

資料

LC/MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討

Determination of Rapid Simultaneous Method for Plant Toxins by LC/MS/MS

茶 屋 真 弓 原 田 卓 也 吉 田 純 一

1 はじめに

自然界に生息している動植物には有毒成分を持つものがあり、この自然毒を含む食品を誤食することで食中毒を引き起こす。自然毒食中毒は動物性（フグ毒、貝毒等）と植物性（キノコ、高等植物）に分類され、その中でも高等植物による食中毒は近年増加している¹⁾。植物性自然毒食中毒は、山菜採りで誤って有毒植物を採取したことや家庭菜園の近くに有毒な観賞用植物を栽培していたことなどが原因で起こることが多い。

植物性自然毒食中毒は、平成元年以降当県で17件発生しており、今後も様々な種類の植物性自然毒食中毒の発生が予想される。当センターとしては、このような緊急時に対応できる検査体制の整備が必要であると考え、多数の自然毒を一度に分析可能な迅速一斉分析法を検討した。また、入手可能であった有毒植物の自然毒含有量を調査するとともに、食中毒事件発生時に原因食品が入手できない場合を想定し、尿を用いた分析も検討した。さらに、健康危機管理における検査体制の整備等を目的に実施される地方衛生研究所全国協議会九州ブロック模擬訓練事業（以下「地衛研模擬訓練」という。）において今回の検討化合物が対象となっており、当該分析法を用いて検査を実施したため、その結果も併せて報告する。

2 方法

2.1 試料

2.1.1 添加回収試験

- ・生の野菜（5種）
ゴボウ、水菜、ジャガイモ、ニラ、ヤマイモ
- ・調理加工品（3種）
水菜及びニラの油炒め（醤油味）、即席の味噌汁
- ・健常者の尿

2.1.2 有毒植物含有量調査

トリカブト（葉、根）、スイセン（葉、鱗茎）、ジャガイモ（緑化した芽、全体）、グロリオサ球根（花の色：赤、黄）

2.2 分析対象化合物及び標準品（全14物質）

- | | |
|------------------------|--|
| ①アコニチン（ACO） | } プシジェステル
アルカロイド混合標準物質
(和光純薬工業(株)) |
| ②ジェサコニチン（JSC） | |
| ③メサコニチン（MSC） | |
| ④ヒパコニチン（HPC） | |
| ⑤ベラトラミン（VTM） | ベラトラミン（PhytoLab） |
| ⑥プロトベラトラミン（PVTA） | プロトベラトラミン
（PhytoLab） |
| ⑦アトロピン（ATPN） | 硫酸アトロピン
（和光純薬工業(株)） |
| ⑧スコポラミン（SCP） | スコポラミン臭化水素
（Sigma-Aldrich） |
| ⑨リコリン（LYC） | リコリン塩酸塩（Sigma-Aldrich） |
| ⑩ガランタミン（GLM） | ガランタミン（ChromaDex） |
| ⑪ α -ソラニン（SLA） | α -ソラニン（ChromaDex） |
| ⑫ α -チャコニン（CHC） | α -チャコニン（Extrasynthese） |
| ⑬コルヒチン（CHN） | コルヒチン（Sigma-Aldrich） |
| ⑭デメコルシン（DCN） | デメコルシン
（和光純薬工業(株)） |

2.3 標準原液及び標準液の調製

2.2の①～④は混合標準品0.35mgをメタノール2.5mLで溶解し、①、②は20 μ g/mL、③は40 μ g/mL、④は60 μ g/mLとなるように標準混合原液を調製した。①～④以外は、標準品をメタノールに溶解し標準原液として2000 μ g/mLを調製した。①～④の混合標準原液は、他の化合物と濃度が統一できなかったため、以下の試験で用いる検量線用標準溶液は、①～④以外の混合標準液に対し、濃度が

