

## 植物性自然毒一斉分析法の検討

高井靖智, 山本道方\*<sup>1</sup>, 河島眞由美\*<sup>2</sup>, 桑田真里, 新宅沙織, 樋下勝彦, 坂口勝規\*<sup>3</sup>

### Simultaneous Determination of phytotoxins

Takai Yasutomo, Yamamoto Masamichi\*<sup>1</sup>, Kawashima Mayumi\*<sup>2</sup>, Kuwata Mari, Shintaku Saori,  
Hinoshita Katsuhiko and Sakaguchi Katsunori\*<sup>3</sup>

キーワード: 植物性自然毒, 液体クロマトグラフタンデム質量分析装置, 液体クロマトグラフ 四重極  
飛行時間型質量分析装置

Key Word: phytotoxin, LC-MS/MS, LC-Q/TOF

### はじめに

自然毒による食中毒は, 食中毒全体の発生件数に占める割合は低い<sup>1)</sup>が, 症状が重篤化しやすいため, 食中毒が発生した場合, 有効な治療法の決定および被害拡散防止の観点から, 早急な原因物質の特定が必要となる。しかし, 自然毒は多岐にわたり, 形態観察による原因食品の同定が困難な事例も多いため, 事前にできる限り網羅的な測定を可能とする検査体制を整備しておくことが重要となる。

その中でも, キノコや高等植物 (植物性自然毒) による食中毒は, 死亡事例が毎年のように発生していることもあり<sup>1) -3)</sup>, 近年一斉分析法が数多く報告されている<sup>4) -8)</sup>。

そこで今回, 当センターでも植物性自然毒による食中毒に迅速に対応することを目的に, LC-MS/MSを使った23成分一斉試験法の検討を行った。また, 今回検討したLC-MS/MS法で対象とした23成分以外の自然毒で標準品等が確保出来ない場合を想定し, 高分解能を有するLC-Q/TOFを使って未知成分分析の可能性を検討したところ, 若干の知見が得られたのであわせて報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

市販のニラ, ゴボウ, シイタケ, ジャガイモ

#### 2. 試薬

##### 1) 標準品

##### (1) 標準品

$\alpha$ -アマニチン,  $\beta$ -アマニチン, ファロイジン, アトロピンおよびリコリンはシグマアルドリッチ製, イルジンSおよびスコポラミンは林純薬製, アコニチン, メサコニチン, ヒパコニチン, コルヒチン, デメコルシン, ガランタミン, ガランタミノン, ククルピタシンB,  $\alpha$ -ソラニン, ジオスシン, ジオスゲン, ジェルビン, ベラトラミンおよびシクロパミンは富士フィルム和光純薬製, ジェサコニチンは三和生薬製,  $\alpha$ -チャコニンはフナコシ製を使用した。

##### (2) 標準溶液

各標準品をメタノールで溶解・希釈後混合し, メタノールを加え500 ng/mLの23種混合標準溶液を調製した。混合標準溶液を適宜希釈し, 10~200 ng/mLの検量線用標準溶液を調製した。

なお, 添加回収試験用の混合標準液は (アマニトキシン類 ( $\alpha$ -アマニチン,  $\beta$ -アマニチン, ファロイジン) が他の標準品と比較し10倍量になるよう

衛生グループ \*1 水質グループ \*2 現県立こころの医療センター \*3 現県動物愛護センター

調製したものをを用いた。

## 2) 溶媒

メタノールは富士フィルム和光純薬製 LC/MS 用を使用した。

## 3) フィルター

Millipore 社製 Millex-LH(0.20 μm)を使用した。

## 3. 装置条件

### 1) LC-MS/MS 条件

LC-MS/MS 条件を表 1 に、MRM 条件を表 2 に示した。

表 1 LC-MS/MS 条件

LC	: Agilent 1200 シリーズ
MS/MS	: Agilent 6460 QQQ
分析カラム	: SUPELCO Ascentis Express C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)
カラム温度	: 40 °C
流速	: 0.25 mL/min
注入量	: 2 μL
移動相	: A液: 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B液: メタノール
グラジエント条件	: 5%(0 min)→70%(10 min)→100%(15-25 min) (B液) →5%(27-37min)
ドライガス温度	: 300 °C
ドライガス流量	: 10 L/min
シースガス温度	: 150 °C
シースガス流量	: 12 L/min
ネプライザ圧力	: 50 psi
キャピラリー電圧	: 3000 V

