Cのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その2)NL: 2.67E3
TIC MS
040323d@10

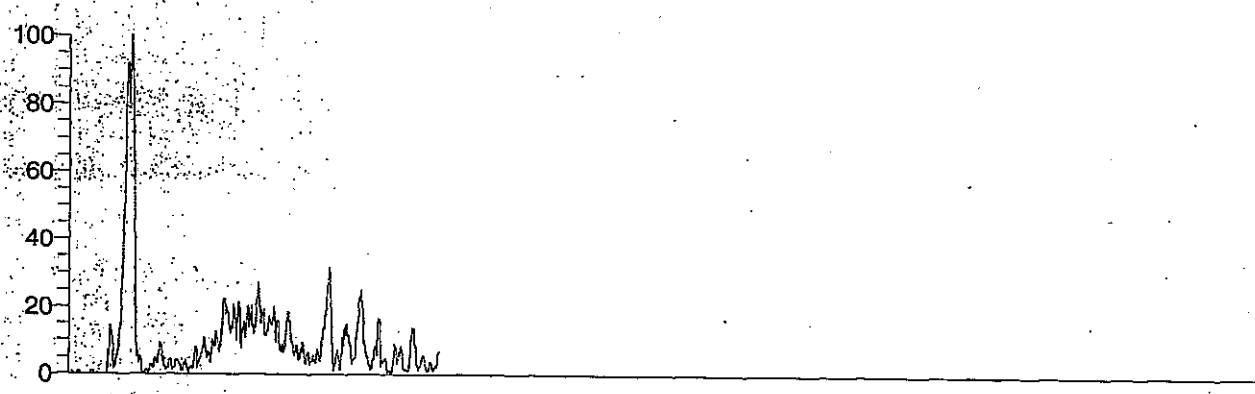
IT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

添付資料 9 試料Dのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その1)

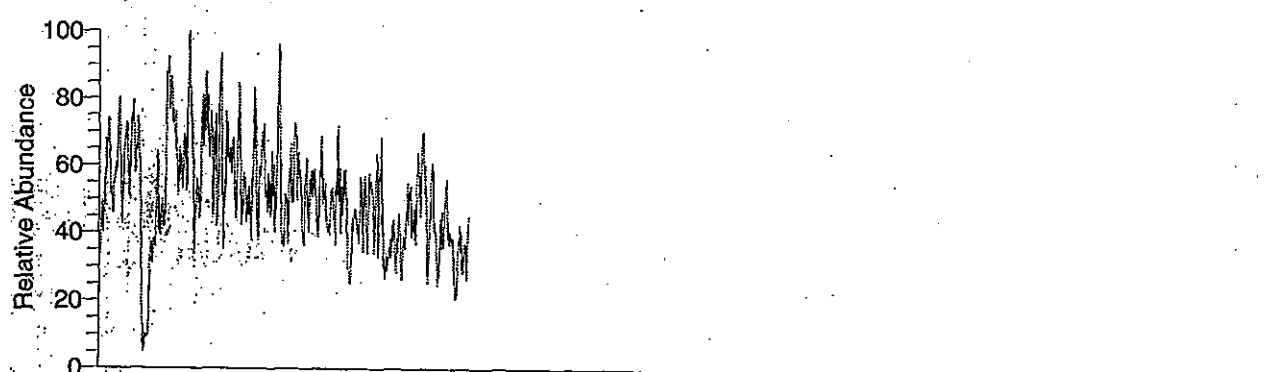
NL:
6.34E2
TIC MS
040323d@11



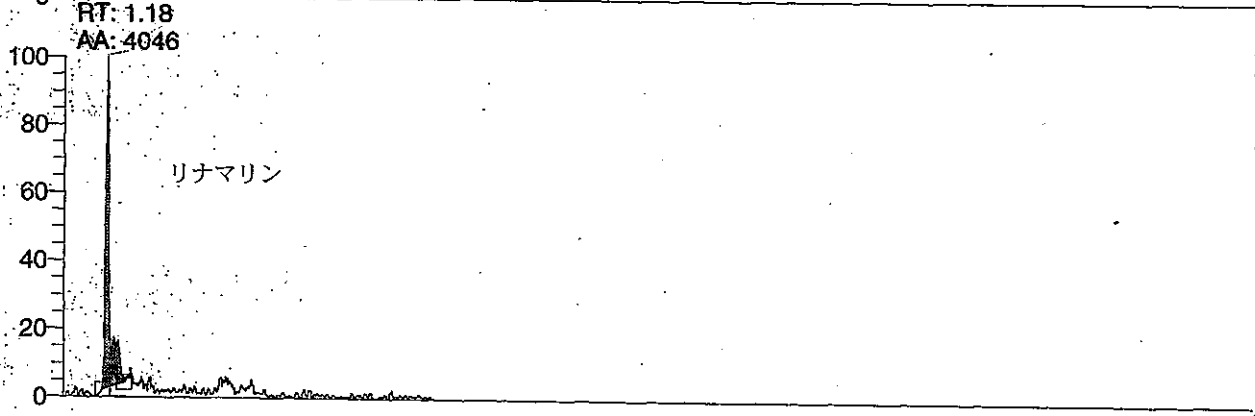
NL:
3.04E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
475.10@20.00 [
162.60-163.20]
MS 040323d@11



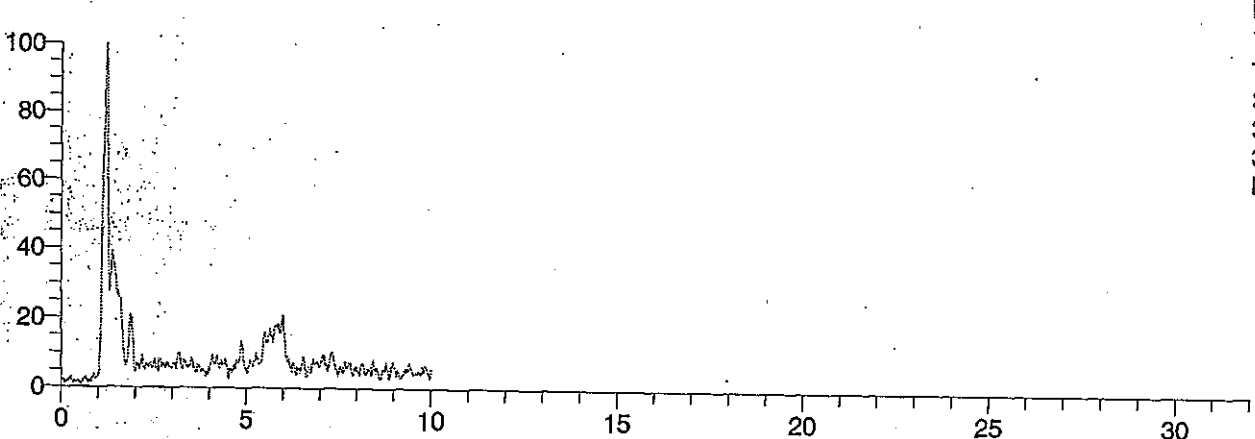
NL:
1.31E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
164.90@22.00 [
137.60-138.20]
MS 040323d@11



NL:
5.51E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
264.90@23.00 [
102.70-103.30]
MS 040323d@11

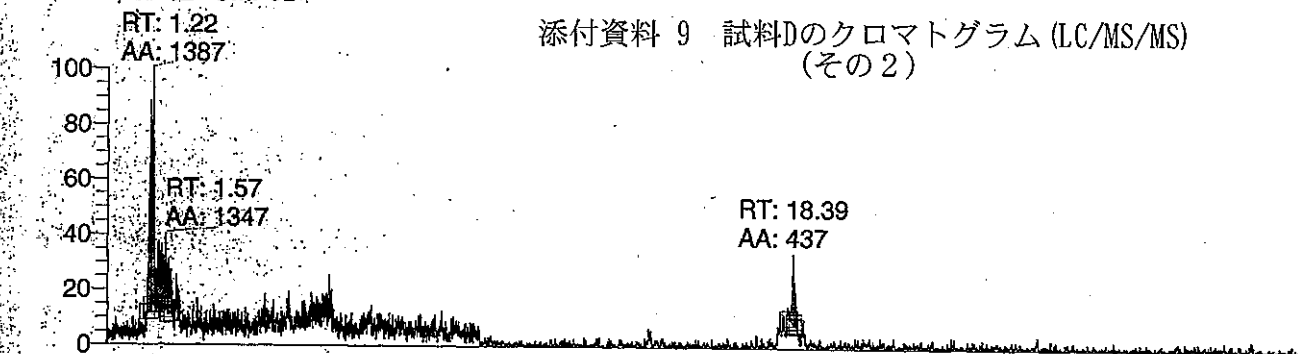
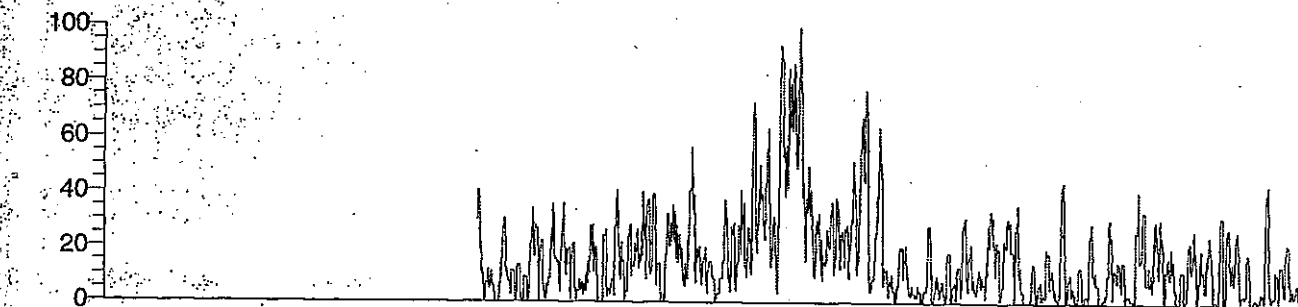
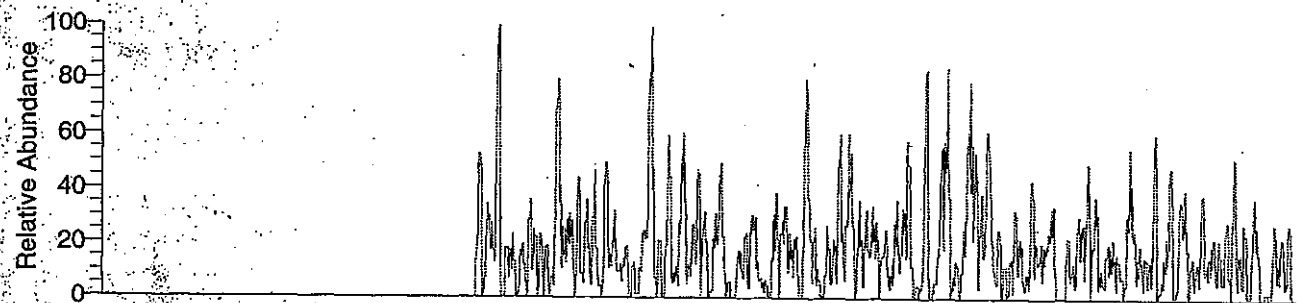
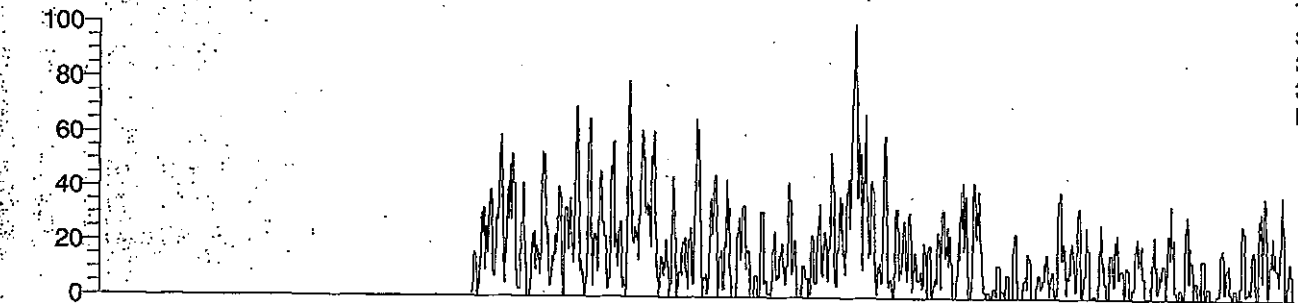
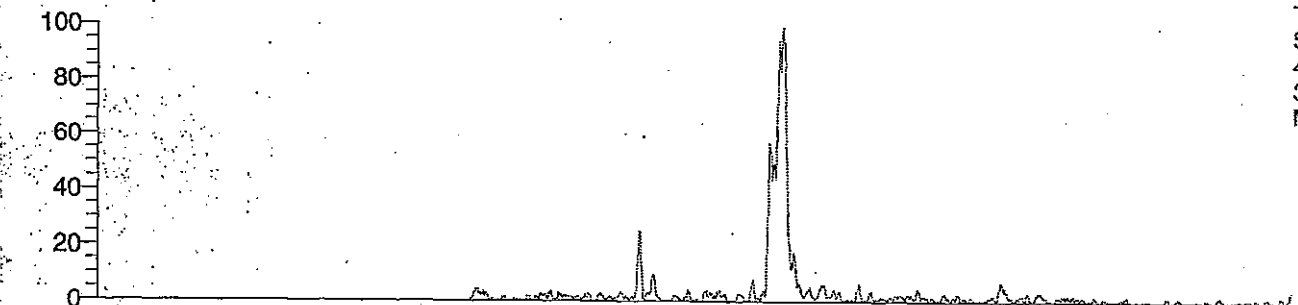
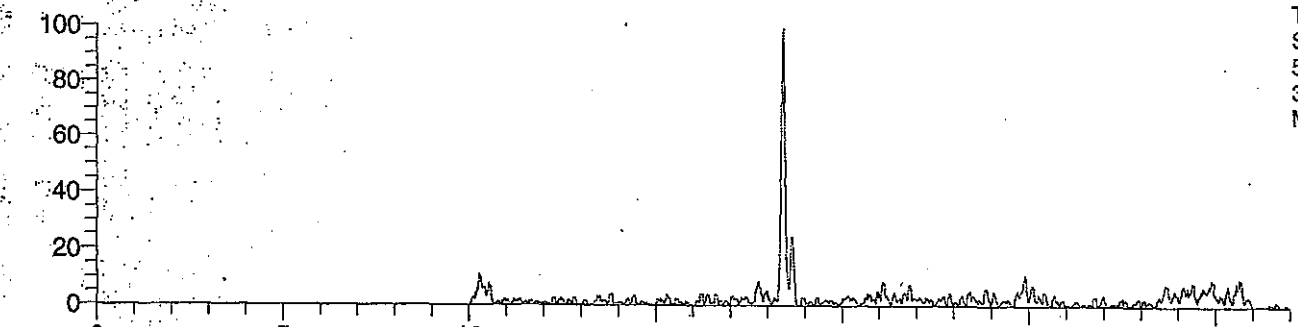


NL:
1.24E3
TIC F: + c ESI
SRM ms2
382.20@15.00 [
364.90-365.50]
MS 040323d@11



Time (min)

