LC-MS/MS による植物性自然毒の多成分一斉分析法の検討

富山裕規[1)]　高山清子　木下和昭　松川浩子[2)]　黒木麻衣　落合克紀[3)]

Study of Simultaneous Analysis of Plant Toxins

Tomiyama Yuki, Takayama Kiyoko, Kishita Kazuaki,
Matsukawa Hiroko, Kurogi Mai, Ochiai Katsunori

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（以下「LC-MS/MS」という.）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 18 種類について，LC-MS/MS による分析条件の検討を行い，食品を用いた添加回収試験及び実際の有毒植物を用いた適用可能性確認試験を実施した．これにより，短時間で結果判定が可能な植物性自然毒の多成分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，添加回収試験，LC-MS/MS

はじめに

高等植物及びキノコに由来する自然毒（以下「植物性自然毒」という.）による食中毒は，2013 年から 2022 年の 10 年間に全国で 466 件発生している．食中毒総件数に占める割合は約５％とわずかであるものの，患者数は 1,501 名，死者数は 20 名となっており，死者数は全体の 47%[1)]と半数近くを占めている．また，本県では 2022 年４月にグロリオサの根を食べたとみられる延岡市の男性が食中毒で死亡したとの報告があり，植物性自然毒による食中毒事故の防止は、本県でも十分に注意及び啓発が必要であると同時に，迅速・的確な分析手法の確立が求められている.

当研究所では 2018 年から 2020 年にかけて植物性自然毒 14 種類について一斉分析を可能とする分析法を確立した[2)]．しかし,これらはリコリンやガランタミンなどの一部の自然毒には適用できないことや夾雑物の多い調理品に適用できるかどうかの検討がなされていないなどの課題があった．今回，リコリンやガランタミンを含めた植物性自然毒 18 種類について LC-MS/MS による分析条件の検討を行い，食品を用いた添加回収試験及び実際の有毒植物を用いた適用可能性確認試験を実施したので報告する.

対象と方法

１　分析対象成分

食中毒事故件数の多い有毒植物における有毒成分（計 18 成分，表１）を分析対象とした.

表１　有毒植物と分析対象成分

有毒植物	成分
トリカブト	アコニチン　ヒパコニチン ジェサコニチン　メサコニチン
アンズ、ウメ、モモ	アミグダリン
チョウセンアサガオ	アトロピン　スコポラミン
ジャガイモ	チャコニン　ソラニン
イヌサフラン、グロリオサ	コルヒチン　デメコルシン
バイケイソウ、コバイケイソウ	ベラトラミン　ジェルビン シクロパミン　プロトベラトリンA
スイセン、ヒガンバナ	リコリン　ガランタミン
ユウガオ、ヒョウタン	ククルビタシンE

衛生化学部　1)現食品開発センター　2)現都城食肉衛生検査所　3)現環境管理課

２　試薬等

１）標準品

アコニチン，アミグダリン，デメコルシン：富士フイルム和光純薬

ヒパコニチン，ジェサコニチン：三和生薬

メサコニチンメタノール標準溶液：林純薬

アトロピン：ナカライテスク

スコポラミン臭化水素酸塩：TOCRIS bioscience

α-チャコニン，リコリン塩酸塩：シグマアルドリッチ（現メルク）

α-ソラニン，ガランタミン：ICN Biomedicals

コルヒチン：東京化成

ベラトラミン，ジェルビン，シクロパミン：Toronto Research Chemicals

プロトベラトリン A：PhytoLab

ククルビタシン E：ChromaDex

２）混合標準溶液

各標準品を秤量後，メタノールに溶解し，1 mg/L の混合標準溶液を作製した.

３）その他の試薬等

メタノール（LC/MS 用），硫酸マグネシウム（無水）：富士フイルム和光純薬

アセトニトリル（HPLC 用）：ナカライテスク

Bondsil-PSA （40 μm， 100 g）：Agilent Technologies

GL クロマトディスク（0.2 μm，13P）：ジーエルサイエンス

４）装置

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

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　分析条件の検討

LC-MS/MS を使用して，表２の移動相の種類及び表３のグラジエント条件を組み合わせることで，各分析対象成分が良好に分析できる条件を検討した．なお，これ以外の分析条件については，当研究所で従来開発した条件[2)]を参考にした.