表 2. MRM 条件

成分名	含有植物例	MRM 条件		
		ESI	Q1	Q3 (定性)
α-アマニチン	ドクツルタケ タマゴテンクタケ	+	919.7	901.0
β-アマニチン		+	920.3	902.0
ファロイジン		-	787.3	743.3
イルジンS	ツキヨタケ	+	264.8	217.0
		+	241.7	201.0
アコニチン	トリカブト	+	646.2	586.0
メサコニチン		+	632.1	572.1
ヒバコニチン		+	616.2	338.1
ジェサコニチン		+	676.1	134.9
アトロピン		+	290.1	123.9
スコポラミン	ハシロドコロ	+	304.1	138.0
コルヒチン	イヌサフラン	+	400.0	358.1
デメルシン	グロリオサ	+	372.1	310.0
リコリン	スイセン	+	288.0	147.0
ガラタミン	タマダレ	+	288.1	213.0
ガラタミノン	ヒガンバナ	+	286.0	229.0
ククルピタンB	ヒヨウタン、ヘチマ	+	576.1	499.1
α-ソラニン	ジャガイモ	+	868.5	398.2
α-チャコニン		+	852.4	398.0
ジオスシン	カエデドコロ	+	869.5	253.1
ジオスゲン	ヒメドコロ	+	415.2	271.0
ジェルピン	バイケイソウ類	+	426.2	114.2
ペラトミン		+	410.2	295.2
シクロバミン		+	412.3	109.2

### 2) LC-Q/TOF 条件

LC-Q/TOF 条件を表 3 に示した。

表 3 LC-Q/TOF 条件

LC	: AB SCIEX Exion LC AC
MS/MS	: AB SCIEX X500R
分析カラム	: SUPELCO Ascentis Express C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm)
カラム温度	: 40 °C
流速	: 0.2 mL/min
注入量	: 2 μL
移動相	: A液: 0.05% 酢酸 B液: メタノール
グラジエント条件	: (B液) 5%(0 min)→95%(30-40 min)→5%(40.01-50 min)
スプレー電圧	: 5500 V
イオン化法	: ESI(+)
測定モード	: SWATH® Acquisition

## 4. 試験溶液の調製

試料 1 g にメタノール 30 mL を加えホモジナイズした後、15 分間超音波抽出した。続いて、遠心分離 (4000 rpm, 5 min) 後、5 Aろ紙でろ過し、メタノールで 100 mL に定容したもの (希釈倍率 100 倍) を試験溶液とした。

## 結果および考察

### 1. LC-MS/MS 条件の検討

LC カラムとして、表面多孔性粒子を使った逆相カラム SUPELCO 製 Ascentis Express C18 を用い、移動相について検討したところ、5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、メタノールを使用することで、23 成分を良好なピーク形状で測定することができた (図 1)。また、MSMS 条件については、可能な限り複数イオン (定量、定性イオン) を測定するようにした。

### 2. 検量線および定量下限値

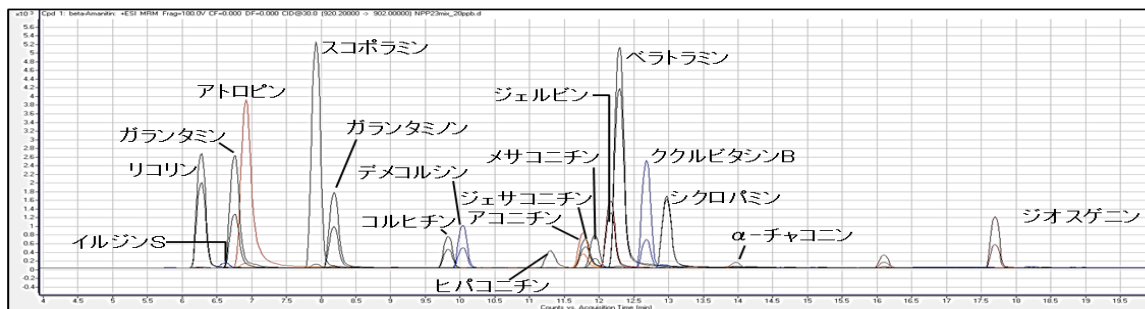
本測定条件において、10~200 ng/mL の範囲で調製した混合標準溶液を測定したところ、全成分ともに、決定係数 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、ほとんどの成分の定量下限値 (S/N ≥ 10) は 10 ng/mL (試料中濃度 0.1 ng/g) となったが、アマニタトキシン類 (α-アマニチン, β-アマニチン, ファロイジン) は、20 ng/mL (試料中濃度 0.2 ng/g) で S/N ≥ 10 を満たした。