RT: 0.00 - 32.02 SM: 5B

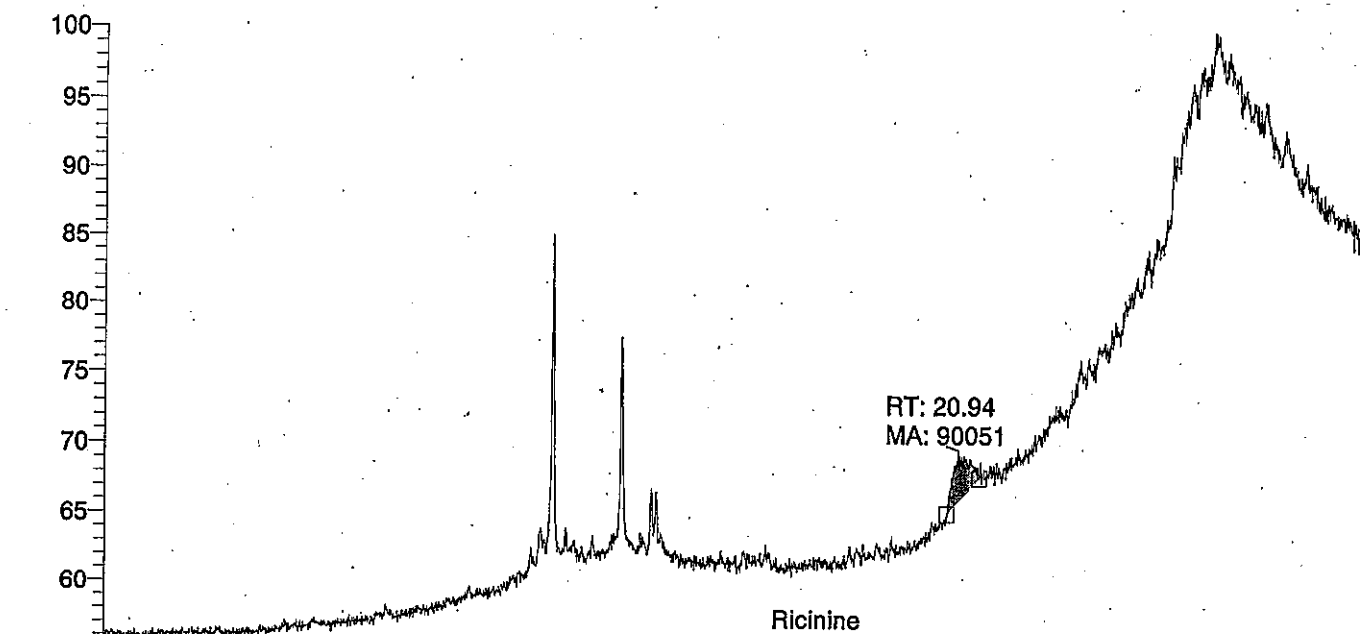
添付資料 9 試料Dのクロマトグラム (LC/MS/MS)
(その 2)NL: 6.34E2
TIC MS
040323d@11NL: 3.80E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
466.30@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@11NL: 2.78E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
417.10@15.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@11NL: 3.18E1
TIC F: + c ESI
SRM ms2
389.10@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@11NL: 3.95E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
451.00@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@11NL: 3.42E2
TIC F: + c ESI
SRM ms2
501.30@20.00 [
310.70-311.30]
MS 040323d@11

Time (min)

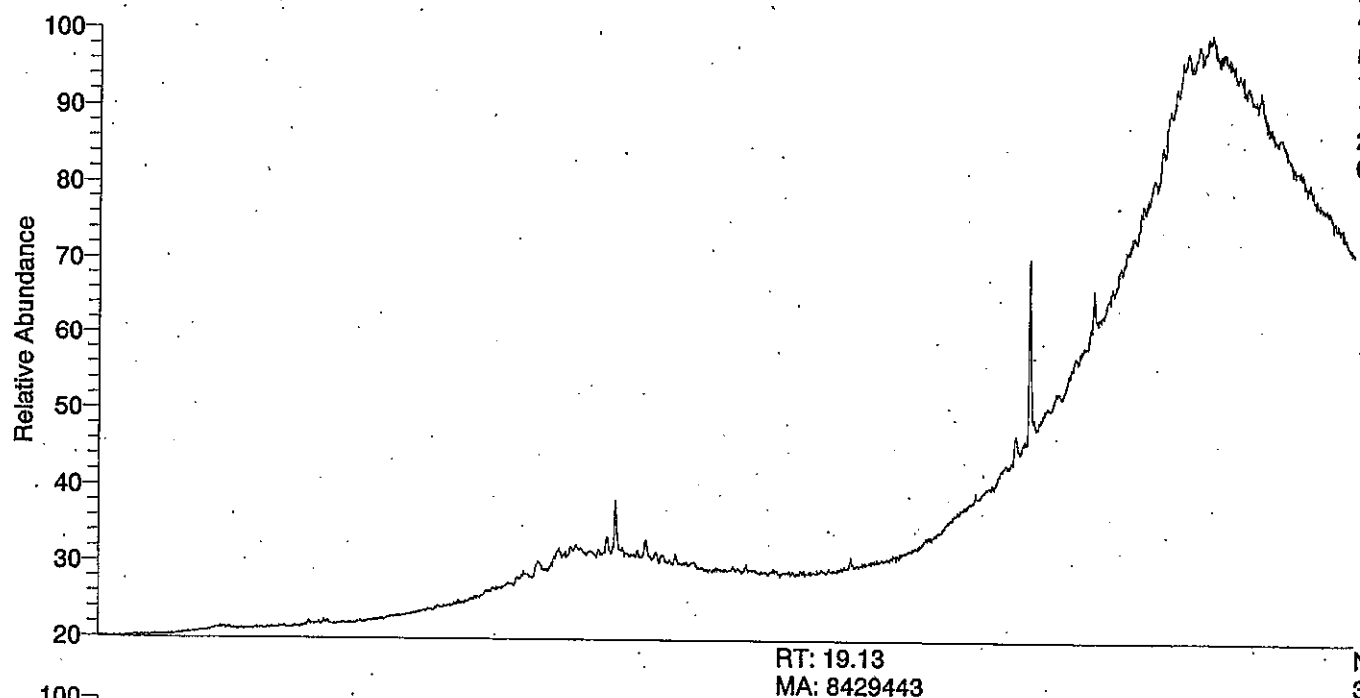
RT: 5.80 - 28.03

添付資料 10 0.05 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (リシニン : GC/MS)

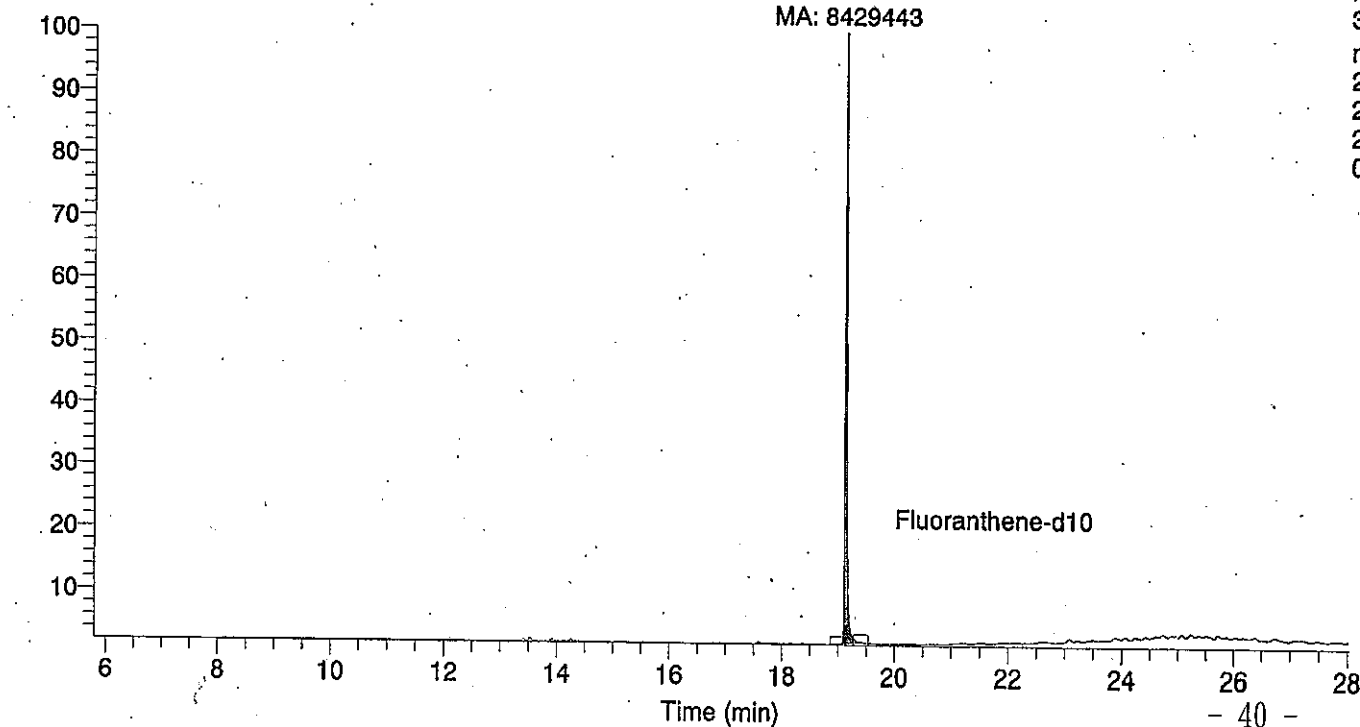
NL:
1.46E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
04



NL:
4.32E5
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
04



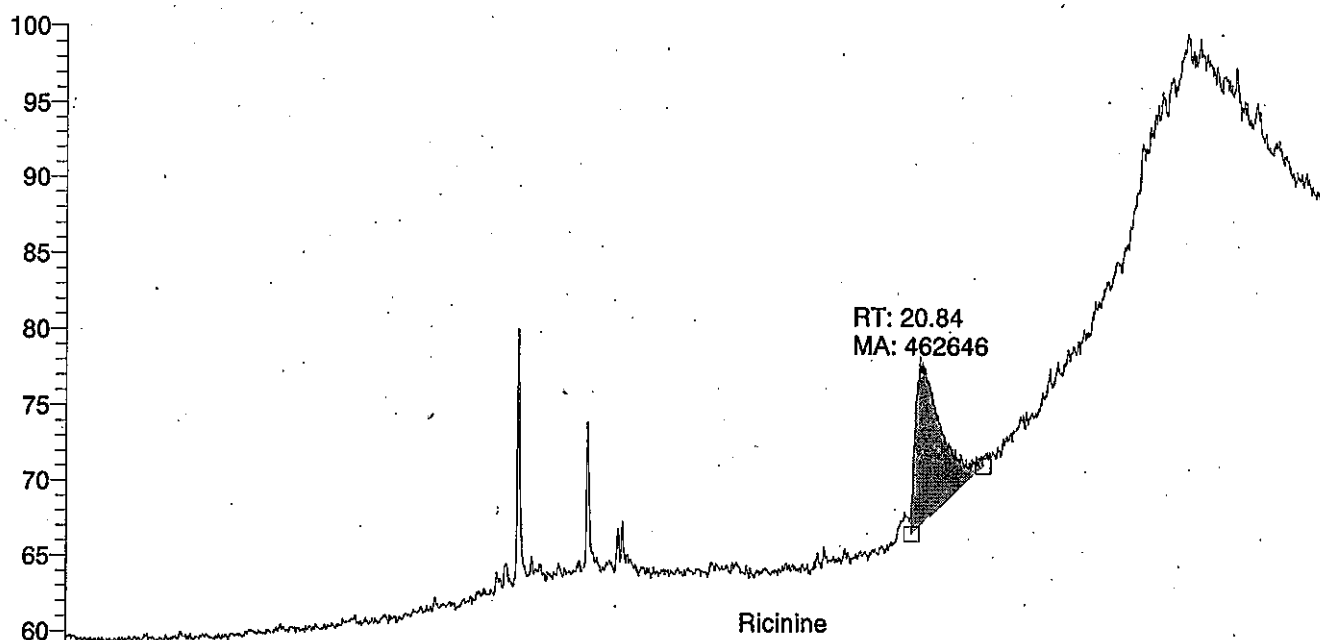
NL:
3.89E6
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
04



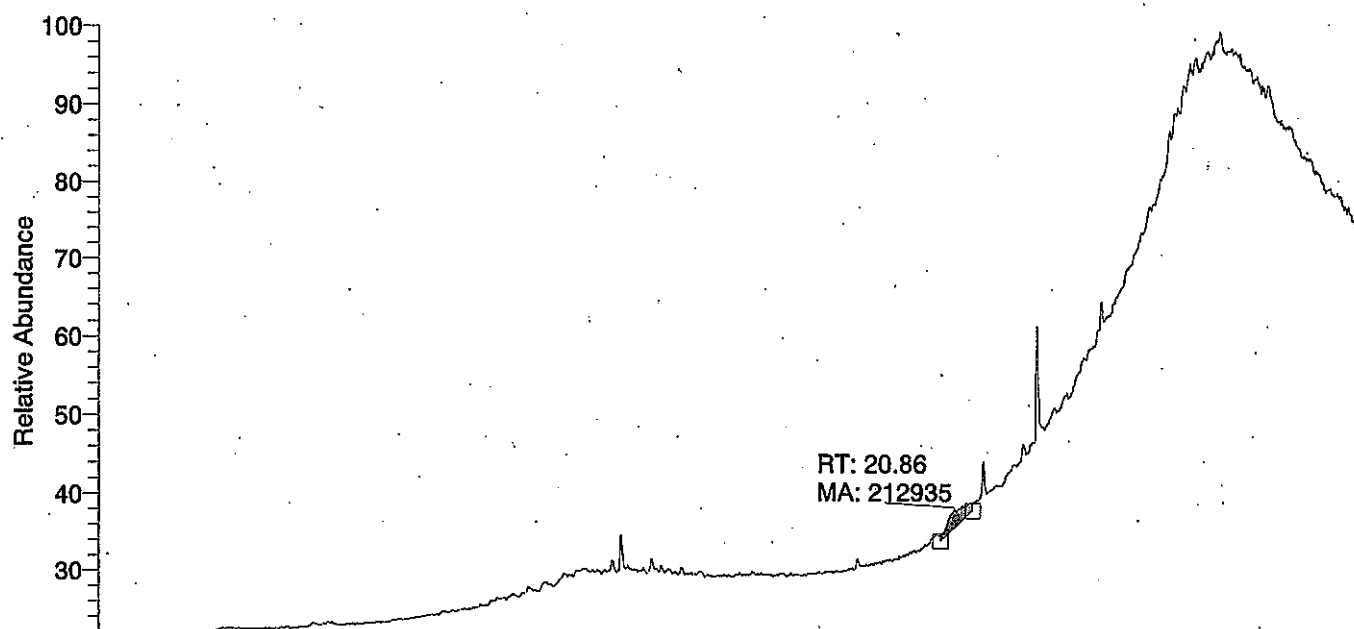
RT: 5.79 - 27.99 SM: 5G

添付資料 11 0.1 μ g/mL標準物質のクロマトグラム (リシニン: GC/MS)

