

# 植物性自然毒の一斉分析法の検討

竹原瑛梨奈<sup>1)</sup>, 高山清子, 松川浩子, 黒木俊幸<sup>2)</sup>

## Study of Simultaneous Analysis of Phytotoxins

Takehara Erina, Takayama Kiyoko, Matsukawa Hiroko, Kuroki Toshiyuki

### 要旨

植物性自然毒による食中毒が発生した際に原因究明を迅速に実施することを目的に、高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いて複数の有毒成分を同時にスクリーニングできる多成分一斉分析法を検討した。植物性自然毒 14 種類について、試料からの抽出や精製などの前処理方法及び高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の測定条件について検討を行い、短時間で結果判定が可能な一斉分析法を構築した。

キーワード：植物性自然毒，一斉分析，食中毒，LC/MS/MS

### はじめに

高等植物に由来する自然毒（以下「植物性自然毒」という。）による食中毒は、2010 年から 2019 年の 10 年間に全国で 578 件発生している。食中毒総件数の約 5% であるが、患者数は 1,855 名、死亡者は 16 名であり、死者数は全体の 29%<sup>1)</sup> を占め、近年増加傾向にある。植物性自然毒による食中毒は、摂取状況によっては重篤な症状を引き起こす場合があるため、発生した場合には原因物質特定に対して早急な対応が必要となる。

鹿児島県では 2020 年に 10 年ぶりに植物性自然毒が原因の食中毒が発生している。本県では 2010 年から 2019 年までの 10 年間でクワズイモを除いた植物性自然毒を原因とする食中毒は発生していないが、2017 年度及び 2018 年度で一部の植物性自然毒について検査体制を構築してきた。しかしこれらは 1 種類及び 3 種類の植物性自然毒に特化した分析法であり、多成分一斉分析法は確立されていなかった。今回植物性自然毒 14 種類について一斉分析法の検討を行ったので報告する。

### 対象と方法

衛生化学部 <sup>1)</sup>現環境管理課 <sup>2)</sup>現環境科学部

#### 1 分析対象成分

本県において、食中毒の原因となる可能性のある植物に含有されている成分（計 14 成分、表 1 参照）を分析対象とした。

表 1 分析対象成分と有毒植物

成分名	有毒植物
Aconitine	
Hypaconitine	トリカブト
Jesaconitine	
Mesaconitine	
Amygdaline	アンズ、ウメ、モモ
Atropine	チョウセンアサガオ
Scopolamine	
α-Chaconine	ジャガイモ
α-Solanine	
Colchicine	イヌサフラン、グロリオサ
Demecolcine	
Galantamine	スイセン、ヒガンバナ
Lycorine	
Veratramine	バイケイソウ、コバイケイソウ

#### 2 試薬等

##### 1) 標準品

Scopolamine hydrobromide : TOCRIS  
bioscience 製

Demecolcine, Amygdaline, Aconitine : 富士フィルム和光純薬製

Lycorine hydrochloride,  $\alpha$ -Chaconine : シグマアルドリッチ (現メルク) 製

Colchicine : 東京化成製

Hypaconitine, Jesaconitine : 三和生薬製

Atropine : ナカライテスク製

Veratramine : Toronto Research Chemicals 製

Galantamine,  $\alpha$ -Solanine : ICN Biomedicals 製

メサコニチンメタノール標準溶液 (500  $\mu$ g/L) : 林純薬製

## 2) 混合標準溶液

各標準品を秤量後, メタノールやアセトニトリルに溶解し, 0.1  $\mu$ g/L の混合標準溶液を作成した.

## 3) その他の試薬等

メタノール (LC/MS 用) : 関東化学製

アセトニトリル (LC 用) : メルク製

硫酸マグネシウム (無水) : 富士フィルム和光純薬製

Bondsil-PSA (40  $\mu$ m, 100 g) : Agilent Technologies

## 4) 装置

振とう器: EYELA CUTE MIXER CM-1000 (東京理化学器械)

遠心分離機: ユニバーサル冷却遠心分離機 5922 (久保田商事)

## 3 一斉分析法の検討

高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

表 2 LC/MS/MS 装置及び測定条件

装置	LC : Agilent1200Series MS/MS : G6460 (Agilent Technologies)
HPLC条件	
分析カラム	InertSustain AQ-C18 PEEK (2.1 $\times$ 150 mm, 3 $\mu$ m)
移動相A液	5 mMギ酸アンモニウム水溶液
移動相B液	アセトニトリル
グラジエント 条件 (B液)	5% (0 min) $\rightarrow$ 5% (1 min) $\rightarrow$ 70% (3 min) $\rightarrow$ 70% (9 min) $\rightarrow$ 5% (9.1 min) $\rightarrow$ 5%
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
注入量	3 $\mu$ L
MS/MS条件	
イオン化	ESI(+)
ガス温度	280 $^{\circ}$ C
ネブライザーガス	50 psi
シーブスガス温度	380 $^{\circ}$ C
MRM条件	表3

(以下「LC/MS/MS」という.) を使用して表 1 の分析対象成分での一斉分析法の検討を行った.