４　添加回収試験

ごぼう，焼きそば，餃子などの夾雑物を多く含む食品３検体に対し，各成分の混合標準液 1 ppm を 1 mL 添加し，図１に示すフローにより前処理し，添加回収試験（ｎ＝３）を行った．検量線は 0.2～20 ng/mL の範囲（５点）でメタノール希釈を行い，評価目標値は回収率 70～120%，検量線の相関係数 0.99 以上とした.

５　有毒植物への適用可能性確認試験

過去 10 年間の植物性自然毒における食中毒において，事件数が最も多いスイセンと死者数が最も多いイヌサフランを対象有毒植物として選定した．スイセンは葉，イヌサフランは球根を検体として抽出操作を行い，有毒植物に対して本法が適用可能かどうかの確認試験（ｎ＝１）を実施した.

結果

表２　移動相の種類

	A液	B液
従来の条件	5 mMギ酸アンモニウム水溶液	アセトニトリル
①	5 mMギ酸アンモニウム水溶液	メタノール
②	0.1%ギ酸含有5 mMギ酸アンモニウム水溶液	アセトニトリル
③	0.1%ギ酸含有5 mMギ酸アンモニウム水溶液	メタノール

表３　グラジエント条件

①従来の条件

時間（min）	0	1.0	3.0	9.0	9.1	20.0
A液（%）	95	95	30	30	95	95
B液（%）	5	5	70	70	5	5

②新たに検討した条件

時間（min）	0	11.0	12.0	12.1	20.0
A液（%）	98	10	10	98	98
B液（%）	2	90	90	2	2

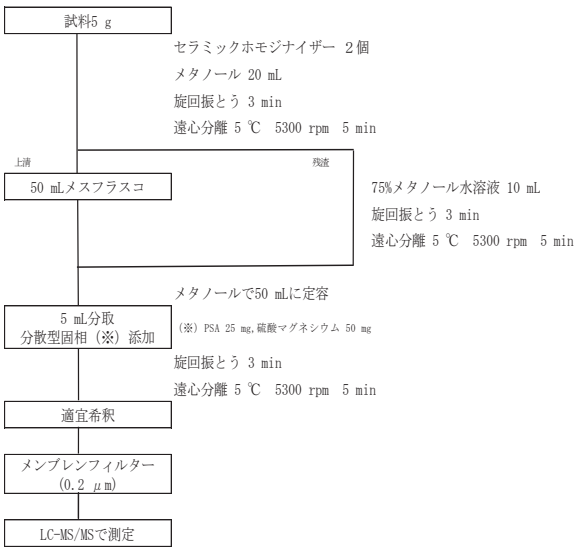

図１　従来の一斉分析フロー

１　分析条件の検討

移動相の種類及びグラジエント条件の組み合わせ計６パターンについて検討を行った結果，表２③及び表３②の組み合わせにより，従来では分離できなかったリコリン及びガランタミンのピークが分離され，全ての成分が一斉分析可能である MRM 条件が得られたため，これを一斉分析法の分析条件に採用した．なお，LC-MS/MS 装置及び測定条件，並びに分析対象成分の MRM 条件は表４，表５に示すとおりである．

２　添加回収試験

図１のフローにより一斉分析を実施したところ，多くの成分で回収率が 120%を超え，一部では 200%を超えるものも確認された．このことから，マトリックス効果を受けていることが示唆されたため，前処理方法において，山田らが報告しているフィルターを２つ連結させてろ過を行う DF 法[3)]（図２）を用いるとともに，マトリックス検量線により一斉分析を実施したところ，３検体における全ての分析対象成分において，評価基準（回収率：70～120%，検量線の相関係数：0.99 以上）を満たした（表６）．