### 3. 添加回収試験

試験溶液の調製方法に従い、ニラ、ゴボウ、シイタケを対象に、混合標準液を 1 μg/g (アマニタトキシン類 3 種は 10 μg/g) 相当となるよう添加し、無添加試料と併せて回収試験 (n = 5) を実施した。結果を表 4 に示した。

分析対象成分 (23 成分) のうち、アマニタトキシン類 3 種およびジオスシンではばらつきが大きく、α-ソラニンの回収率がニラとシイタケで 120% を超えたが、おおむね良好な結果であった。なお、α-ソラニンと α-チャコニンについては、試料にジャガイモ (可食部) を用いて、添加回収試験 (希釈倍率 500 倍, 添加量 10 μg/g) を実施したところ、良好な結

### 18成分のクロマトグラム



### 感度が低い5成分のクロマトグラム (拡大)

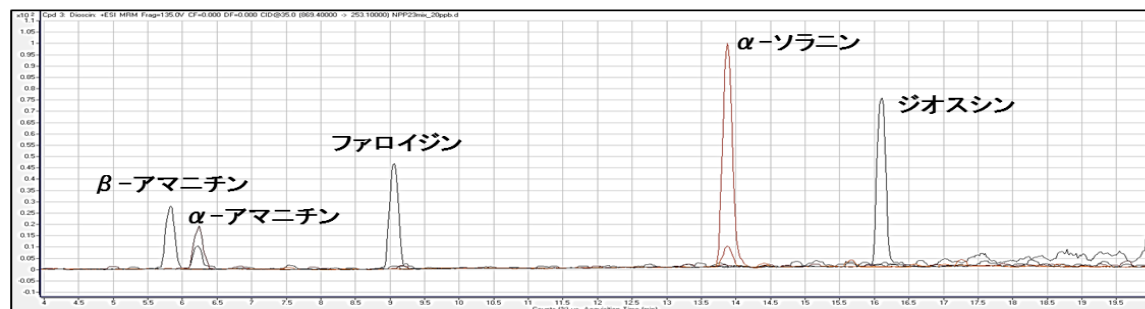


図1. 20 ng/mL標準液のクロマトグラム

表4. 添加回収試験結果 (n = 5)

	回収率(%) (RSD(%))			
	ニラ	ゴボウ	シイタケ	ジャガイモ
α-アマニチン	98.8 (31.8)	93.1 (14.4)	110.2 (22.9)	
β-アマニチン	84.5 (6.5)	83.1 (19.8)	70.9 (17.9)	
ファロイジン	104.2 (15.7)	89.7 (12.4)	90.6 (13.2)	
イルジンS	92.0 (9.9)	83.7 (8.8)	93.7 (6.7)	
アコニチン	90.3 (4.4)	91.5 (2.3)	92.6 (6.2)	
メサコニチン	89.3 (5.6)	87.8 (0.8)	89.3 (2.4)	
ヒパコニチン	92.4 (5.6)	91.3 (4.4)	94.7 (2.9)	
ジェサコニチン	89.2 (2.4)	88.3 (5.1)	89.4 (3.4)	
アトロピン	107.6 (2.1)	105.3 (2.7)	109.8 (1.8)	
スコポラミン	93.0 (2.6)	93.7 (1.8)	95.6 (1.7)	
コルヒチン	88.3 (5.9)	86.9 (2.8)	85.9 (3.0)	
デメコルシン	87.5 (3.3)	85.3 (3.5)	82.5 (1.3)	
リコリン	87.7 (1.9)	88.0 (3.1)	94.2 (2.6)	
ガランタミン	92.4 (1.1)	94.0 (1.5)	99.3 (1.4)	
ガランタミン	91.6 (2.2)	93.2 (2.1)	96.9 (2.6)	
ククルピタシンB	91.8 (3.9)	91.6 (2.9)	96.7 (1.9)	
α-ソラニン	132.7 (8.9)	114.3 (9.4)	120.4 (8.3)	90.6 <sup>※</sup> (6.1)
α-チャコニン	101.5 (6.5)	91.2 (4.3)	99.7 (6.1)	80.8 <sup>※</sup> (8.3)
ジオスシン	104.8 (23.8)	89.7 (31.8)	97.2 (16.2)	
ジオスゲニン	76.1 (5.0)	83.3 (3.8)	80.5 (3.2)	
ジェルビン	93.1 (2.4)	91.3 (2.8)	93.8 (2.9)	
ベラトラミン	90.8 (1.2)	89.8 (1.7)	93.6 (2.4)	
シクロパミン	84.9 (3.7)	90.5 (1.6)	94.1 (2.9)	