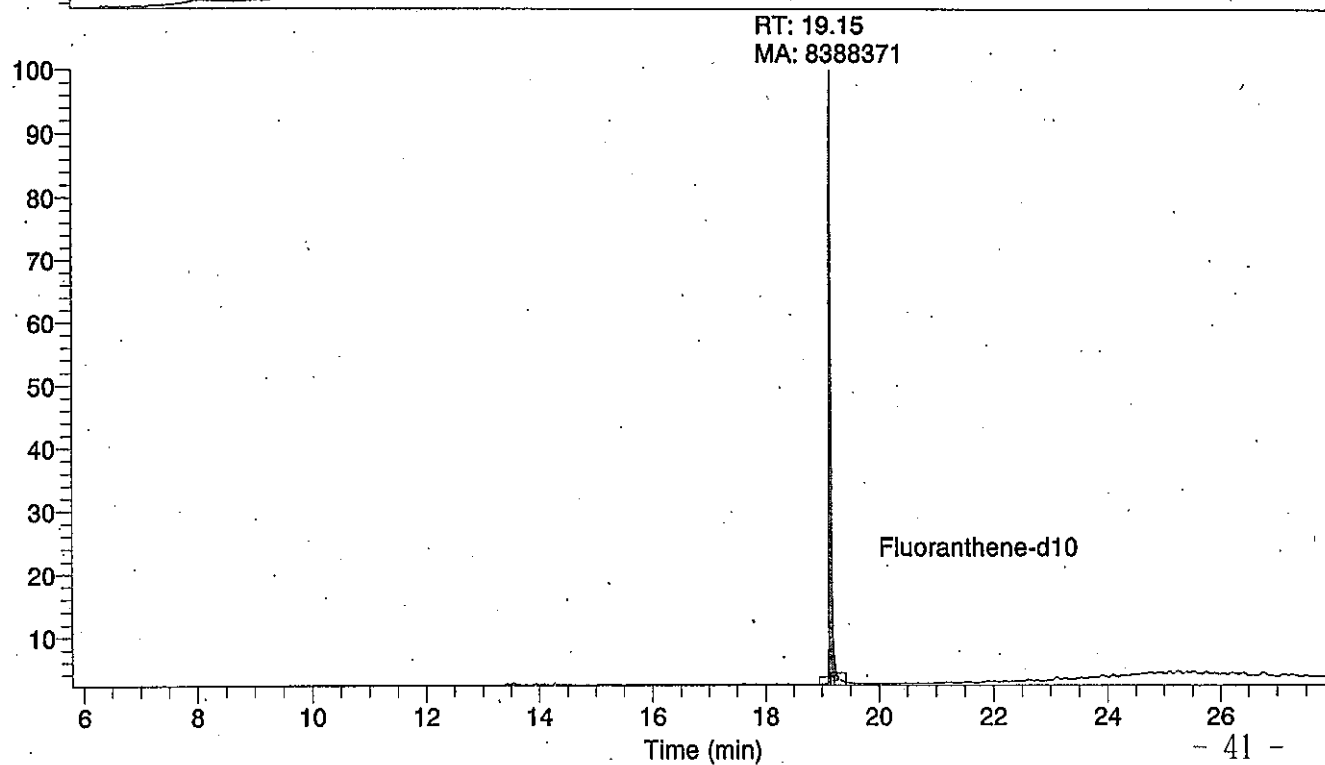
NL:
1.38E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
05



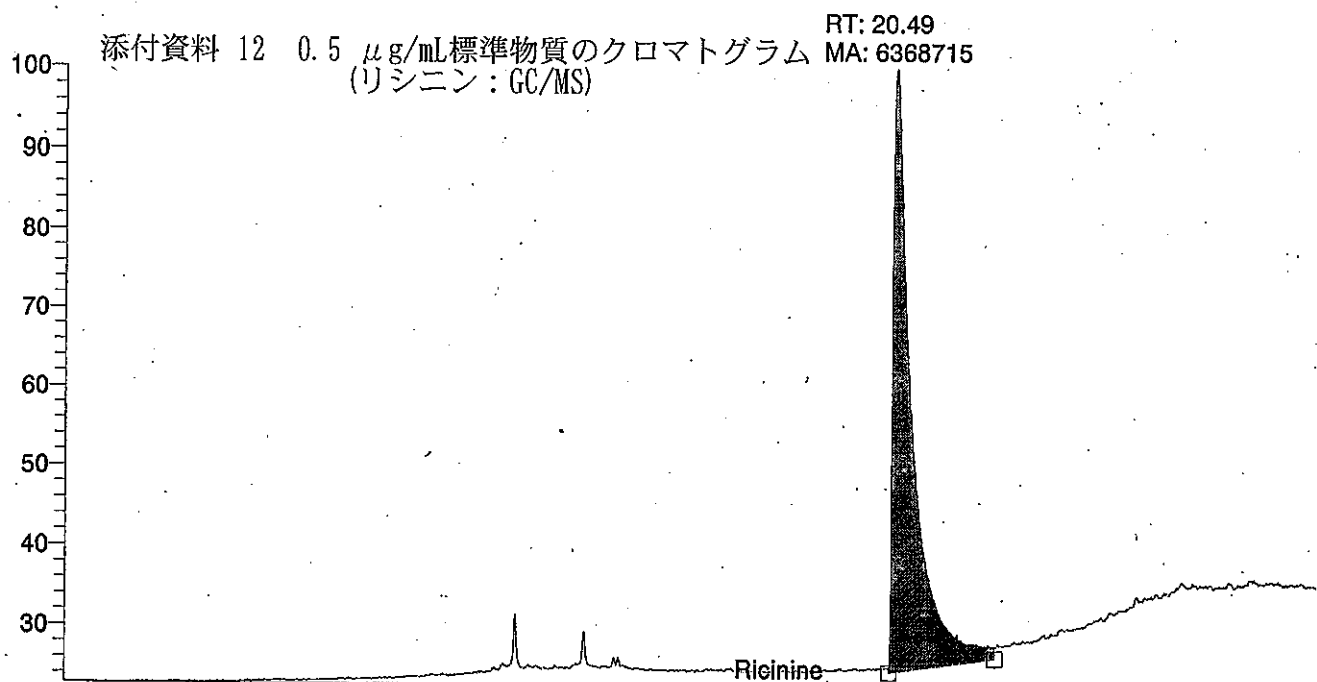
NL:
4.02E5
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
05



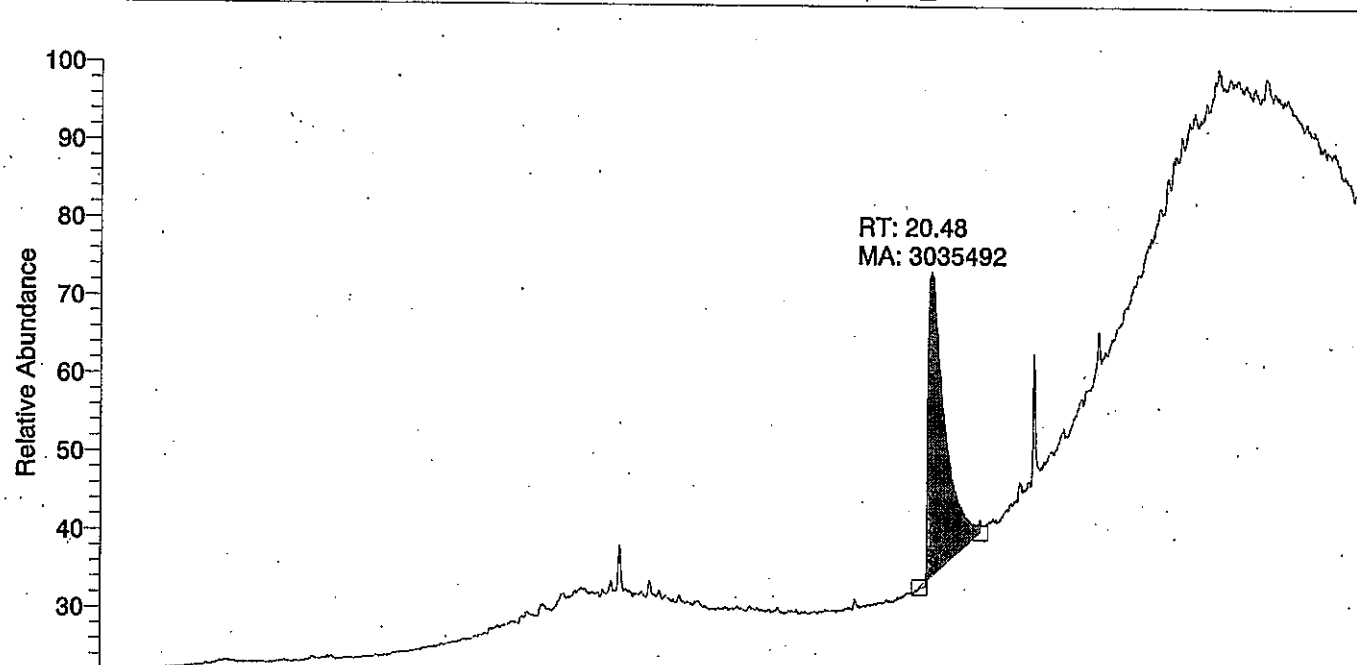
NL:
3.51E6
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
05