３　有毒植物への適用可能性確認試験

確認試験を実施した結果を表７に示す．他自治体[4-7)]が報告している含有量と概ね同様の結果となった．

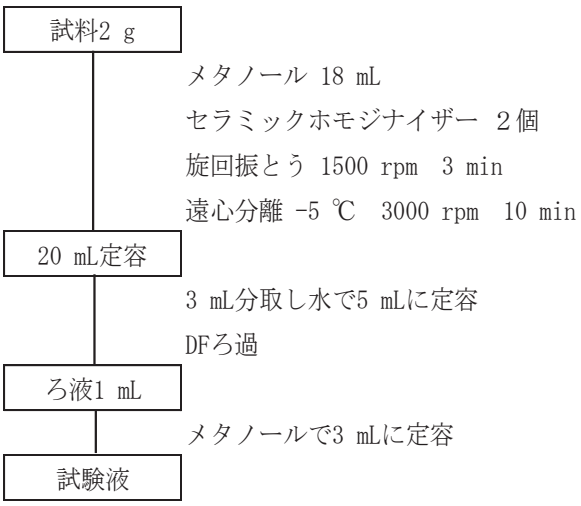

図２　DF 法フロー

表４　LC-MS/MS 装置及び測定条件

装置	LC：ACQUITY UPLC I-Class PLUS FTN
	MS/MS：Xevo TQ-XS
	(Waters)
LC条件	
分析カラム	InertSustain AQ－C18 PEEK
	(2.1×150 mm, 3 μm)
移動相A液	0.1%ギ酸含有5 mMギ酸アンモニウム水溶液
移動相B液	メタノール
グラジエント	2%(0 min)→90%(11 min)
条件(B液)	→90%(12 min)→2%(12.1 min)→2%(20 min)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40 ℃
注入量	5 μL
MS/MS条件	
イオン化	ESI(＋)
キャピラリー電圧	3.00 kV
脱溶媒温度	500 ℃
脱溶媒ガス流量	600 L/Hr
ソースガス温度	150 ℃

表５　分析対象成分 MRM 条件

有毒成分	Q1(m/z)	Q3(m/z)	コーン電圧(V)	CE(eV)	RT(min)
アコニチン	646.35	104.99	16	62	9.98
	646.35	586.34	16	34	9.98
アトロピン	290.26	93.03	74	28	7.04
	290.26	124.05	74	20	7.04
アミグダリン	475.19	84.95	6	24	6.81
	475.19	144.98	6	14	6.81
ガランタミン	288.18	197.99	18	32	5.07
	288.18	213.07	18	18	5.07
ククルビタシンE	574.34	111.03	4	34	12.10
	574.34	461.26	4	18	12.10
コルヒチン	400.14	310.09	2	24	10.02
	400.14	326.08	2	22	10.02
ジェサコニチン	676.29	76.89	34	80	10.14
	676.29	134.96	34	56	10.14
ジェルビン	426.32	109.02	92	30	9.89
	426.32	114.03	92	28	9.89
シクロパミン	412.35	109.02	90	28	10.57
	412.35	114.03	90	28	10.57
スコポラミン	304.18	138.03	52	22	6.18
	304.18	156.05	52	12	6.18
ソラニン	868.53	98.02	38	80	9.67
	868.53	398.34	38	70	9.67
チャコニン	852.66	97.96	100	80	9.66
	852.66	706.57	100	66	9.66
デメコルシン	372.27	310.11	66	20	8.11
	372.27	340.52	66	14	8.11
ヒパコニチン	616.34	104.98	84	58	9.93
	616.34	556.35	84	32	9.93
プロトベラトリンA	794.52	162.07	84	80	9.93
	794.52	658.38	84	52	9.93
ベラトラミン	410.33	83.98	86	28	10.27
	410.33	295.18	86	26	10.27
メサコニチン	632.33	104.98	58	56	9.74
	632.33	572.34	58	34	9.74
リコリン	288.15	118.97	30	34	4.69
	288.15	146.99	30	22	4.69