※BL試料の含有量 (α-ソラニン 1.3 μg/g、α-チャコニン 1.4 μg/g) を減算した値

果が得られた。

#### 4. 高分解能測定による未知成分分析の検討

精密質量の測定が可能なLC-Q/TOFを使って、未知成分同定の可能性を検討した。今回の検討では、模擬試料として、植物性自然毒では最も死亡事例が多いイヌサフランやグロリオサの球根等に含まれる毒成分コルヒチン（分子式：C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>）を実際の含有量レベル（サンプル換算：0.2%）添加したゴボウを使用した。

試験溶液の調製方法（LC-MS/MS法と共通）に従い得られた溶液2 μLをLC-Q/TOFに供し、SWATH® Acquisitionによる測定を行った。得られたトータルイオンクロマトグラム（TIC）で強度が高かったピークについて、プリカーサーイオンの精密質量から組成式を推定し、フラグメントイオンから絞り込んだ（図2）。その結果、最も可能性が高い物質の組成式として、コルヒチンの組成式が推定できた。

以上のことから、まだまだ検討は必要であるが、標準品が確保できない場合や健康危機事象への初期対応として、LC-Q/TOFが活用できる可能性を見出した。

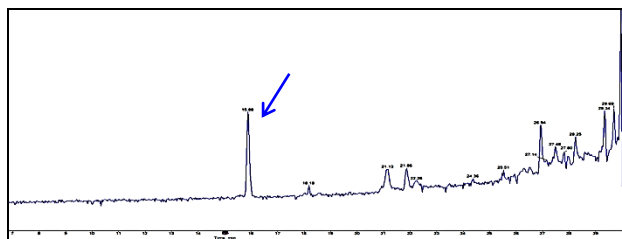
### ま と め

今回、LC-MS/MSを使った23成分植物性自然毒の一斉試験法を確立し、また、標準等が確保できない場合でも、LC-Q/TOFを使用することで、自然毒を検出できる可能性を見出した。

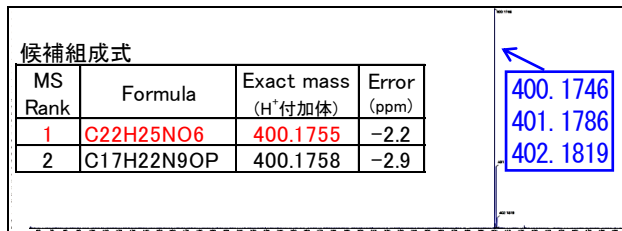
### 参 考 文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ 食中毒統計資料
- 2) 登田美桜, 他: わが国における自然毒による食中毒事例の傾向 (平成元年~22年), 食衛誌, 53, 105-120, 2012
- 3) 登田美桜, 他: 過去50年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向, 食衛誌, 55, 55-63, 2014
- 4) 村上太郎, 他: LC-MS/MSによる植物性自然毒の

#### ① TICからピーク(RT15.88)を選択



#### ② プリカーサーイオンの精密質量から組成式を推定



#### ② フラグメントイオンから絞り込み

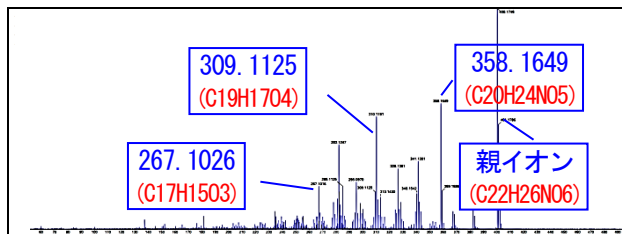


図2. 未知成分分析の流れ

迅速一斉分析法の検討, 大阪市立環科研報告, 79, 17-22, 2017

5) 山口奈穂, 他: LC/MS/MSによる植物性自然毒の一斉分析法の開発, 熊本県保健環境科研所報, 47, 48-55, 2017

6) 本田大輔, 他: LC/MS/MSによる有毒キノコ由来する毒成分の迅速一斉分析法の検討, 熊本県保健環境科研所報, 48, 33-40, 2018

7) 大内亜沙子, 他: LC-MS/MSによる植物性自然毒の多成分一斉分析法の検討, 宮城県保健環境センター一年報, 37, 64-66, 2019

8) 南谷臣昭, 他: 植物性自然毒の多成分同時分析法の開発, 令和元年度厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究 研究分担報告書