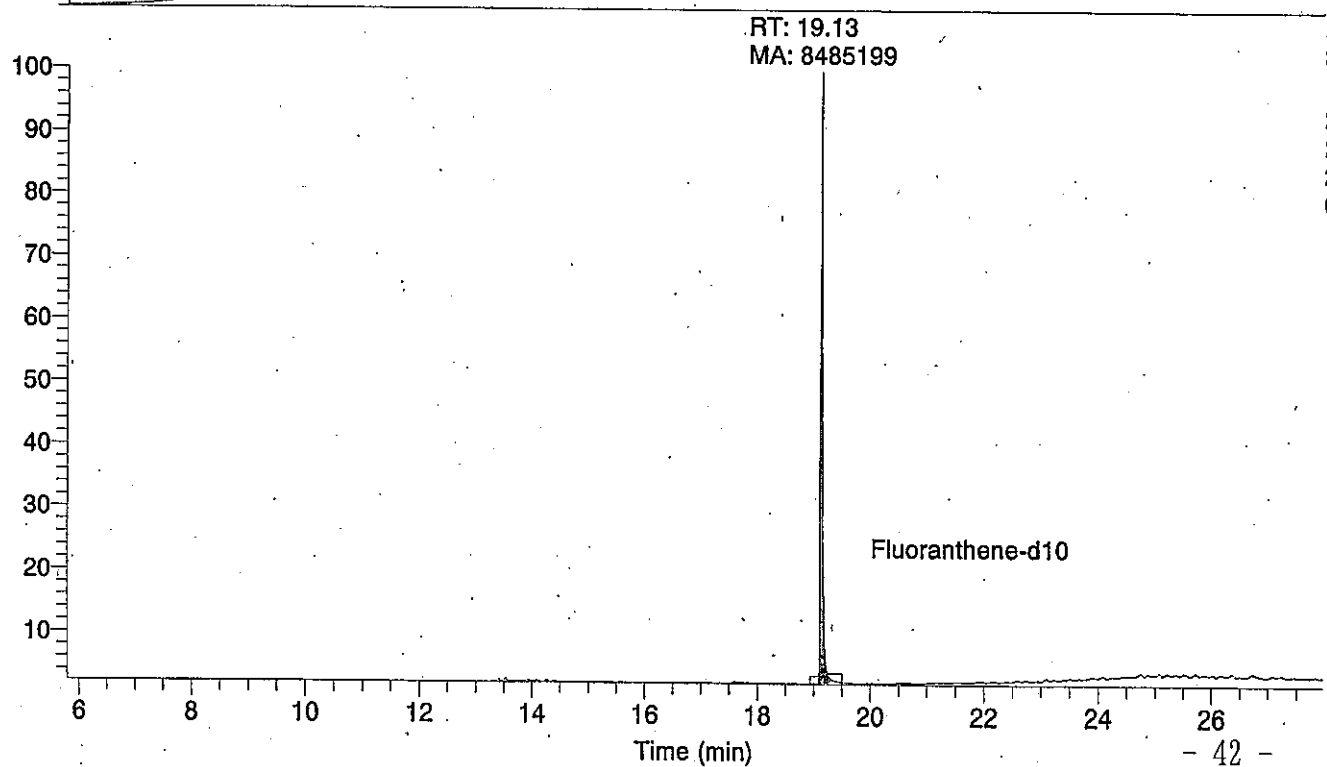
RT: 5.78 - 27.97 SM: 5G



NL:
3.57E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
06

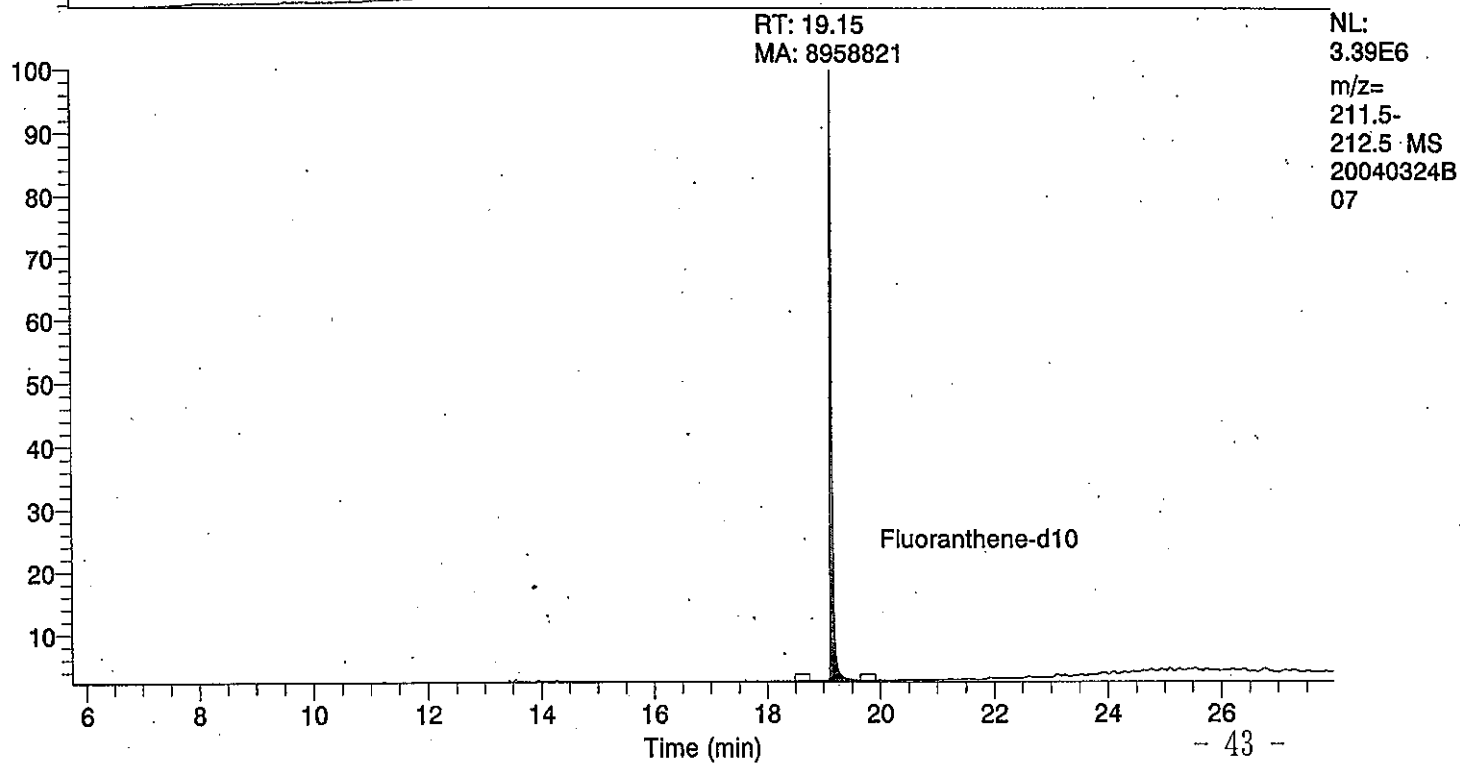
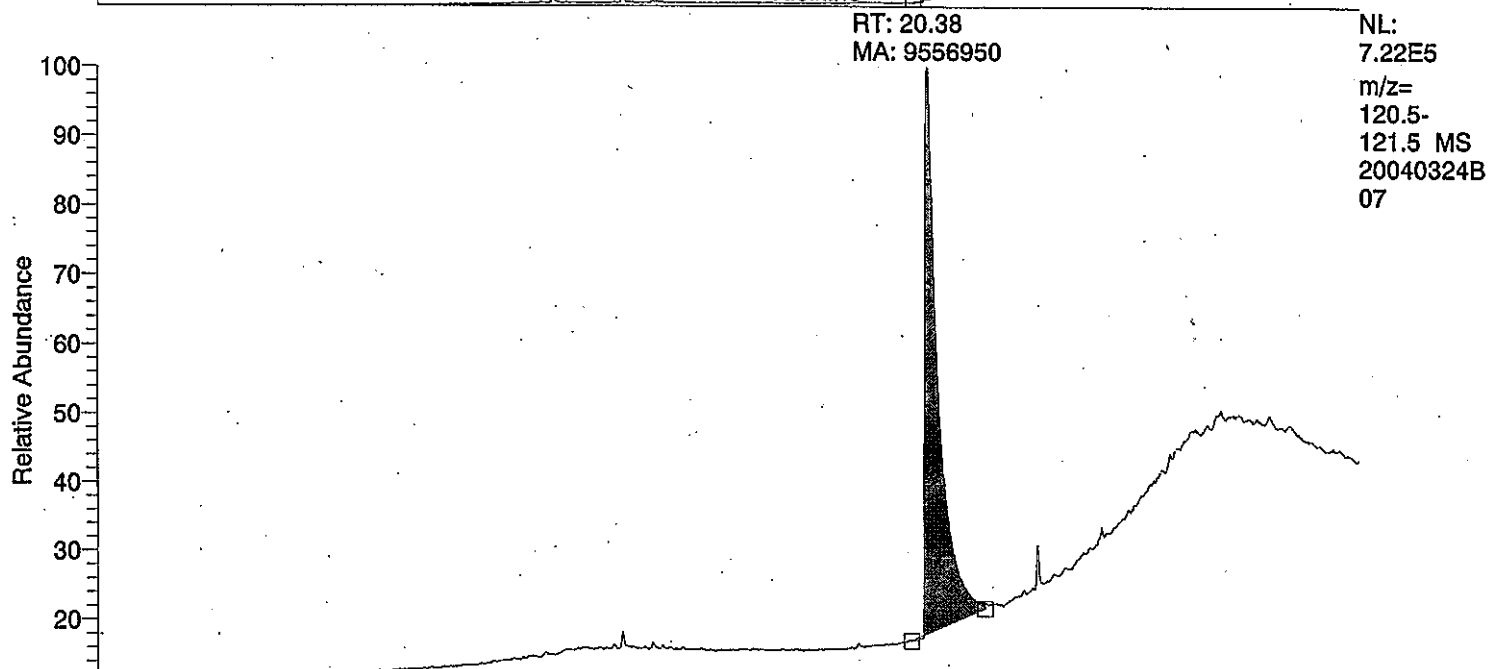
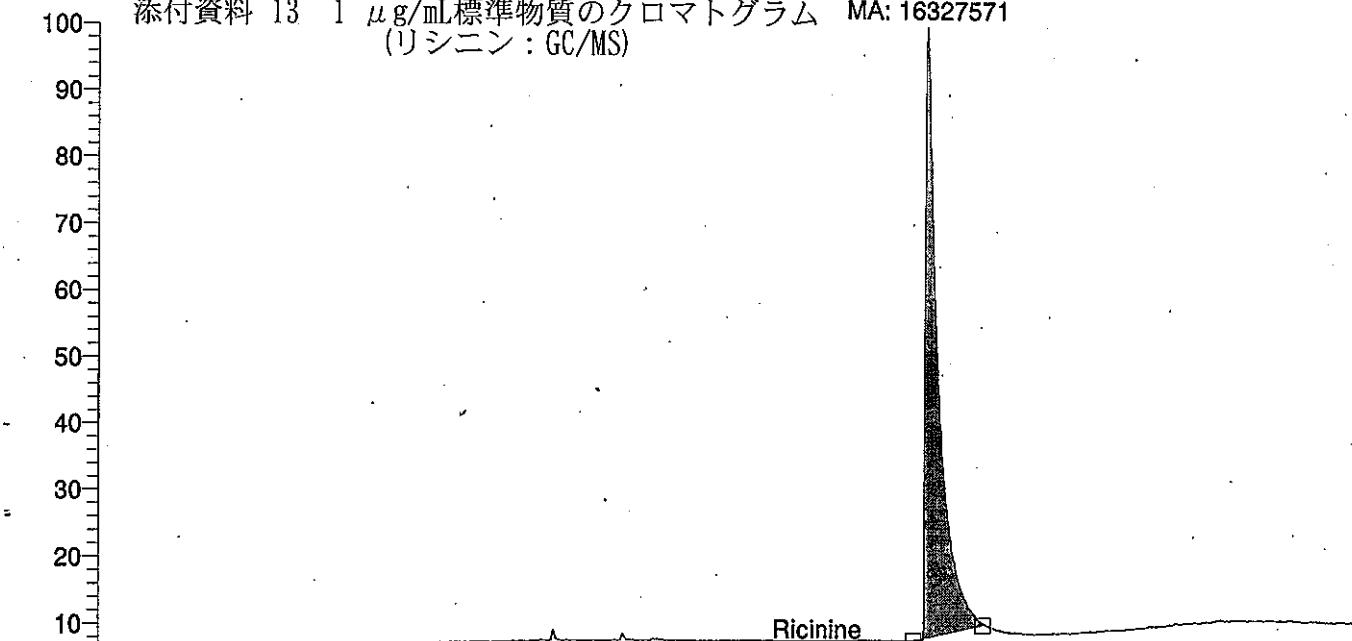


NL:
3.85E5
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
06



NL:
3.56E6
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
06

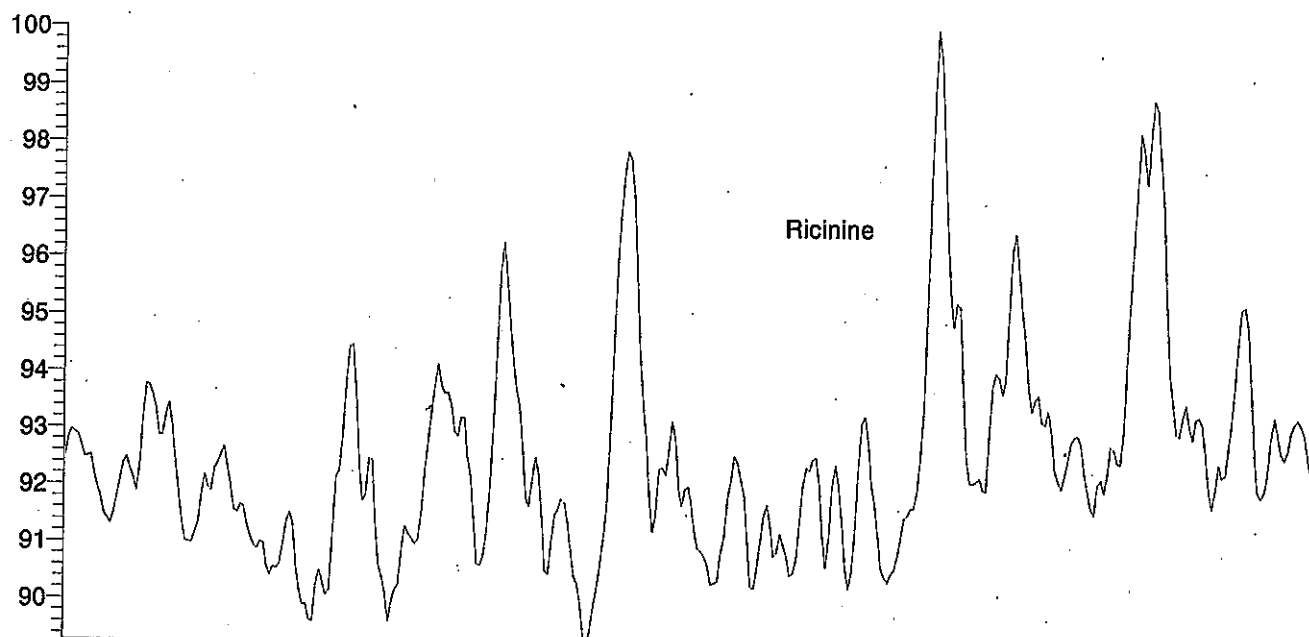
RT: 5.74 - 27.96 SM: 5G

添付資料 13 1 $\mu\text{g/mL}$ 標準物質のクロマトグラム
(1) シニン: GC/MSRT: 20.37
MA: 16327571NL:
1.13E6
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
07

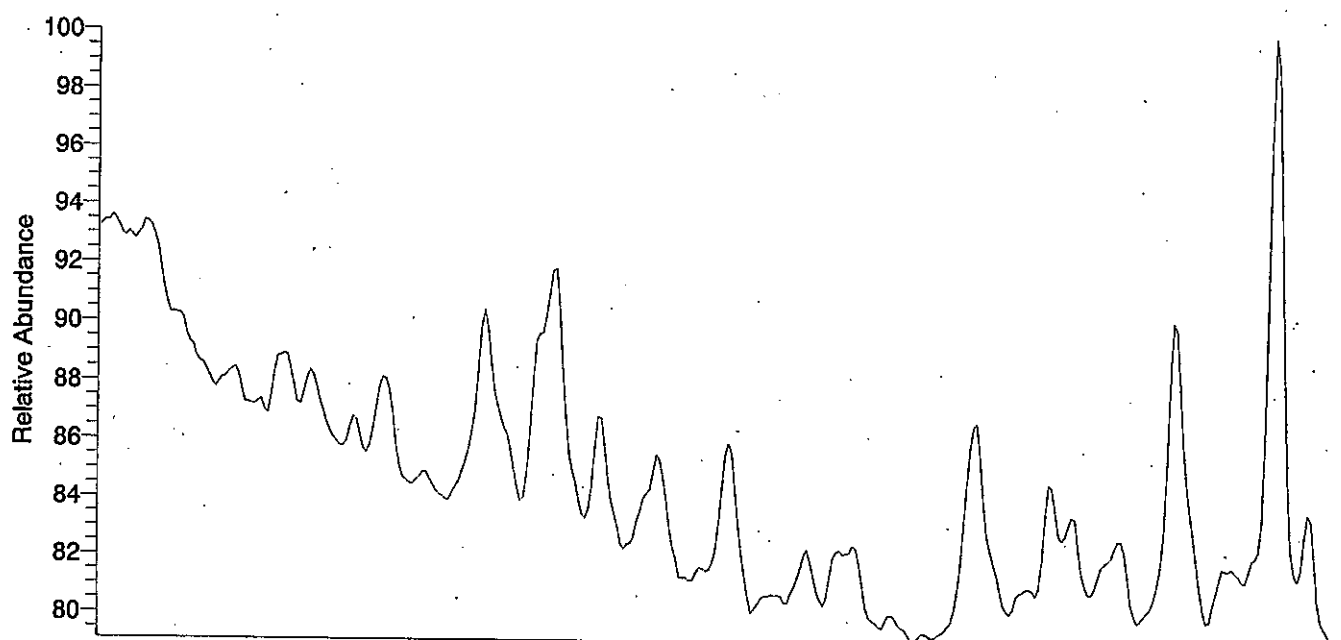
RT: 18.47 - 21.04 SM: 5G

添付資料 14 試料Aのクロマトグラム (リシニン : GC/MS)

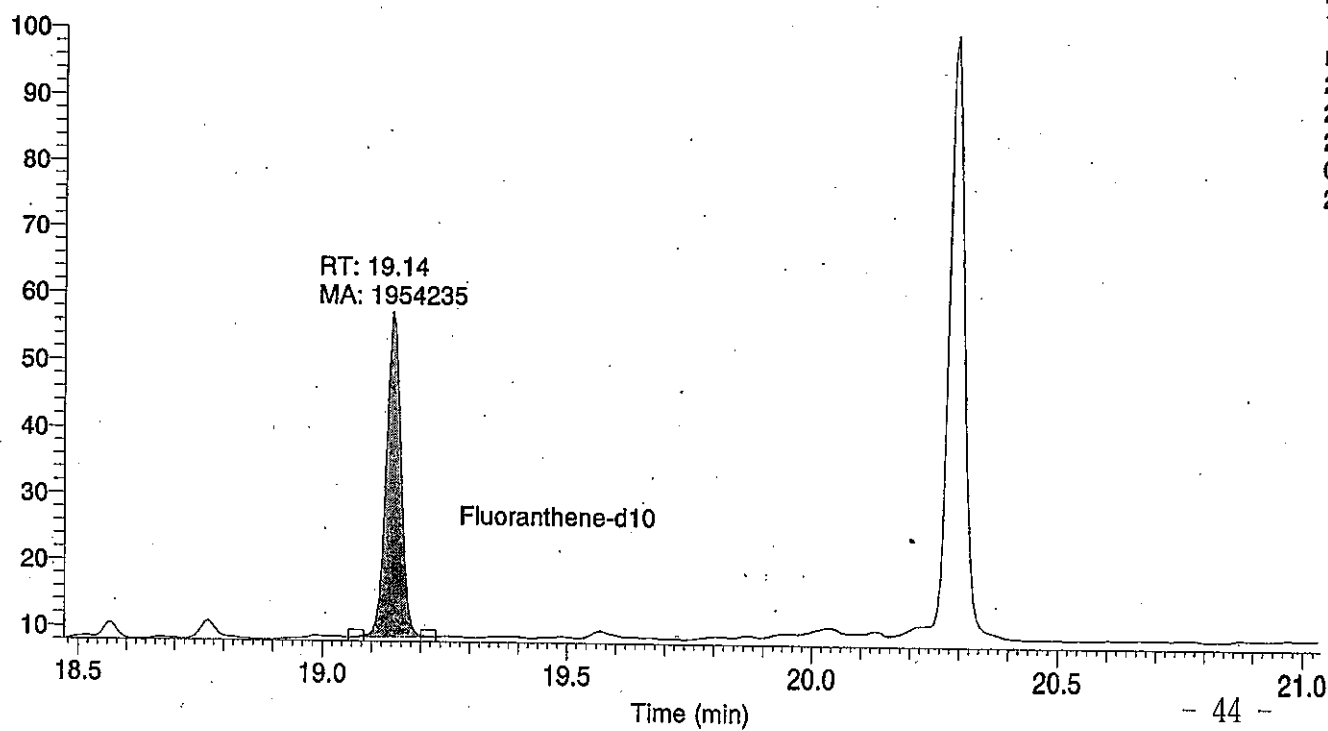
NL:
3.69E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
09_040324
230148



NL:
1.51E6
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
09_040324
230148