表 6　添加回収試験結果（ｎ＝３）

有毒成分	ゴボウ 平均回収率（%）	餃子 平均回収率（%）	焼きそば 平均回収率（%）
アコニチン	98.1	72.4	89.8
アトロピン	99.8	113.8	114.6
アミグダリン	85.4	89.0	87.2
ガランタミン	76.9	89.0	91.1
ククルビタシンE	93.7	82.8	94.2
コルヒチン	98.6	91.9	101.8
ジェサコニチン	98.7	77.6	89.9
ジェルビン	110.8	88.9	89.2
シクロパミン	113.7	86.6	84.5
スコポラミン	84.6	94.9	105.2
ソラニン	80.9	70.7	92.8
チャコニン	91.7	80.8	90.0
デメコルシン	76.6	93.9	85.1
ヒパコニチン	101.7	88.3	90.5
プロトベラトリンA	97.0	82.4	90.6
ベラトラミン	119.7	87.3	87.3
メサコニチン	95.2	87.6	91.2
リコリン	76.1	85.8	89.0

表 7　適用可能性確認試験結果（ｎ＝１）

植物名	有毒成分	当研究所 （μg/g）	他自治体 （μg/g）
スイセン	リコリン	109.0	51.8 ～ 116.6
	ガランタミン	11.7	ND ～ 14
イヌサフラン	コルヒチン	343.5	428.2
	デメコルシン	408.6	230 ～ 953.5

まとめ及び考察

今回，移動相の検討として，酸性度及び極性の観点から移動相へのギ酸の添加や，アセトニトリルからメタノールへの変更などを行った．移動相へのギ酸の添加は，リコリン及びガランタミンの酸性度がそれぞれ 13.55 及び 8.32 と異なるため，この違いを利用することでピークが分離できると考えたためである．これにより，それぞれの成分の保持挙動に違いが生まれ，従来ではできなかった一斉分析が可能になったものと考えられる．また，従来の条件から保持時間が変わったため，それぞれの検体でブランク試料を併せて測定することで選択性評価を行ったところ妨害ピークは見られなかった．

添加回収試験において，従来の前処理法を用いて回収率が 120%を超えたのは，油性成分を主とする夾雑物の影響によるものだと推測される．今回新たに採用した DF 法は，前処理の工程で水を添加することにより検体中の油が水中で分散するため，DF ろ過の際に夾雑物がフィルターにより取り除かれる [3]．また，これと併せてマトリックス検量線により測定を実施したこともあり，夾雑物によるマトリックス効果の影響がより軽減されたものだと考えられる．

有毒植物への適用可能性確認試験では他自治体と概ね同じ結果となり，本試験法が実際の有毒植物についても適用可能であることが確認できた．

今後は，加工食品のみならず吐瀉物や血液及び尿などといった生体試料においても本試験法が適用可能であるかどうか検討を進め，様々なケースの食中毒事故事例に対応できる技術基盤の構築を図っていく．

文献

1）厚生労働省．食中毒統計資料．https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-3（2024 年 8 月 16 日アクセス可能）．

2）竹原瑛梨奈，高山清子，松川浩子，他．植物性自然毒の一斉分析法の検討．宮崎県衛生環境研究年報 2020; 32: 57-60.

3）山田恭平，加藤永莉，竹中志保．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年報 2022; 16: 101-104.

4）藤井愛実，松渕亜希子，古井真理子，他．LC-MS/MS による有毒植物イヌサフラン調理品中に含まれるコルヒチン等の分析．秋田県健康環境センター年報 2021; 17: 51-52.

5）茂木修一，関慎太朗，坪井公志，他．【事例】イヌサフランによる食中毒事例について．群馬県食品安全検査センター業務報告 2020; 8: 41-45.

6）茶屋真弓，原田卓也，吉田純一．LC/MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討．鹿児島県環境保健センター所報 2018; 19: 67-71.

7）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タミンの分析．福岡市保険環境研究所報 2010; 35: 89-92.