それぞれ①, ②は1/5, ③は2/5, ④は3/5となるよう調製した。以下は①~④以外の標準濃度を代表で記載する。

2. 4 試薬

抽出に使用したメタノールはHPLC用, LC移動相に使用したメタノールはLC/MS用, ギ酸アンモニウムはHPLC用(全て関東化学(株)製)を用いた。

メンブランフィルターは(株)島津ジーエルシー製TORAST Disc(親水性PTFE, 13mm, 0.45 μ m)を用いた。

2. 5 装置

高速液体クロマトグラフはProminenceシリーズ(島津製作所社製)を使用し, 送液ポンプはLC-20AD, オートサンプラーはSIL-20ACHT, カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

質量分析装置は4000QTRAP(ABSciex社製)を使用し, イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

2. 6 試験溶液の調製

笠原らの報告²⁾を参考に図1に示す方法で実施した。

試料1.0gをはかり採り, メタノール20mLを加えてホモジナイズし, 遠心分離(3000rpm, 1分間)後の上清1mLを分取してメタノールで50mLに定容し, 0.45 μ mメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2. 7 LC/MS/MS測定条件

測定条件は, 表1のとおり。また, 化合物ごとのプリ

カーサーイオン(Q1), プロダクトイオン(Q3), MRMにおけるDP(Declustering Potential), CE(Collision Energy)及び保持時間(RT: Retention Time)は表2に示す。

表1 LC/MS/MSの測定条件

LC条件(株)島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	: Imtakt社製 Scherzo SM-C18 (内径2.0mm, 長さ150mm, 粒径3 μ m)
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 5 μ L
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
移動相	: A: 10mMギ酸アンモニウム水溶液 : B: メタノール
グラジエント条件	: 1% (0min) \rightarrow 1% (2min) \rightarrow 99% (8min) (B%) \rightarrow 99% (20min) \rightarrow 1% (25min) \rightarrow 1% (30min)
MS/MS条件 AB sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化 (ESI・positive)
イオンスプレー電圧	: 5.5kV
イオンソース温度	: 400 $^{\circ}$ C
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

2. 8 添加回収試験

2.1.1に示した食品試料1.0gに対して, 混合標準液を表3に示すとおり添加した。添加後は, 30分放置した後に図1の試験フローに従い抽出操作を行った。

ヤマイモ, 調理加工食品はn=3, ニラはn=4, その他はn=5で併行試験を実施し, 選択性, 定量限界, 回収率と相対標準偏差(RSD)を評価した。評価目標値は, 回収率70~120%, 相対標準偏差10%未満とした。

表2 分析対象化合物とMS/MSパラメータ及び保持時間, 含有植物

化合物名(略称)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	RT (min)	含有植物及び誤食事例
1 アコニチン(ACO)	646.3	105.1	121	93	11.4	
2 ジェサコニチン(JSC)	676.3	616.3	131	49	11.5	【トリカブト】 葉をニンソウ, モミジガサと誤認
3 メサコニチン(MSC)	632.3	105.1	126	91	11.3	
4 ヒバコニチン(HPC)	616.3	556.3	111	45	11.5	
5 ベラトラミン(VTM)	410.3	295.2	121	39	11.9	【バイケイソウ】 葉をオオギボウシと誤認
6 プロトベラトラミン(PVTA)	794.4	776.5	141	57	11.5	
7 アトロピン(ATPN)	290.2	124.1	91	35	10.9	【チョウセンアサガオ】根をゴボウ, つぼみをオクラ, 種子をゴマ, 葉をモロヘイヤ, アシタバと誤認
8 スコポラミン(SCP)	304.1	138.2	51	23	10.2	【ハシリドコロ】芽生えをフキノトウと誤認
9 リコリン(LYC)	288.2	119.0	46	51	9.8	【スイセン】葉をニラと誤認
10 ガランタミン(GLM)	288.3	213.1	46	33	10.4	【キルタンサス】鱗茎をタマネギと誤認
11 α -ソラニン(SLA)	868.5	398.5	206	101	11.4	【ジャガイモ】 光の当たる場所での保管, 皮付きのまま喫食
12 α -チャコニン(CHC)	852.5	706.5	171	97	11.5	
13 コルヒチン(CHN)	400.1	358.2	91	37	10.2	【グロリオサ】球根を山芋と誤認
14 デメコルシン(DCN)	372.1	310.0	86	31	10.6	【イヌサフラン】球根をジャガイモ, ミョウガ, ニンニク, タマネギ, 葉をギョウジャニンニク, ギボウシと誤認