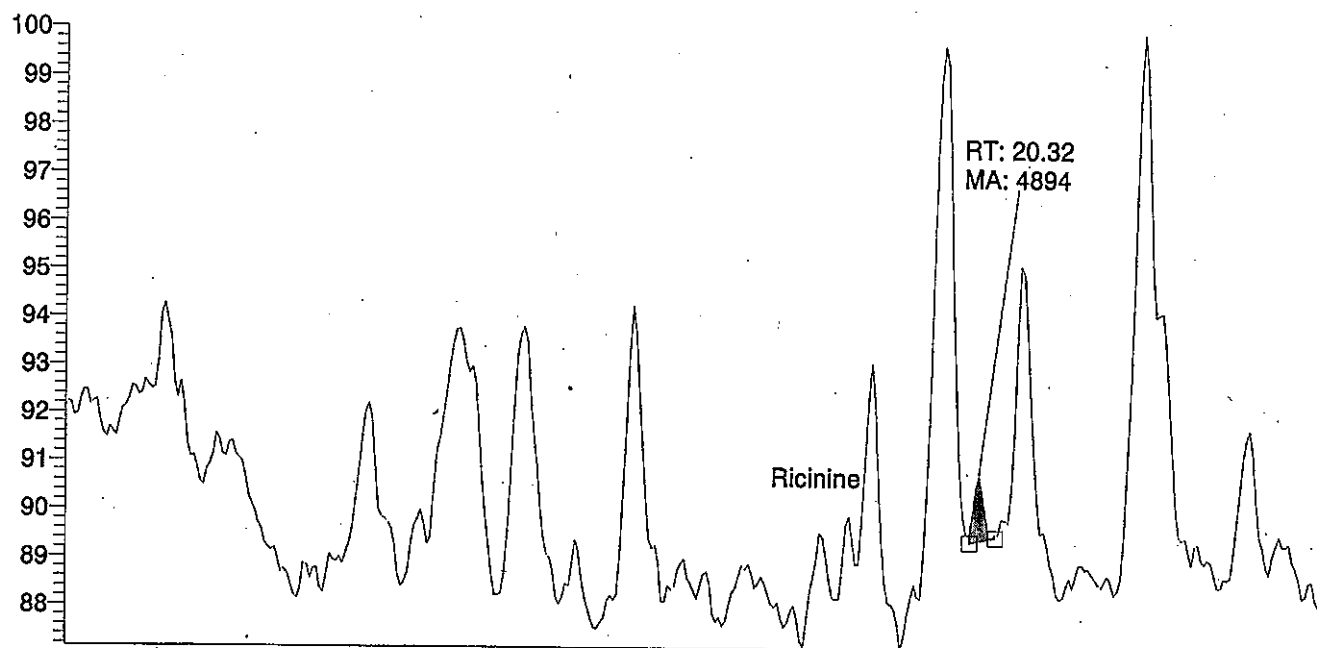


NL:
1.90E6
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
09_040324
230148

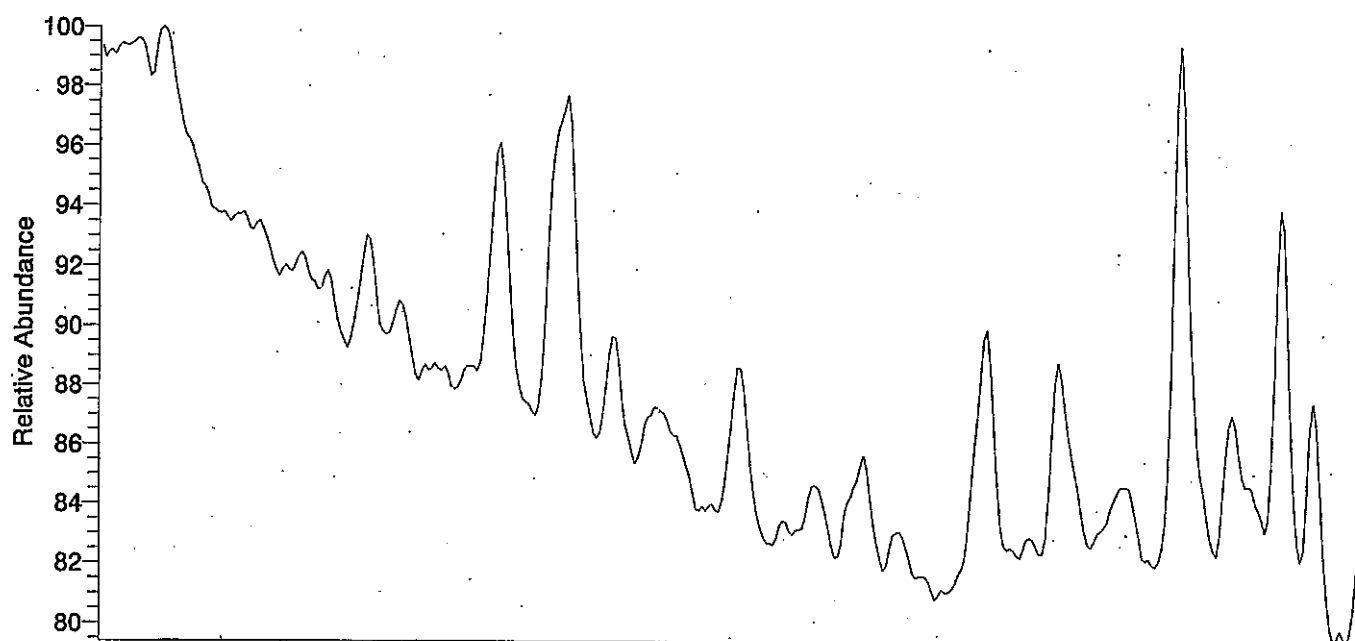


RT: 18.43 - 21.03 SM: 5G

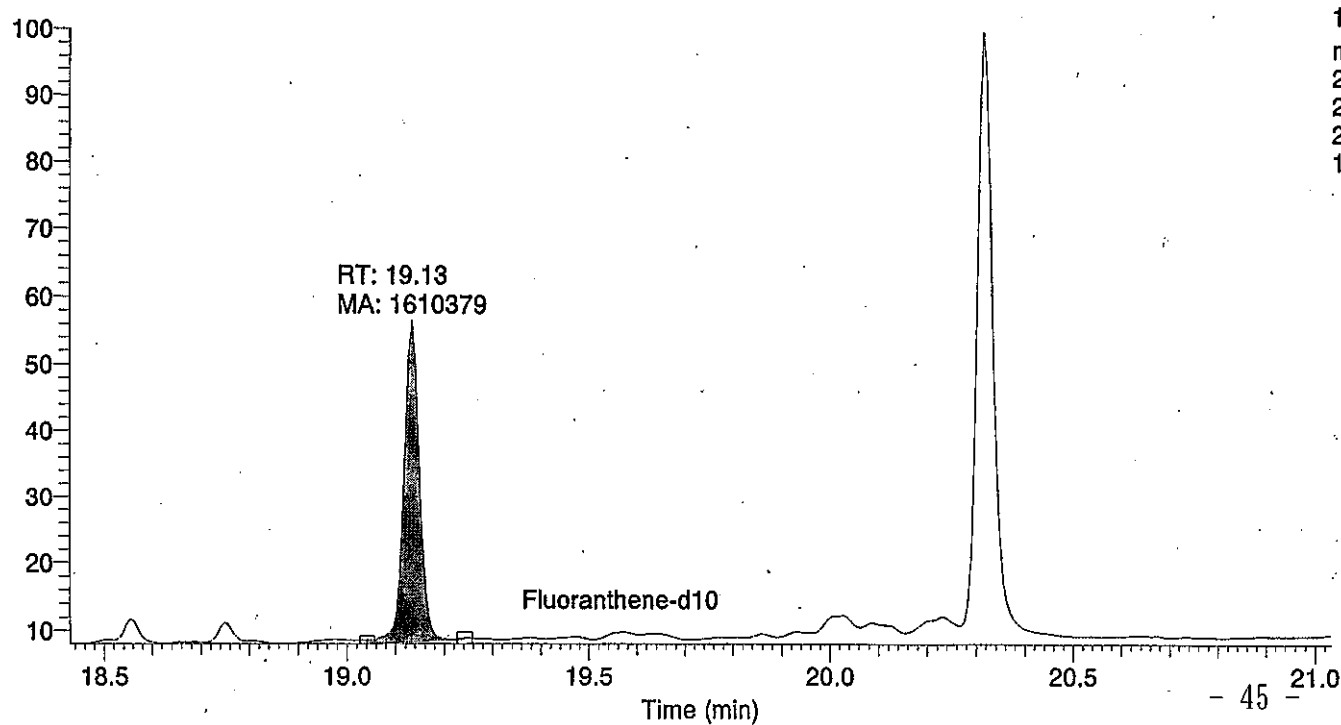
添付資料 15 試料Bのクロマトグラム (リシニン : GC/MS)



NL:
2.65E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
10



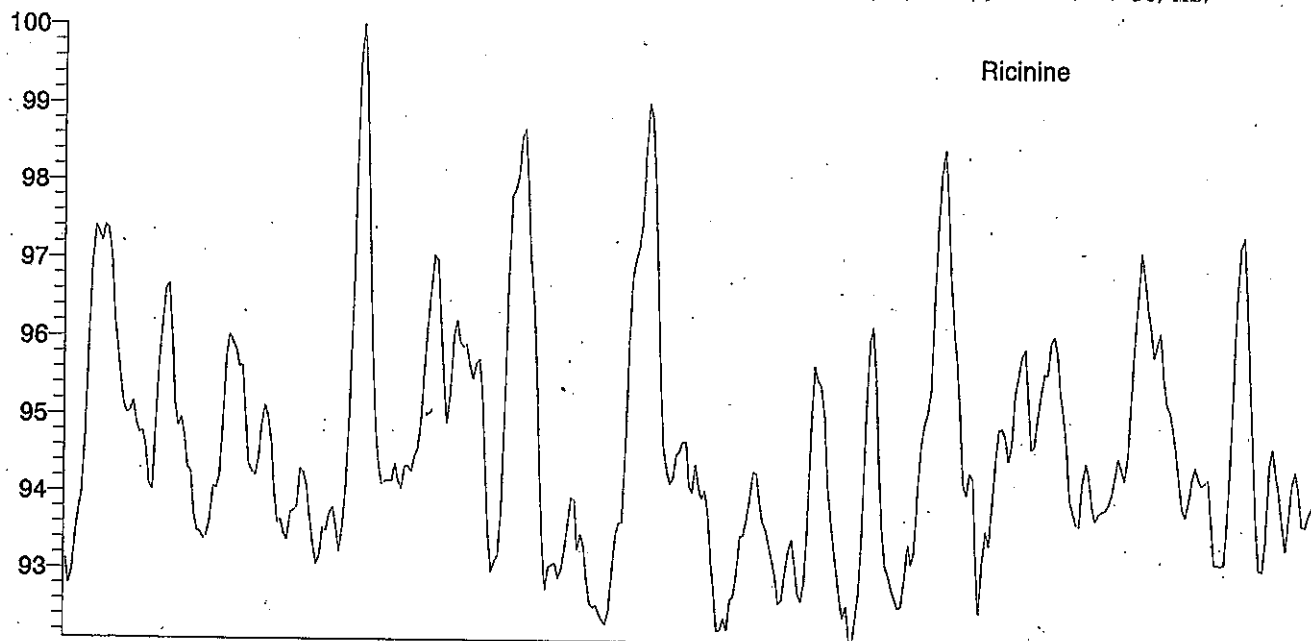
NL:
1.19E6
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
10



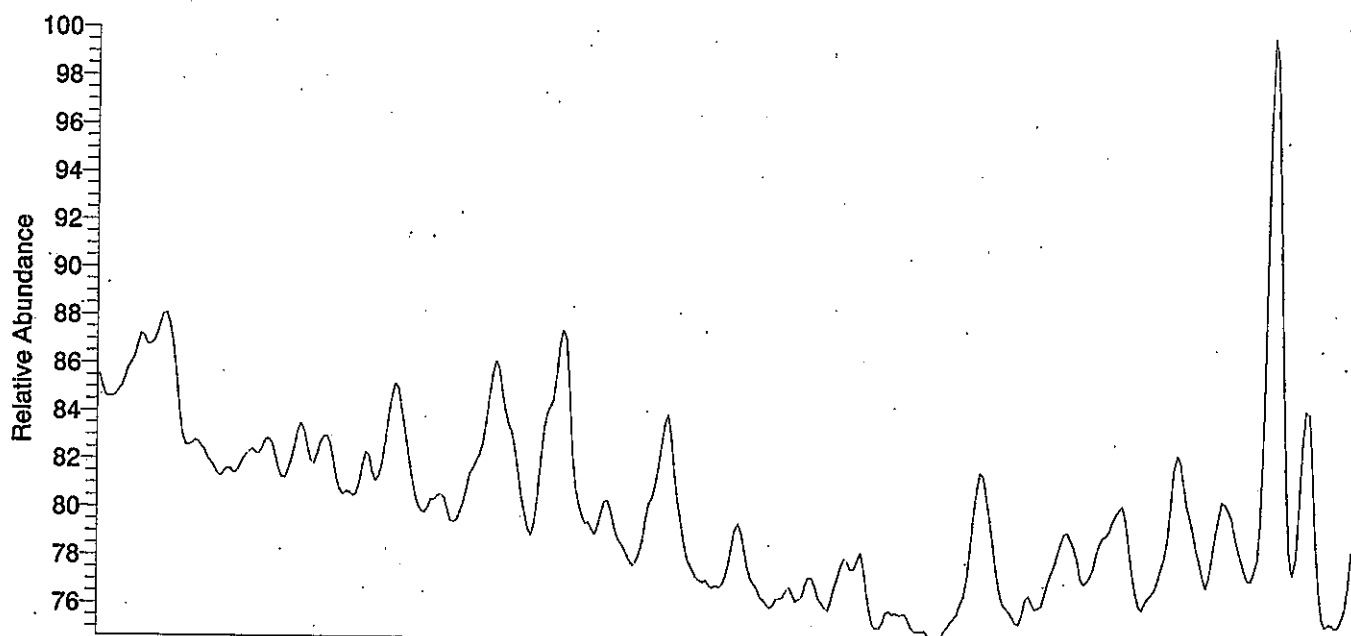
NL:
1.51E6
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
10

添付資料 16 試料Cのクロマトグラム (リシニン : GC/MS)