LC/MS/MS の測定条件を表 2 に示す.

前処理操作検討用試料として, 植物の根, 茎及び葉と誤食しやすいゴボウ及びニラ, またジャガイモと似た成分のサトイモを使用し, 混合標準溶液を添加した検体を前処理操作し, 添加回収試験 (n=3) を行った. 前処理操作の最適化は, 回収率, 作業時間, 操作の煩雑さ及びマトリックスの除去効果の 4 点で評価した. 総合評価の高い方法を元に, 抽出方法及び精製方法の検討を行った.

## 結果

### 1 LC/MS/MS の測定条件

上記 14 種の化合物に対して LC/MS/MS で測定条件の最適化を行った. その結果, ポジティブモードにおいて全成分のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンが各複数個検出された. このうち感度及び選択性が高いイオンの組み合わせを 2 つ選択し, 定量イオンと定性イオンとした. 各成分の MRM 条件を表 3 に示す. 定量下限値は S/N $\geq$ 10 かつ相関係数 r $\geq$ 0.99 となる最低濃度とし, 各成分の定量下限値は測定溶液中濃度で 0.05~5 ng/mL であった.

表 3 分析対象成分 MRM 条件

Name	Q1(m/z)	Q3(m/z)	Fragmentor voltage(V)	Colligion Energy(V)
Aconitine	646.3	105.1	220	65
	646.3	77.1	220	137
Amygdaline	475.2	163.0	110	9
	475.2	85.1	110	33
Atropine	290.2	124.1	140	21
	290.2	93.1	140	29
$\alpha$ -Chaconine	852.5	98.1	360	101
	852.5	56.1	360	145
Colchicine	400.2	358.1	140	17
	400.2	310.1	140	21
Demecolcine	372.2	310.1	130	17
	372.2	340.1	130	9
Galantamine	288.2	213.0	130	17
	288.2	198.0	130	29
Hypaconitine	616.3	556.3	200	29
	616.3	524.2	200	37
Jesaconitine	676.3	616.3	220	33
	676.3	135.0	220	41
Lycorine	288.1	147.1	130	25
	288.1	119.1	130	37
Mesaconitine	632.3	572.2	220	33
	632.3	105.0	220	41
Scopolamine	304.2	138.1	130	21
	304.2	156.1	130	9
$\alpha$ -Solanine	869.1	98.1	300	106
	869.1	399.3	300	82
Veratramine	410.3	295.2	170	25
	410.3	84.1	170	33

## 2 前処理方法の検討

続いて前処理方法の検討を行った。前処理方法は文献<sup>2)-5)</sup>を参考に6種に分類し、前処理操作検討用試料に標準溶液を添加して添加回収試験を行った。6種の前処理法から、総合評価の高い希釈法及びQuEChERS EN法(以下「QuEChERS法」という。)を選択し、抽出法及び精製法について詳細な検討を行った。

抽出方法については、抽出溶媒の選択、組成及び添加量並びに塩添加の要否について検討した。抽出溶媒はQuEChERS法で使用するアセトニトリル及び希釈法で使用するメタノールの2種があるが、対象成分の溶解性から抽出溶媒はメタノールとした。また、メタノールによる抽出とメタノールに塩を添加したQuEChERS法による抽出を検討し回収率を比較したところ、メタノールのみの抽出での回収率が良好であったため、これを採用した。組成及び添加量については対象成分の溶解性を考慮し、メタノールだけでなく水との混合溶液による抽出を検討した。その結果、1回目にメタノール、2回目に混合溶液を使用した2段階抽出を行うことで回収率が平均91.1%となった。

精製方法については、分散型固相法を行うことでマトリックスの除去及び回収率の向上がみられるか検討した。植物に含まれる色素や脂肪酸等の除去を目的とするため、試薬にはPSA(第1級・第2級アミン)、硫酸マグネシウム、GCB(グラファイトカーボンブラック)を使用し、その組み合わせや添加量を抽出液の希釈のみの検体の回収率と比較した。ゴボウを検体とした際の精製方法検討試験結果の一部を図1に示す。アトロピンとコルヒチンは3種とも同程度の回収率になったが、アコニチンとソラニンについてPSA、硫酸マ