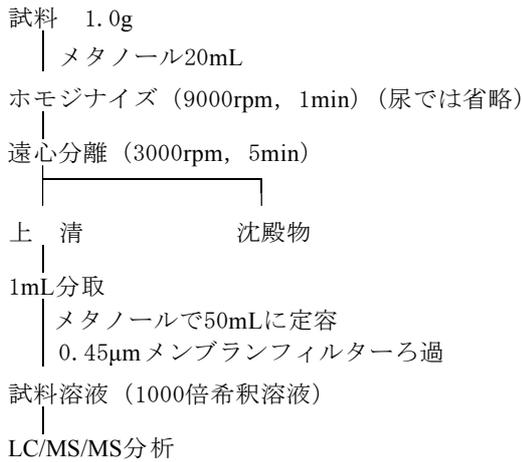


図1 試験フロー

2. 9 有毒植物中含有量調査

2.1.2に示した有毒植物1.0gについて、図1の試験フローに従い抽出操作を行った。検体数は、n=3とした。

2. 10 尿中添加回収試験

尿中の試験は、図1に示した方法を一部変更して、尿1.0mLに対し混合標準液を表5に示すとおり添加し、メタノールで20mLに定容後、ホモジナイズを省略し攪拌した。これを遠心分離した後の上清を1mL分取し、後は同様の操作を行った。ただし、尿中濃度0.1μg/mLの回収試験については、図1の操作では試験溶液中の濃度が定量下限値を下回ったため、メタノールでの定容を、50mLから5mLに変更し、フィルターろ過したものを試験溶液とした(100倍希釈溶液)。試験は、n=5で実施し、回収率と相対標準偏差を評価した。

2. 11 地衛研模擬訓練

健康危機管理における検査体制の整備等を目的としたもので、健康被害発生時のシナリオから健康被害原因物質を推定し、定性・定量分析を実施するという内容であった。シナリオから共通食がとろろ(ヤマモスリ下ろし)ご飯であり、発生状況からグロリオサの誤食によるCHNを原因物質とした食中毒と推定し、CHNの定量を実施した。

3 結果及び考察

3. 1 検量線の直線性

検量線は、混合標準液を2~200ng/mLの範囲(7点)でメタノール希釈し調製したところ、いずれも良好な直線性(相関係数0.99以上)が得られた。

3. 2 定量限界

定量限界は、試料中濃度2μg/gとし、2ng/mLの標準液のピークがS/N≥10であることを確認した。

3. 3 選択性

ブランク試料について定量を妨害するピークの有無を確認したところ、各ブランク試料からは妨害ピークは検出されなかった。

3. 4 食品試料(生、調理加工品)の添加回収試験結果

2.1.1の試料を用いて添加回収試験を行った結果を表3に示す。生の野菜5種では、概ね真度70~120%、変動係数10%未満を満たしていた。一方で、水菜、ニラそれぞれの油炒め(醤油味)、味噌汁については、ほとんどの化合物において真度が120%を超えており、醤油、塩分及び油等による正のマトリックス効果が影響したと推測される結果となった。特に、ATPNについては、真度が約200%となった。正確な定量値を求めるには精製方法やマトリックス検量線での定量などの再検討が必要である。