NL:
3.29E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
11_040325
002636

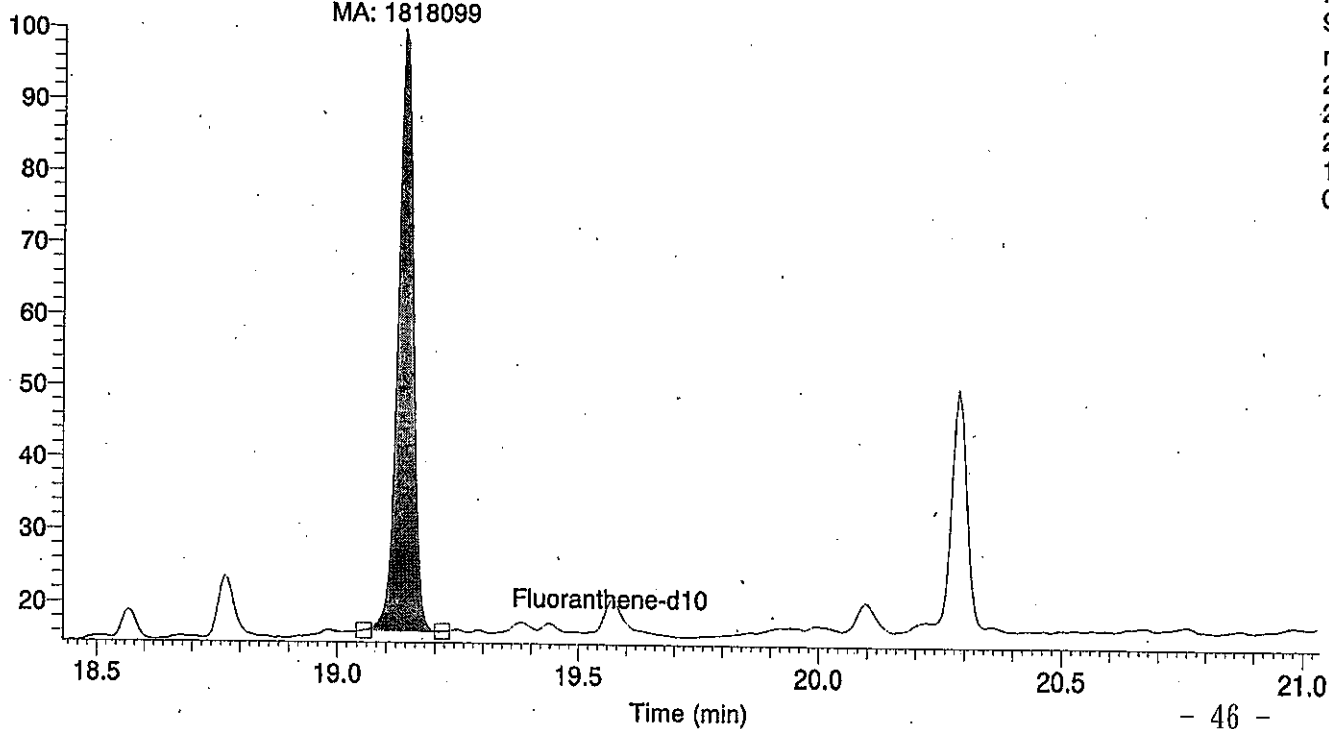


NL:
1.38E6
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
11_040325
002636



RT: 19.13
MA: 1818099

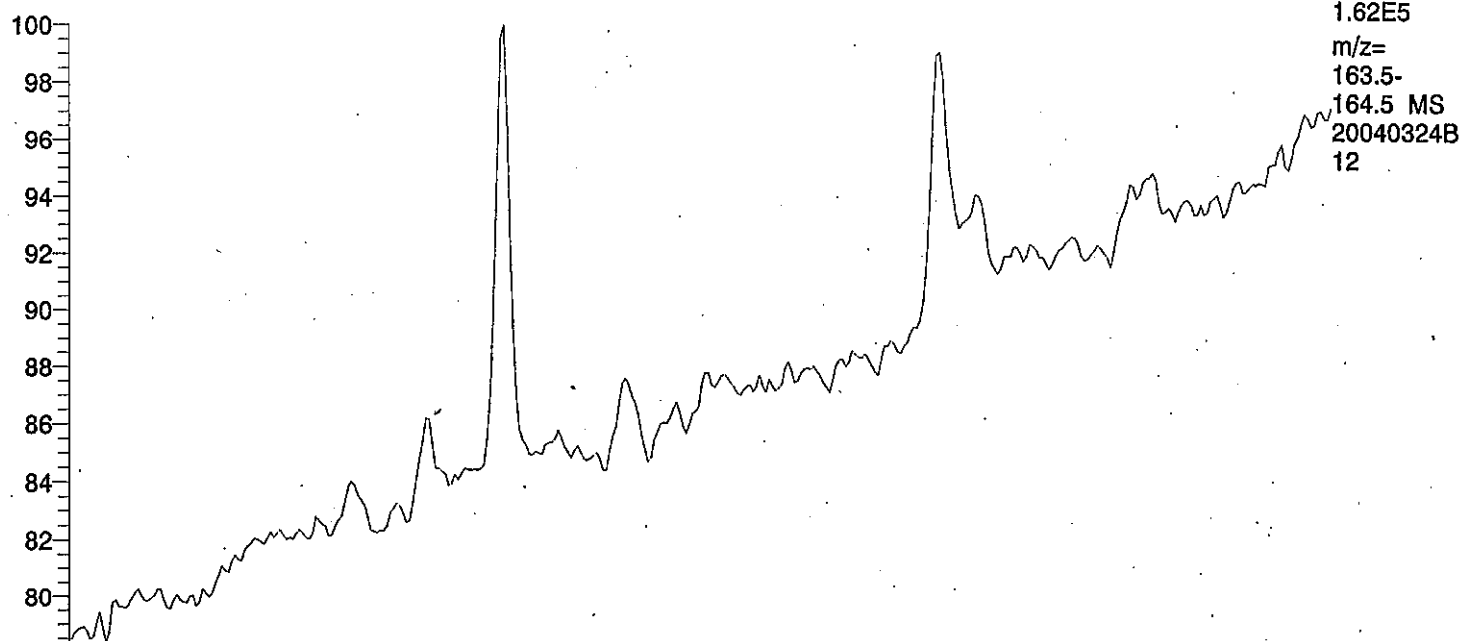
NL:
9.95E5
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
11_040325
002636



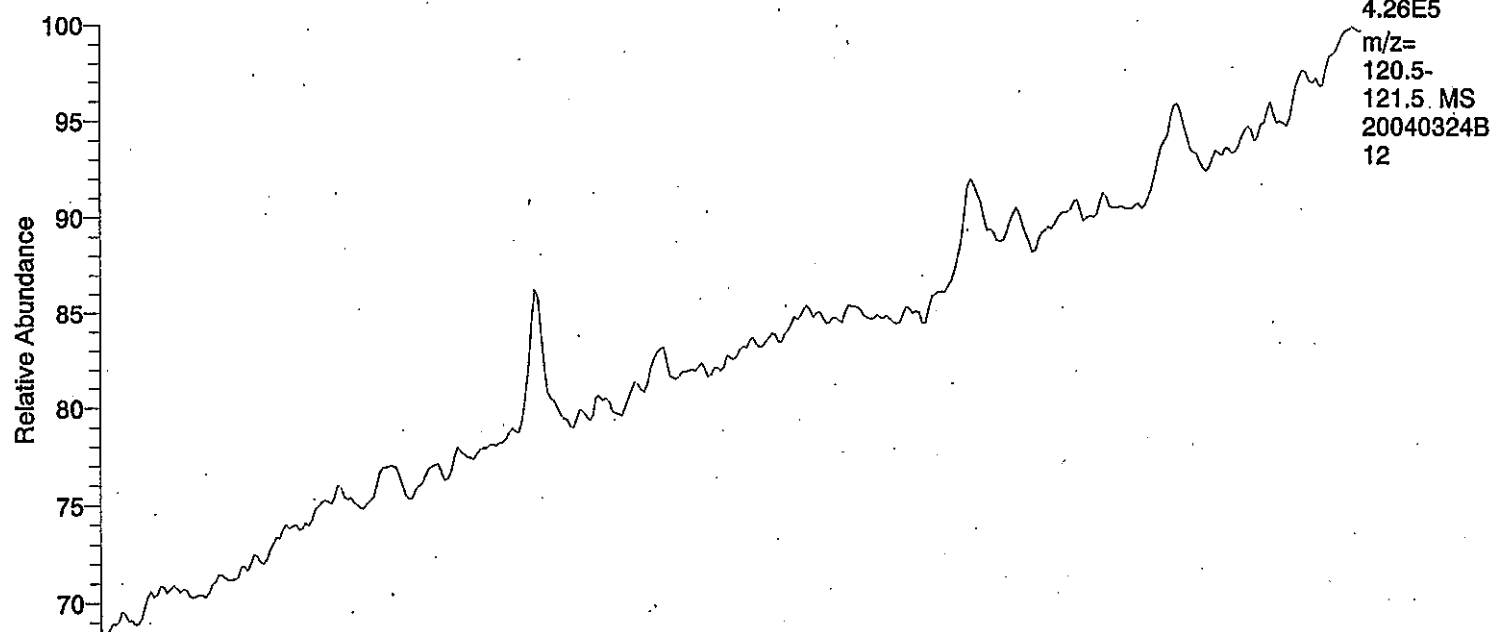
RT: 18.45 - 21.06 SM: 5G

添付資料 17 試料Dのクロマトグラム (リシニン : GC/MS)

NL:
1.62E5
m/z=
163.5-
164.5 MS
20040324B
12

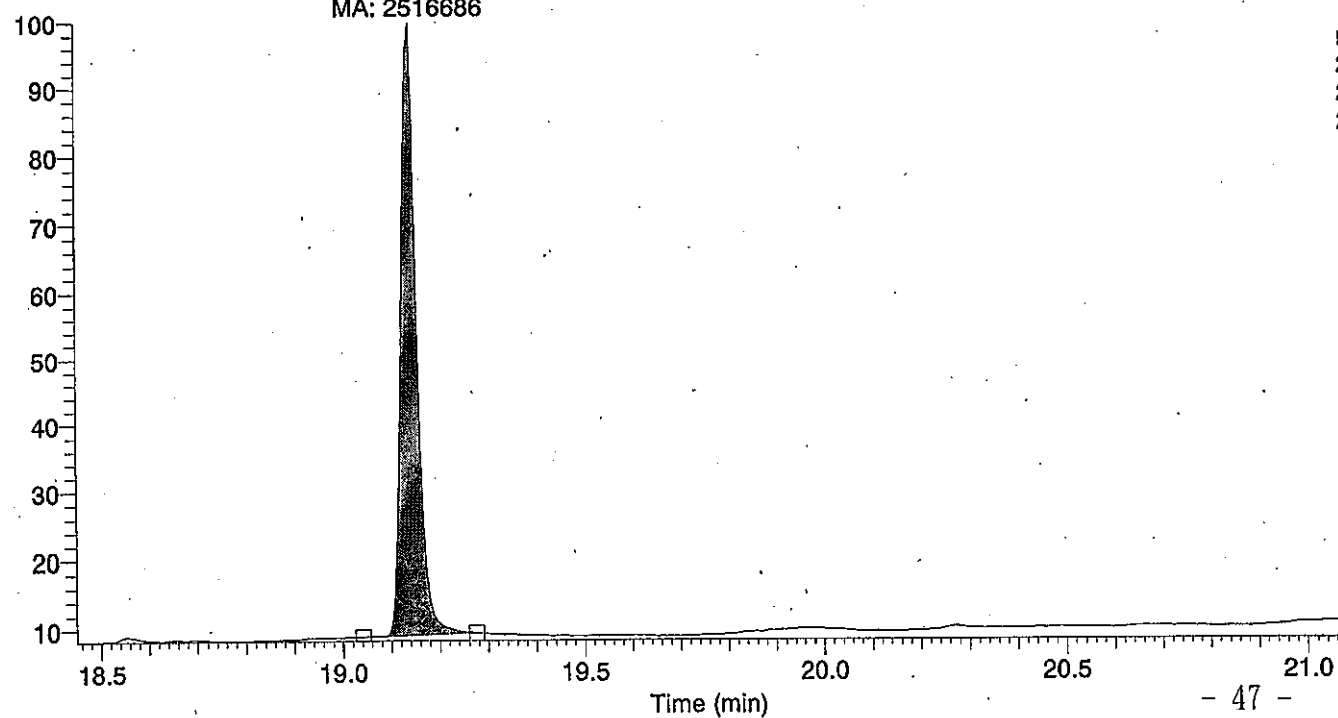


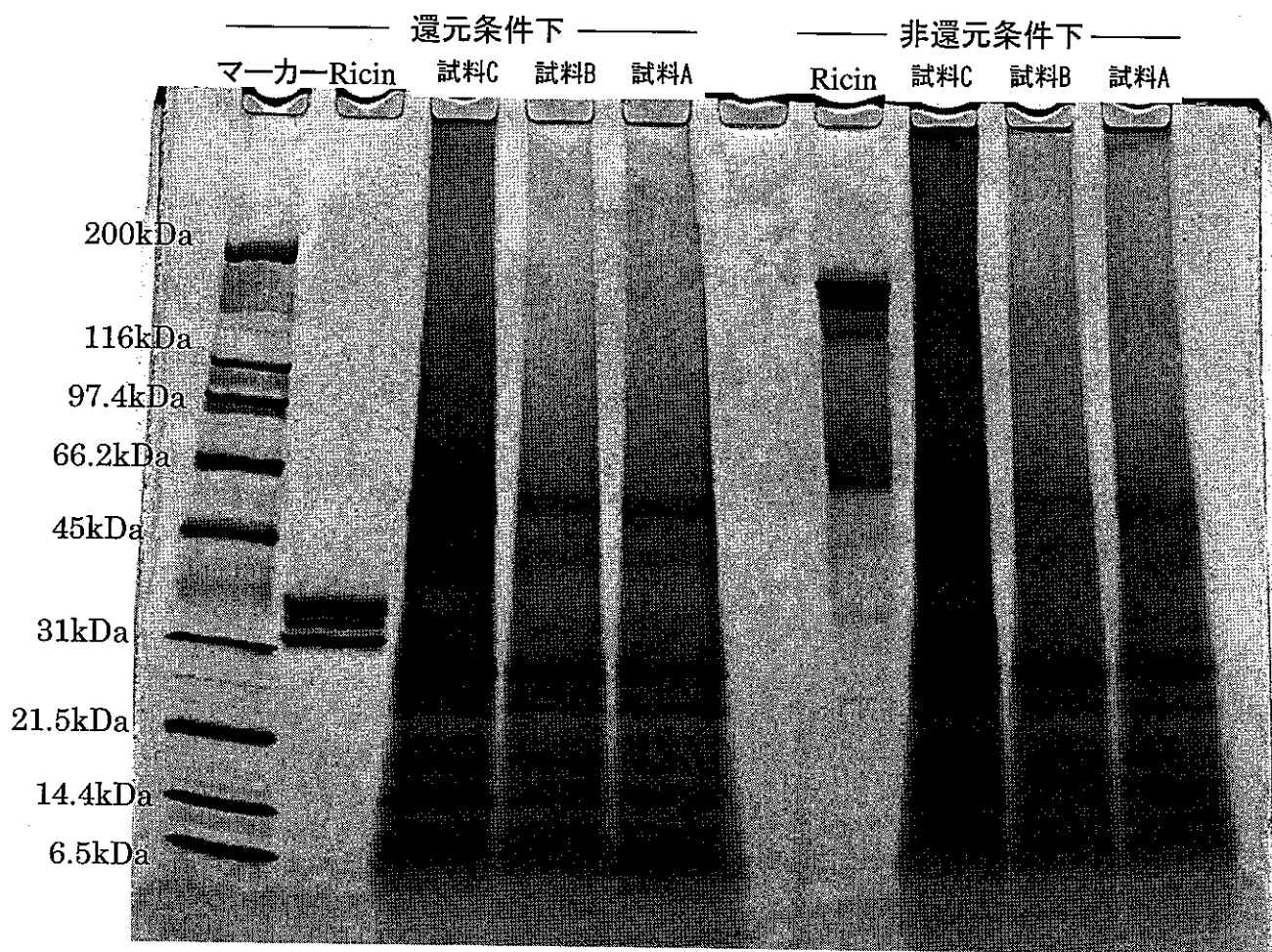
NL:
4.26E5
m/z=
120.5-
121.5 MS
20040324B
12