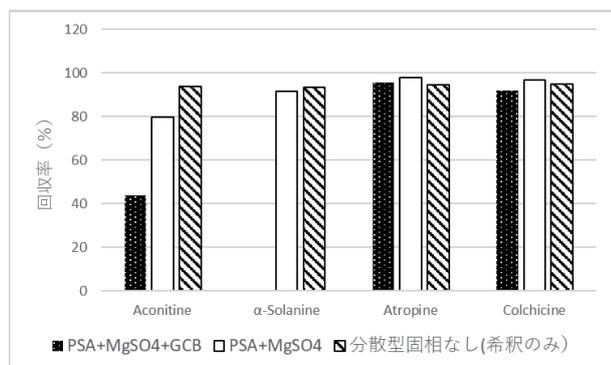


図1 分散型固相による精製効果

グネシウム及びGCBを添加した分散型固相で精製した場合には、回収率が大幅に低下した。PSA及び硫酸マグネシウムを添加した分散型固相法による精製が最適であったことから、これを採用した。

以上の前処理法の最適化を行い、試薬量等を検討して作成した植物性自然毒14種の一斉分析フローは図2のとおりとなり、最短で抽出から定性まで90分、定量まで150分で結果判定が可能となった。

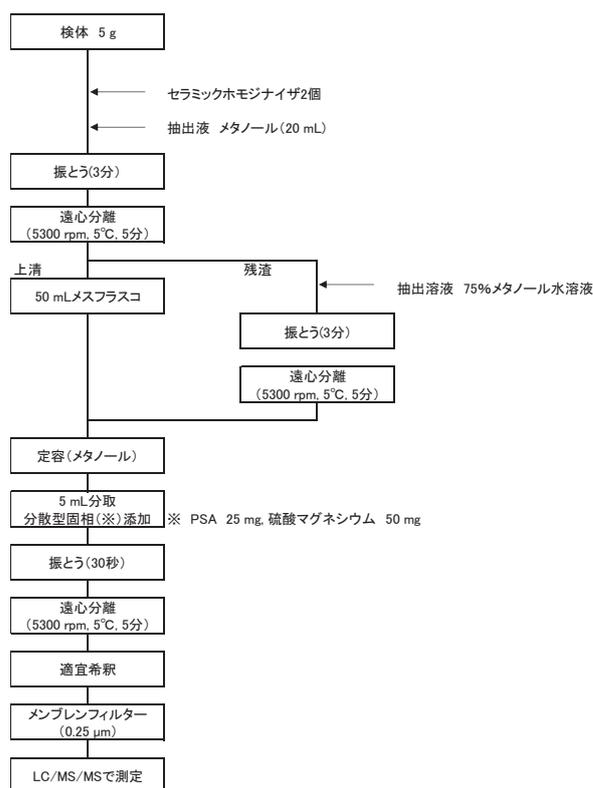


図2 一斉分析フロー

## 考察

今回対象成分の抽出液への溶解性の観点から、抽出液はメタノール系溶媒を選択した。本来、QuEChERS法では抽出液にアセトニトリルを使用しており、塩の添加はアセトニトリル中で抽出する際、塩析と脱水も同時に行うことにより夾雑物を沈殿させ、抽出を効果的にするためであった。QuEChERS法で期待された効果が発揮できなかった原因としては、今回の一斉分析では抽出液をメタノール系溶液としたことで期待された効果が発揮されず、十分な抽出及び塩析が行えな

かったためと考えられる。

精製方法の検討では、分散型固相法で用いる試薬や添加量及び振とう時間を検討した。色素除去に効果があることが知られている GCB を用いた場合には、試験溶液は無色に変化し、多くの測定成分で回収率に大きな変化がなかった。一方でアコニチンやソラニンといった特定成分の回収率が著しく低下した。これは GCB 自体が平面構造を持ち、似たような平面構造を持つ色素を吸着するのに対し、アコニチンやソラニンも平面にやや近い構造を持っていたため、GCB に吸着され回収率低下を招いたと考えられる。また、PSA についても有機酸等の除去に効果がある一方、分散型固相の振とう時間によっては一部の目的成分の回収率低下が確認された。しかし振とう時間の検討を行うことで、目的成分の十分な回収率を維持しながら試験溶液を精製することが可能であると確認できた。今後は、油脂や色素など夾雑物が多い調理品を検体とした場合に本試験法が適用可能か検討していきたい。

## 文献

- 1) 厚生労働省. 食中毒統計資料.  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html) (2021年8月5日アクセス可能) .
- 2) 山口奈穂, 富永純司, 松本理世 他.  
LC/MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の開発. 熊本県保健科学研究所報 2017 ; 47 : 48-55.
- 3) 設楽絃史, 永山矩美子, 山田恭平 . 機器分析による自然毒の試験法に関する研究. さいたま市健康科学研究センター一年報 2019 ; 13 : 114-117.
- 4) 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 2015 ; 48 : 1-4.
- 5) 永井雄太郎. QuEChERS を見直してみよう. 日本農薬学会誌 2012 ; 37(4) : 362-371, 51.