3. 5 有毒植物中含有量調査結果

2.1.2の植物を用いて含有量調査した結果(n=3)と他機関の報告値を表4に示す。トリカブトの含有量が極端に少ない結果となった要因については、今回の検体として約10cmの幼苗を用いたことや、アコニチン系アルカロイドの含有割合や総量について地域差があることが報告されており³⁾、個体差による影響が推測された。

3. 6 尿中添加回収試験

尿に高濃度及び低濃度の2濃度の混合標準液を添加し、図1の試験フローに従い試験を実施し回収率を求めた。ただし、低濃度では最終試験溶液が100倍希釈となるよう調製した。高濃度においてはATPN、SLAおよびCHCが真度120%を超過したが、概ね良好な結果となった。しかし、低濃度においては、複数の項目で真度が120%を超過する結果となり、正のマトリックス効果を受けていることが示唆された。そこで、尿のブランク試料を用いて各標準が低濃度で添加したものと同濃度となるようにマトリックス標準を調製し分析したところ、表5のとおり、添加回収結果と概ね同様の結果となるものと、10%以上低い値となったものがあった。このことから、マトリックスの影響のみでなく、前処理等の操作も要因であると推測された。現時点では、低濃度であることが影響

表3 食品試料の添加回収試験結果

化合物名	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	ゴボウ (n=5)		水菜 (n=5)		ジャガイモ (n=5)		ニラ (n=4)		ヤマイモ (n=3)	
		真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
1 ACO	3.0	95.2	2.7	92.9	7.5	-	-	-	-	-	-
2 JSC	3.0	96.2	2.9	91.6	7.7	-	-	-	-	-	-
3 MSC	6.0	96.3	4.3	90.6	7.4	-	-	-	-	-	-
4 HPC	9.0	94.8	3.7	86.7	9.0	-	-	-	-	-	-
5 VTM	10.0	101.3	2.5	104.0	3.3	102.4	1.3	107.8	2.1	94.8	1.6
6 PVTA	10.0	85.4	2.4	83.8	4.3	83.0	5.3	82.6	2.8	100.3	5.3
7 ATPN	10.0	119.0	2.2	19.8	1.6	118.4	0.8	119.5	1.1	<u>123.5</u>	6.0
8 SCP	10.0	88.0	5.4	87.1	4.8	85.7	6.7	84.2	6.5	101.5	4.0
9 LYC	10.0	74.0	3.4	100.0	5.8	94.5	2.9	97.5	4.2	96.3	2.7
10 GLM	10.0	86.2	7.2	92.8	3.1	89.5	3.5	94.1	6.4	98.3	5.3
11 SLA	10.0	90.7	<u>12.0</u>	97.9	<u>12.7</u>	100.7	6.9	90.1	8.5	97.7	9.3
12 CHC	10.0	77.3	2.0	81.8	3.2	86.7	9.1	78.9	9.0	75.0	2.4
13 CHN	10.0	88.5	8.2	89.2	3.8	88.8	2.8	89.7	9.6	94.5	5.4
14 DCN	10.0	88.2	3.8	91.6	1.5	90.8	3.1	94.1	3.3	97.3	5.1

化合物名	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	水菜油炒め (n=3)		ニラ油炒め (n=3)		味噌汁 (n=3)	
		真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
1 ACO	3.0	<u>131.1</u>	2.0	<u>129.8</u>	3.7	<u>131.9</u>	6.5
2 JSC	3.0	<u>127.6</u>	3.7	<u>131.8</u>	1.2	<u>128.5</u>	5.5
3 MSC	6.0	<u>125.7</u>	5.4	<u>130.3</u>	2.8	<u>130.2</u>	6.8
4 HPC	9.0	<u>135.6</u>	3.3	<u>140.4</u>	3.7	<u>136.2</u>	5.2
5 VTM	10.0	<u>133.0</u>	6.2	<u>141.0</u>	3.8	<u>140.8</u>	4.5
6 PVTA	10.0	114.0	0.9	111.3	2.1	119.8	4.5
7 ATPN	10.0	<u>205.7</u>	6.8	<u>207.0</u>	1.7	<u>208.2</u>	4.0
8 SCP	10.0	120.0	8.8	<u>123.0</u>	6.1	<u>125.4</u>	4.4
9 LYC	10.0	113.7	7.5	120.0	2.2	<u>120.4</u>	2.4
10 GLM	10.0	<u>135.3</u>	7.3	<u>136.0</u>	1.3	<u>141.8</u>	3.4
11 SLA	10.0	-	-	-	-	-	-
12 CHC	10.0	-	-	-	-	-	-
13 CHN	10.0	96.5	9.1	112.0	2.4	114.4	5.8
14 DCN	10.0	99.8	<u>11.5</u>	105.3	1.5	110.2	2.4