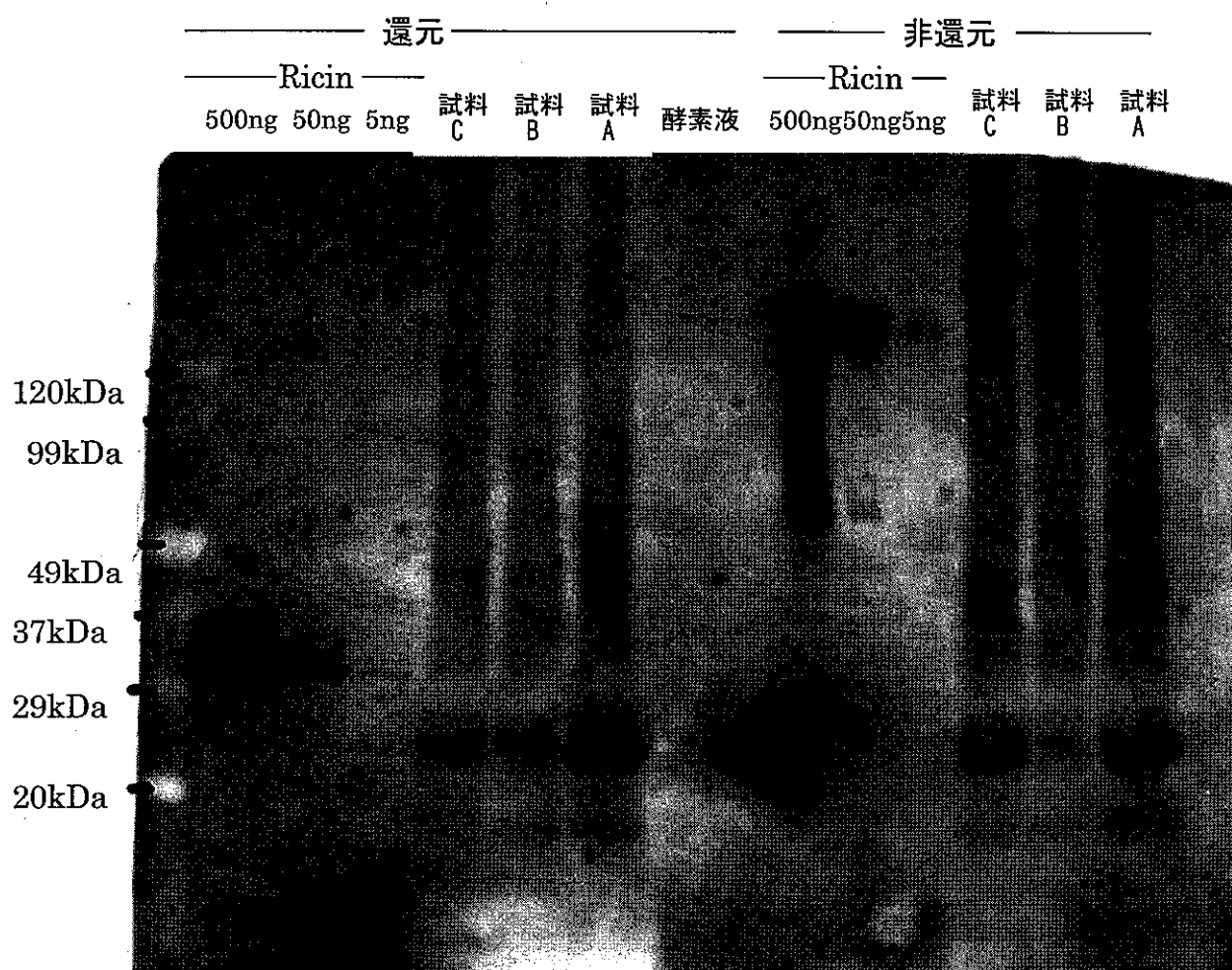
RT: 19.14
MA: 2516686

NL:
1.27E6
m/z=
211.5-
212.5 MS
20040324B
12

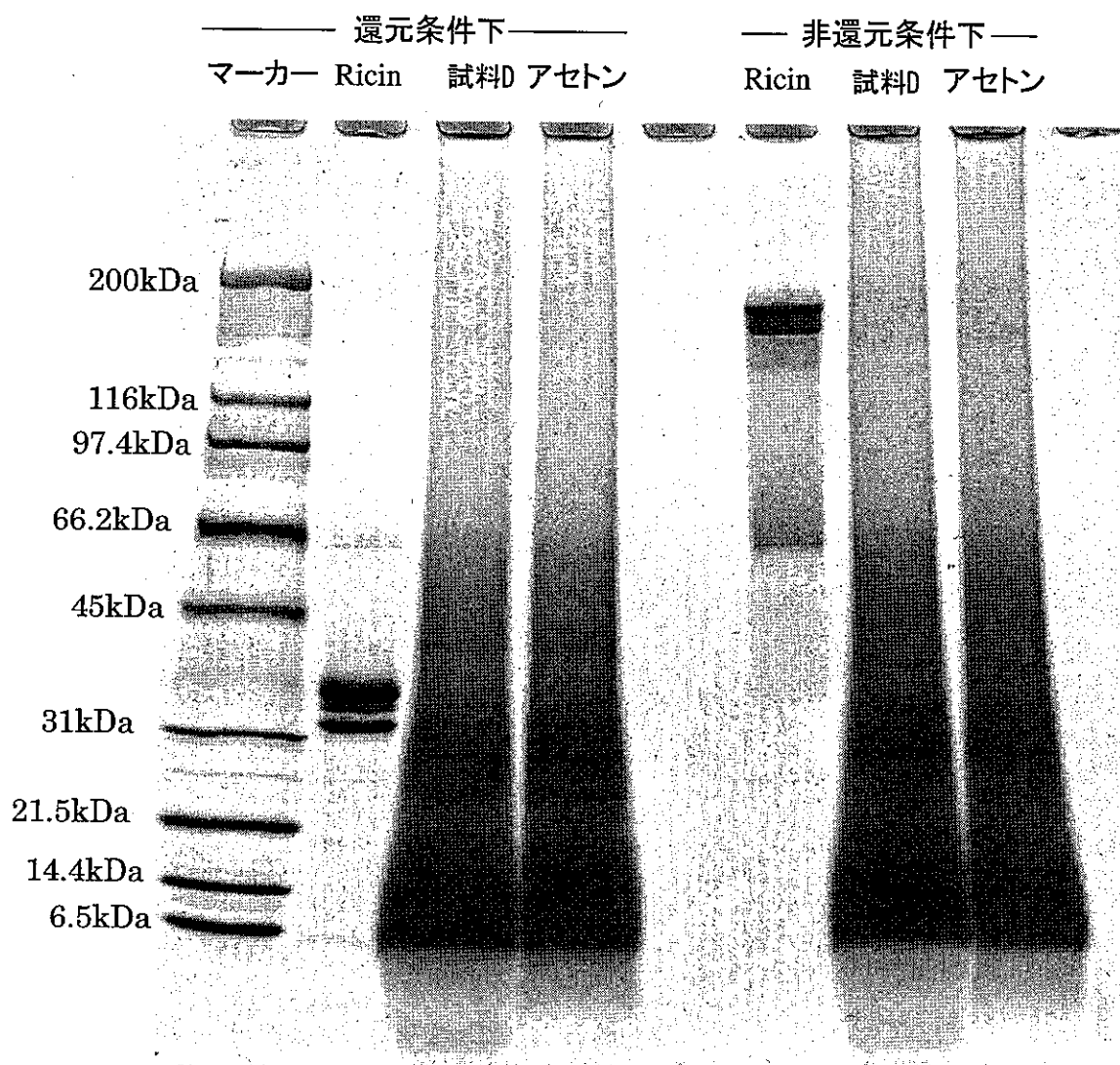




添付資料18 粉末試料のSDS-PAGE泳動像

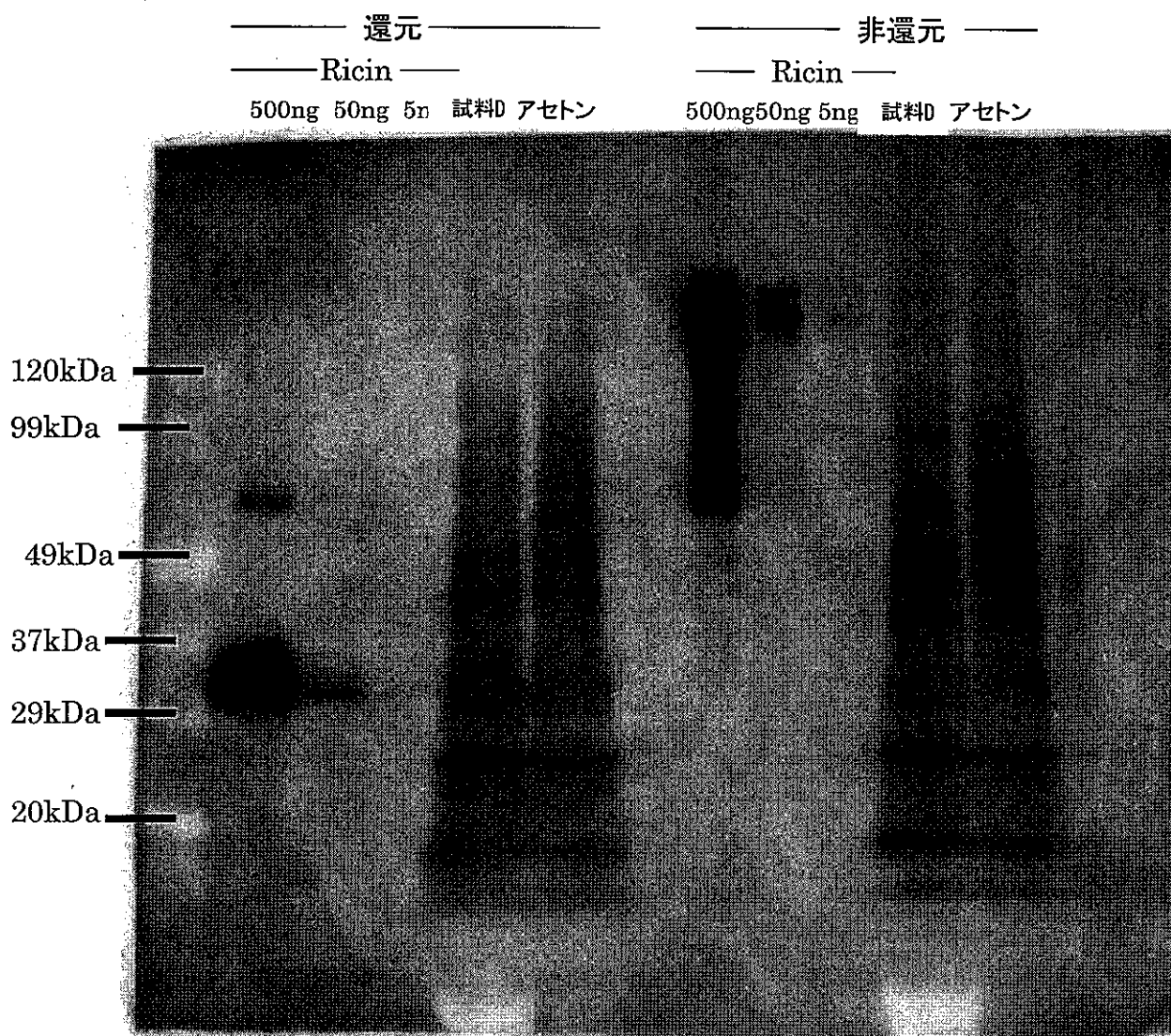


添付資料 19 粉末試料のウェスタンブロッティング



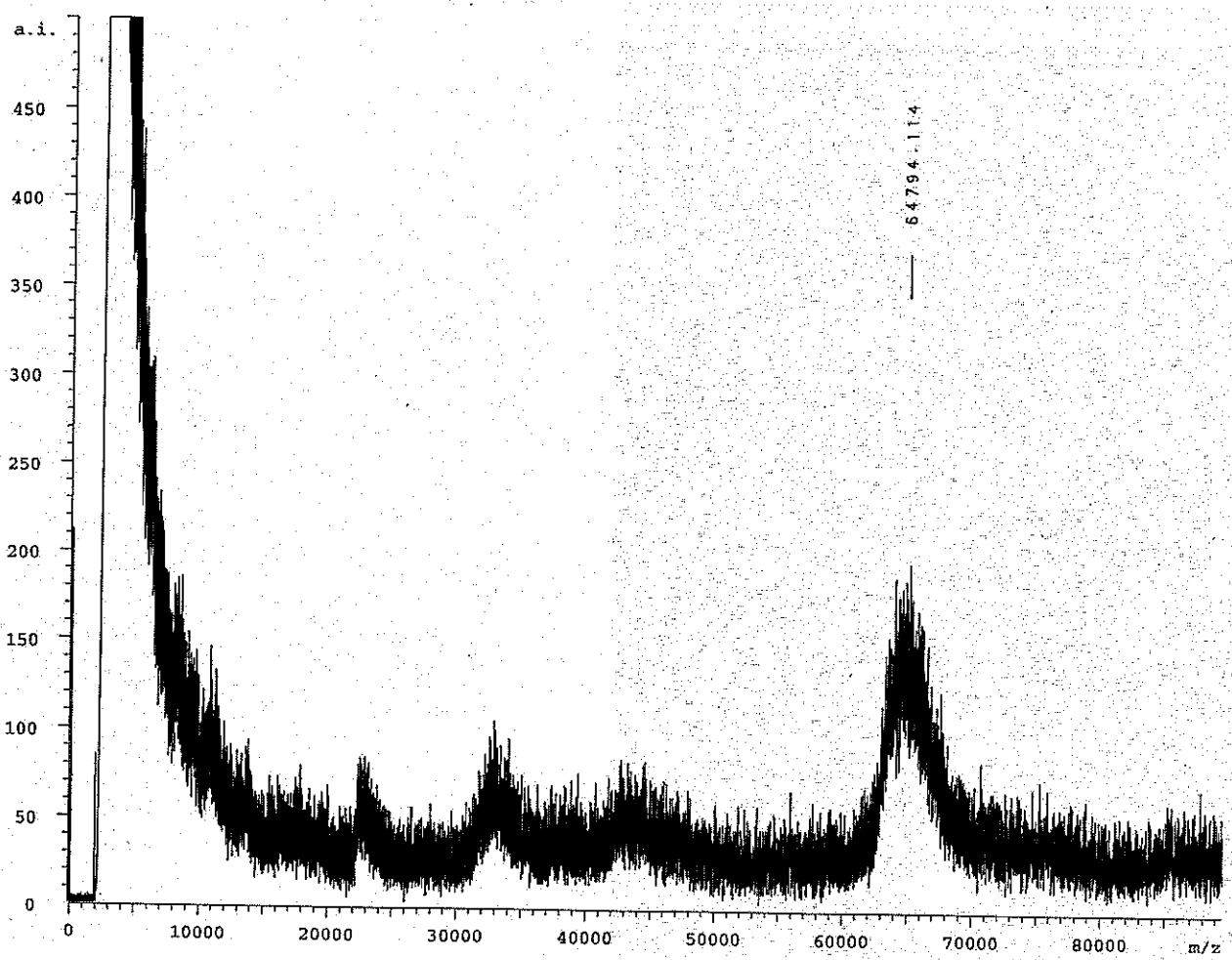
添付資料 20 試料DのSDS-PAGE泳動像

アセトン:抽出液をアセトン沈殿したもの

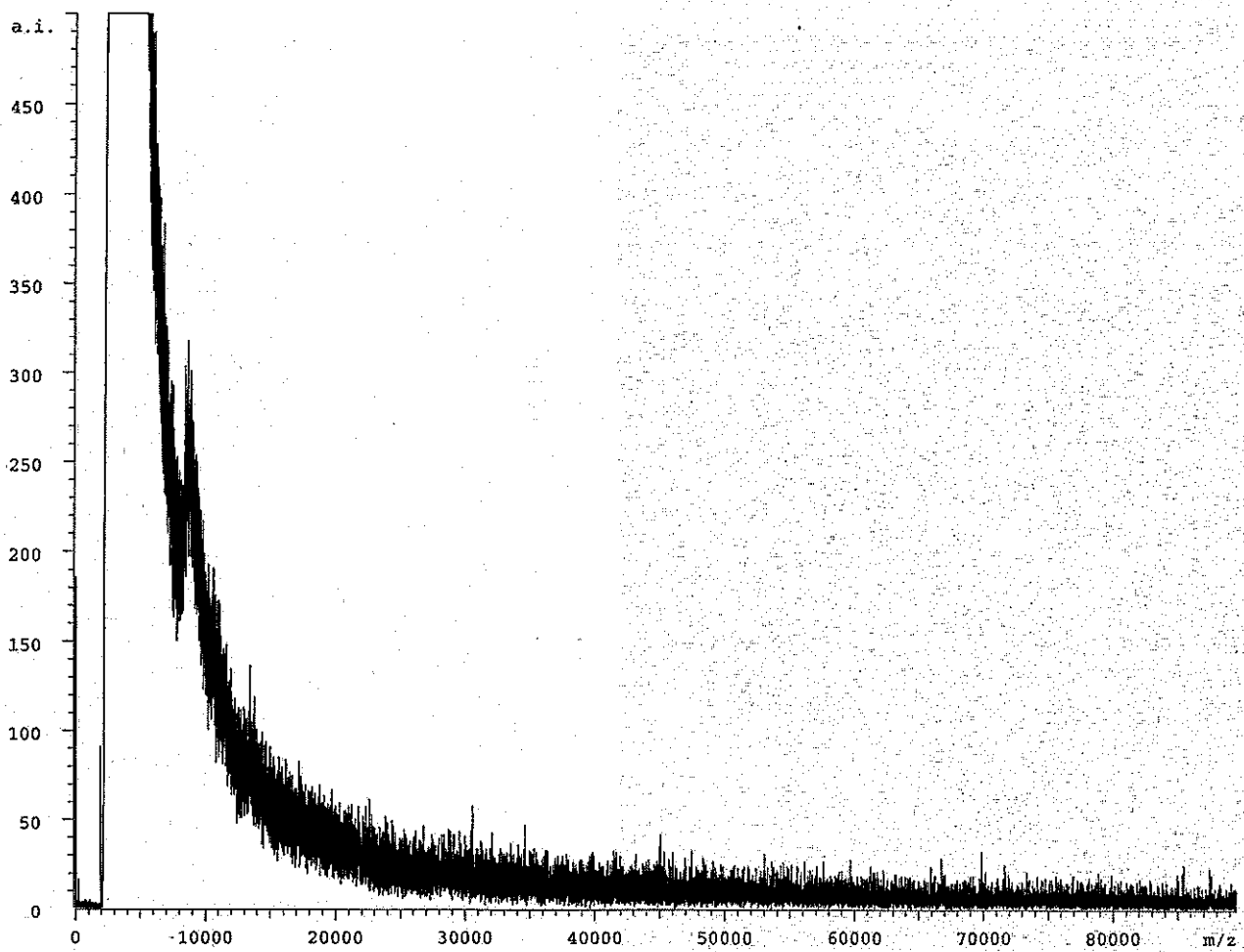


添付資料 21 試料Dのウェスタンブロッティング

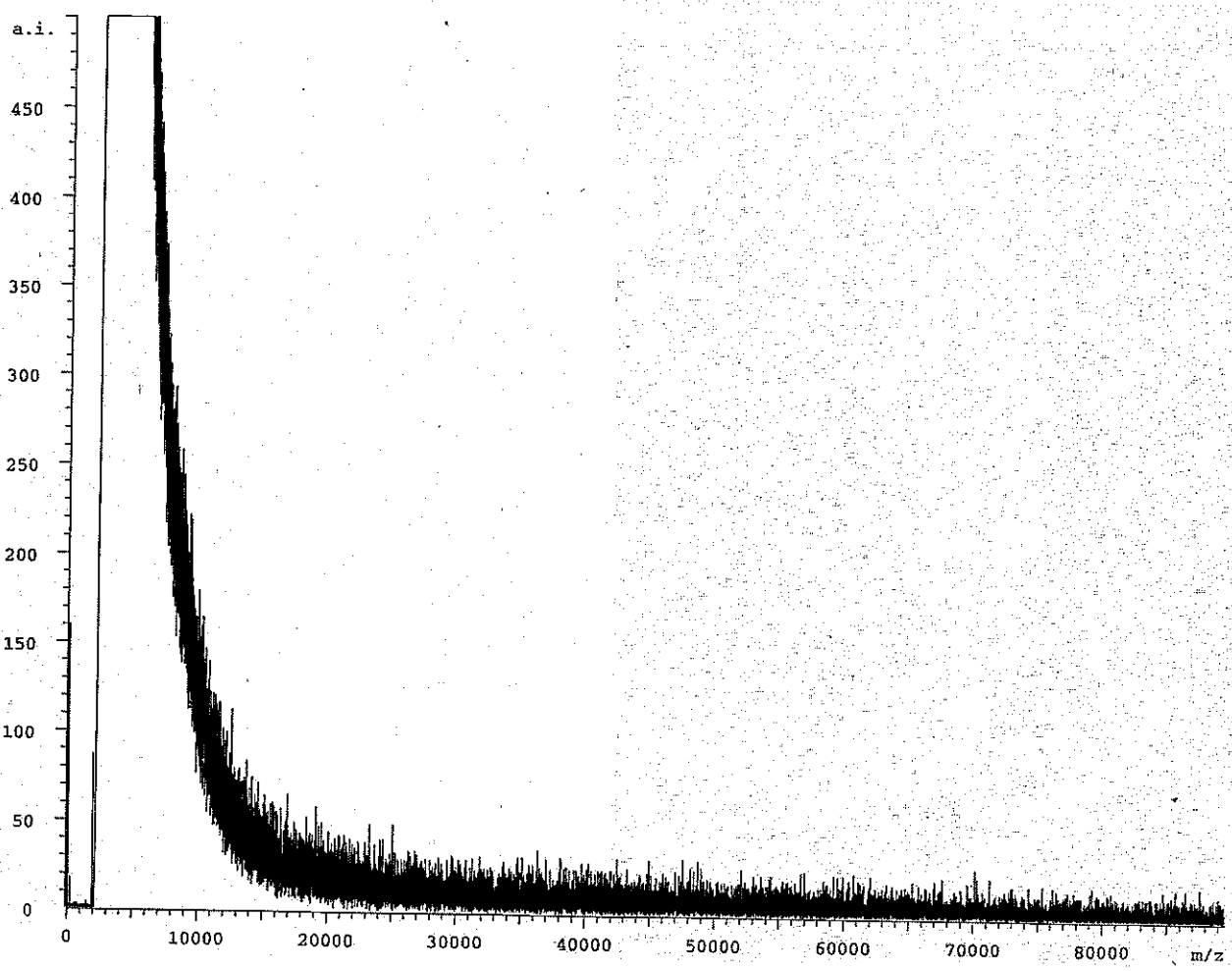
アセトン: 抽出液をアセトン沈殿したもの



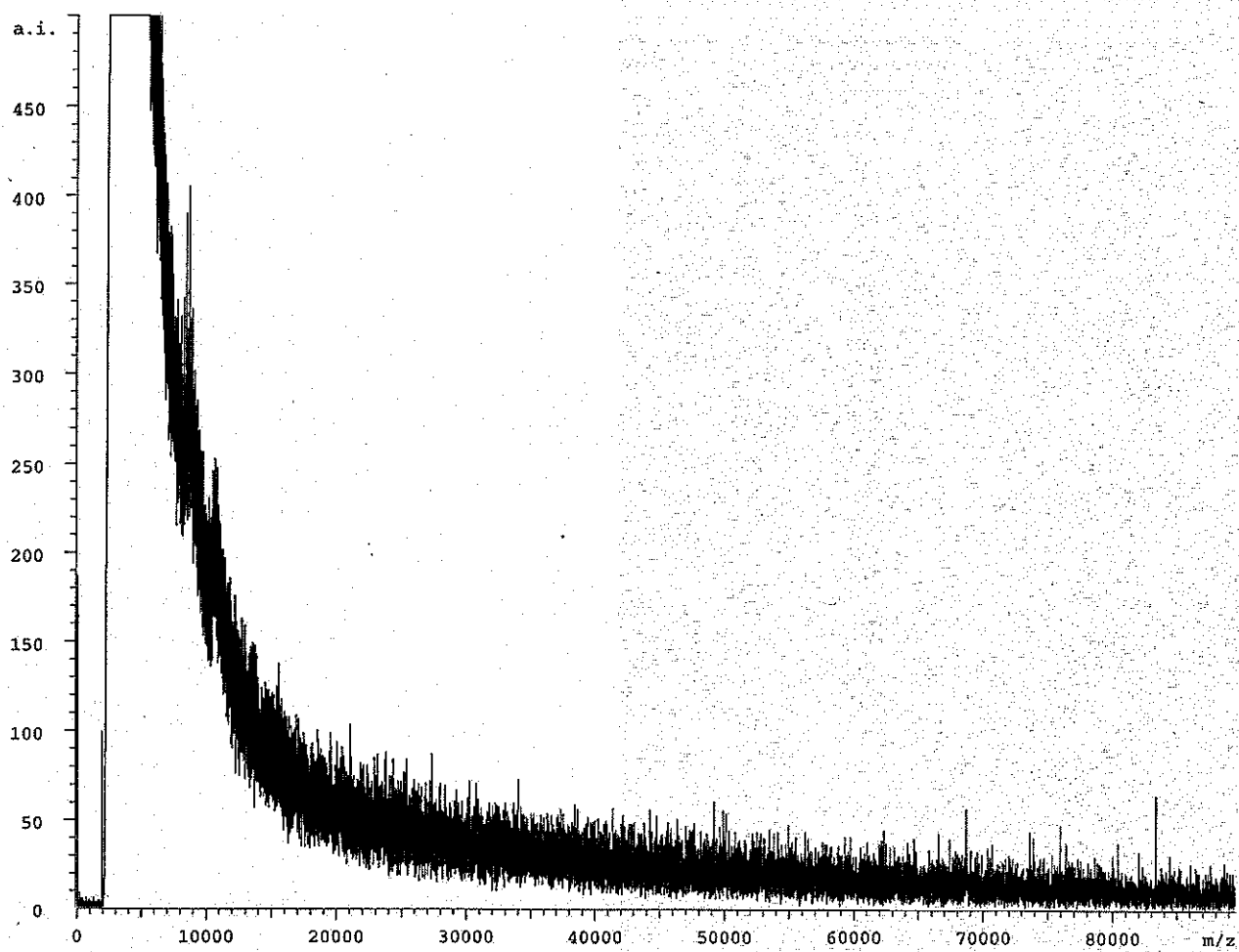
添付資料 22 リシン標準物質のマスペクトル



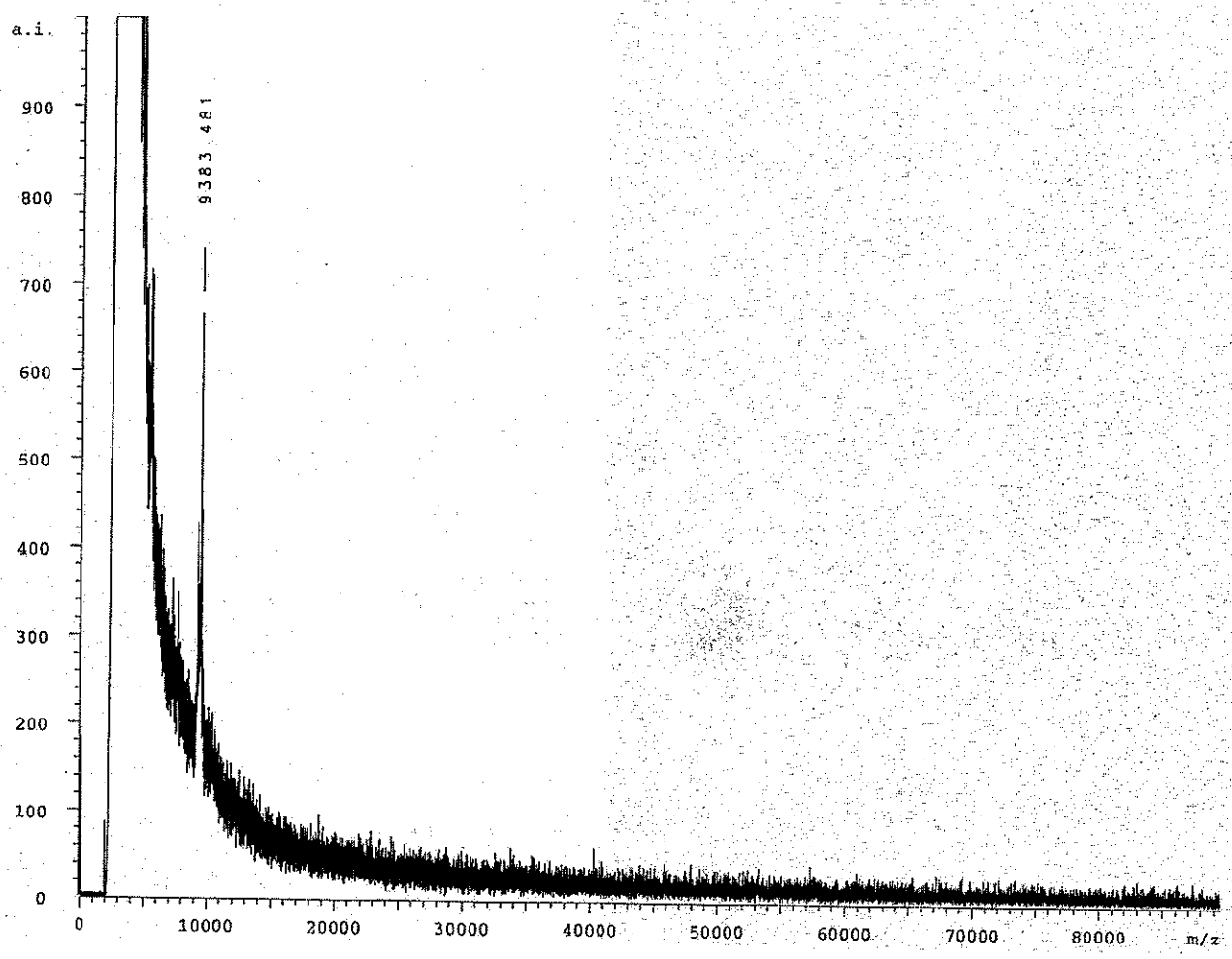
添付資料 23 試料Aのマスペクトル



添付資料 24 試料Bのマスペクトル



添付資料 25 試料Cのマスペクトル



添付資料 26 試料Dのマスペクトル