※ ヤマイモの添加濃度は20.0 $\mu\text{g/g}$

※ - : 検査未実施

※ 下線は回収率70~120%, 変動係数10%未満を満たさないもの

しているのか、試料溶液の希釈不足（尿の低濃度添加回収試験では、試験溶液の希釈を100倍としたため）が影響しているのかは不明であるが、今回の分析方法で対象化合物が低濃度（0.1 $\mu\text{g/mL}$ 程度）である場合に尿中濃度を分析する際は、マトリックスの影響を受けたものもあるため、マトリックス検量線を用いることで回収率改善の可能性があることが示唆された。

これまで患者尿中から植物性自然毒を検出した事例が複数^{7),8)}あるが、今回実施した低濃度の添加濃度はこれらの検出値より低い濃度で検出されており、食中毒事件の際に当該分析法により原因物質の検出が可能であると考えられた。

表4 有毒植物中含有量調査結果 ($\mu\text{g/g}$)

植物名	化合物名	当センター		他機関				
		真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)			
トリカブト	葉	ACO	ND	-	1.2	ND	-	56.6 ³⁾
		JSC		ND		ND	-	371.6
		MSC	9.3	-	16.5	ND	-	163.8
		HPC	ND	-	3.5	ND	-	66.9
スイセン	根	ACO	17.4	-	42.1	ND	-	700.3 ³⁾
		JSC		ND		ND	-	2346.0
		MSC	100.2	-	179.0	ND	-	1199.9
		HPC	18.5	-	33.9	ND	-	114.4
グロリオサ球根	赤黄	LYC	51.8	-	116.6	3.1	-	41 ⁴⁾
		GLM	6.2	-	8.6	ND	-	14
緑化パレイシヨ	全体	LYC	159.7	-	188.6	79	-	160 ⁴⁾
		GLM	3.7	-	3.9	ND	-	130
緑化パレイシヨ	芽	CHN	308.0	-	461.4			590 ⁵⁾
			240.1	-	290.5			
緑化パレイシヨ	全体	SLA	58.8	-	134.1			33.6 ⁶⁾
		CHC	82.4	-	160.3			40.1
緑化パレイシヨ	芽	SLA	151.2	-	196.7	22.9	-	50.2 ⁶⁾
		CHC	144.0	-	211.0	37.5	-	59.5

※ ND : 定量下限値未満

3. 7 地衛研模擬訓練

図1の試験フローに従い試験を実施した。試料中からは平均50.4 $\mu\text{g/g}$ (n=3) のCHNが検出された。この場合、とろろを100mL (約95g) 喫食したと仮定したとき、CHNの摂取量は4.8mgとなるため、体重50kgのヒトにおけるCHNの最小致死量とされる4.3mg⁹⁾を超過する結果となった。模擬訓練のシナリオにおいて、患者のうち1人は死亡、という内容であり、検査結果と合致した。後に、試料はCHNを濃度50 $\mu\text{g/g}$ となるよう調製したことが報告され、真度100.8%の良好な結果であったことが判明し、当該分析法の有効性が実証できた。

4 まとめ

1) 当該分析法の前処理に要する時間は1時間程度であ

り、精度も良好であることから、健康危機発生時における迅速な対応が可能となった。ただし、ATPNについては真度が120~200%となったことから、当該分析法でATPNを測定する際は、スクリーニング的な位置づけとして行うべきである。

2) 食中毒事件発生時に食品残品の入手が困難な場合においては、患者の尿を分析することで原因物質推定の可能性があることが示唆された。

3) 今回は溶媒標準による定量を行ったが、加工された食品では調味料や油等の影響を受けることが示唆されたため、より精度の高い定量結果を得るためには、精製方法の再検討やマトリックス検量線での定量などについて検討が必要である。

表5 尿中添加回収試験結果及びマトリックス効果結果

化合物名	高濃度 (n=5)			低濃度 (n=5)			マトリックス標準液	溶媒標準での
	添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	真度 (%)	RSD (%)	添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	真度 (%)	RSD (%)	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	定量値の真度 (n=1) (%)
1 ACO	3.0	98.7	4.7	0.1	116.6	11.4	0.1	93.9
2 JSC	3.0	101.9	4.8	0.1	127.8	4.3	0.1	107.0
3 MSC	6.0	106.0	4.4	0.2	126.0	6.0	0.2	112.0
4 HPC	9.0	100.1	4.7	0.3	137.5	5.3	0.3	121.3
5 VTM	10.0	109.2	1.5	0.1	124.6	4.4	0.1	113.0
6 PVT	10.0	99.0	3.8	0.1	80.8	5.5	0.1	77.9
7 ATPN	10.0	134.2	4.5	0.1	219.0	5.1	0.1	180.0
8 SCP	10.0	115.6	4.4	0.1	110.7	8.4	0.1	101.0
9 LYC	10.0	112.8	4.1	0.1	115.0	6.8	0.1	111.0
10 GLM	10.0	119.8	3.2	0.1	137.6	4.5	0.1	121.0
11 SLA	10.0	126.6	6.1	-	-	-	-	-
12 CHC	10.0	122.5	4.2	-	-	-	-	-
13 CHN	10.0	100.0	4.1	0.1	85.8	10.8	0.1	80.4
14 DCN	10.0	113.2	2.4	0.1	91.4	8.2	0.1	85.3

※ - : 検査未実施

※ マトリックス標準液は、100倍希釈した尿ブランク試料溶液で調製した

参考文献

- 厚生労働省全国食中毒事件録, 昭和36年~平成22年
- 笠原翔悟, 笠原義正; 中毒原因となる有毒植物の多成分一斉分析法の開発, 山形県衛生研究所報, **48**, 1~4(2015)
- 笠原義正, 伊藤健; LC/MS/MSによるトリカブトおよび食中毒原因食品中のアコニチン系アルカロイドの一斉分析, 食品衛生学雑誌, **49** (2), 76~81 (2008)
- 坂本智徳, 赤城広一; HILIC-MS/MSによるヒガンバナ科植物中のリコリンおよびガラントミンの分析, 福岡市保健環境研究所報, **35**, 89~92(2009)
- 国立保健医療科学院H-CRISISデータベース; No. 1423, グロリオサによる食中毒, 静岡県環境衛生科学研究所

- 藤原美智子, 立野幸治; LC/MS/MSによる α -ソラニン及び α -チャコニンの分析法の検討, 山口県環境保健センター所報, **51**, 58~61(2008)
- 宅間範雄, 荒尾真砂, 他; グロリオサによる食中毒事例-LC/MS/MSによるコルヒチンの分析-, 高知県衛生研究所報告, **54**, 41~45(2008)
- 小西友彦, 赤木浩一, 畑野和広; LC/MS/MSによるヒト血清・尿中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンの分析, 食品衛生学雑誌, **49** (4), 266~271 (2008)
- 厚生労働省; 自然毒のリスクプロファイル (高等植物, イヌサフラン), <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html>

※上記アドレスについては、原稿作成時のものであり、変更される場合があります。