

## LC-MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討

村上太郎、紀雅美、山口之彦、昌山敦、山野哲夫

## Simultaneous analysis of phytotoxins by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Taro MURAKAMI, Masami KI, Yukihiro YAMAGUCHI, Atsushi MASAYAMA,  
and Tetsuo YAMANO

## Abstract

A rapid and sensitive LC-MS/MS method was developed for the quantitative determination of 13 phytotoxins. The analysis was performed by a multimode ODS column using a mixture of methanol and water containing 10 mmol/L ammonium formate and an electrospray ionization mass spectrometer. The chromatographic total run time was 10 min and the limits of determination of 13 phytotoxins were 20 ng/mL, respectively. The recovery and repeatability of phytotoxins in urine was ranged from 68-152% and 1.7-24% using an Oasis HLB SPE column. The recovery and repeatability of phytotoxins in curry was ranged from 65-107% and 0.3-24% by Autoprep MF-S. The present method with acceptable analytical performance can be helpful for evaluating the determination of phytotoxins in food poisoning incidents.

**Key words:** simultaneous analysis, phytotoxin, food poisoning, LC-MS/MS, multimode ODS column

## I 緒言

高等植物の植物性自然毒(植物毒)による食中毒は、平成元年から平成 22 年の 22 年間に 287 件の事例が発生し、1,546 名の患者が報告されている[1]。植物毒による食中毒は、摂取状況によって重篤な症状を起こす場合があり、トリカブト、イヌサフランおよびグロリオサによる食中毒では死亡事例も報告されている[1]。このため、植物毒による食中毒が起こった際には迅速に原因物質を特定することによって、早急に対応を行う必要がある。

近年、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS/MS)による植物毒などの自然毒の一斉分析法が報告されており、尿や有毒植物などの自然毒の分析に応用されている[2, 3]。本研究では LC-MS/MS による植物毒の迅速一斉分析法の検討を行い、本分析法が尿と油脂や香辛料を多く含む植物毒の抽出が困難だと想定される加工食品のカレー中の植物毒の分析に適応できるかを確認した。

## II 方法

## 1) 分析対象(植物毒)

過去に食中毒事例が報告されている植物毒のうち、本研究ではトリカブトに含有するアコニチン、メサコニチンおよびヒパコニチン、スイセンに含有するガランタミン、チョウセンアサガオに含有するアトロピンおよびスコポラミン、イヌサフランおよびグロリオサに含有するコルヒチンとデメコルシン、キダチタバコに含有するアナバシンとニコチン、パイケイソウに含有するベトラミン、シクロパミンおよびジェルピンの合計 13 種の植物毒を分析対象とした。

## 2) 試薬および器具

## (1) 標準品

植物毒標準品はそれぞれ以下に示す試薬会社から入手した。

アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチン、ガランタミン、アトロピン、スコポラミン、コルヒチン、デメコルシン：和光純薬工業製、アナバシン、ニコチン：Sigma-Aldrich 製、ベトラミン、ジェルピン：Merck 製、シクロパミン：フナコシ製

(2) 精製用カラム

Oasis HLB: Waters 社製 (60 mg/3 cc、粒径 30 μm)、  
Autoprep MF-S: 昭和電工社製 (500 mg/1 mL)、  
MycoSpin™ 400 Multitoxin: Romer Labs 社製

(3) 分析カラム

Scherzo SM-C18: Imtakt 社製 (内径 3 mm、長さ 50 mm および 150 mm、粒子径 3 μm)

(4) 移動相

移動相は 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 10 mmol/L となるように HPLC 用の蒸留水で希釈して使用した。移動相用のメタノールは HPLC 用のものを使用した。

(5) 試薬

抽出用のメタノールと蒸留水は HPLC 用のものを使用した。

(6) 器材・器具

振とう機 MW-4R: 宮本理研社製  
遠心機 himac CR21G: 日立工機社製  
微量遠心機 himac CF15R: 日立工機社製  
ミルサー 800DG: 岩谷産業製  
ボルテックスミキサー VORTEX-GENIE 2: エムエス機器社製

シリンジフィルター DISMIC®-25HP: ADVANTEC 社製 (PTFE 製、孔径 0.2 μm)

3) 装置と測定条件

使用した装置と測定条件を表 1 に示す。植物毒は ODS による逆相分離に加えてアニオン交換とカチオン交換能を有するマルチモード ODS カラムの Scherzo SM-C18 によって分離した。

4) イオン化条件の検討

各植物毒標準品をメタノールで 10 μg/mL となるように希釈し、イオン化条件の検討用の標準液として使用した。各標準液を FIA (フローインジェクションアナリシス) で注入し、植物毒のマスペクトルを確認後、Corn Voltage (CV) と Collision Energy (CE) の条件を最適化した。

5) 分離条件の検討

植物毒の分離条件は、久野らの有毒植物中の植物毒の分析法[3]を参考に移動相を A: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液、B: メタノールとして、グラジエントによる分離を行った。Scherzo SM-C18 について、2 種類の異なる長さのカラム (150 mm および 50 mm) ごとに、ACQUITY UPLC Columns Calculator ソフトウェアによって、流速とグラジエント条件を最適化した (表 1)。

最適化した条件により、13 種の植物毒標準品の分析を行い、各植物毒の定量範囲の確認を行った。

表1. 分析装置と測定条件

液体クロマトグラフ	Waters社製ACQUITY UPLC	
カラム	Imtakt社製Scherzo SM-C18 (2.1 mm I.D., 3 μm)	
カラム温度	40 °C	
移動相	A 10 mmol/Lギ酸アンモニウム B メタノール	
分離条件		
① カラム長 150 mm	A 85% (0-2 min.)→10% (32-47 min.)	流速0.2 mL/min.
② カラム長 50 mm	A 85% (0-1.0 min.)→10% (6.6-9.5 min.)	流速0.35 mL/min.
質量分析装置	Waters社製Xevo™ TQ	
イオン化	ESI positive	
測定モード	SRM (Selective Reaction Monitoring)	
Ionspray voltage	3.0 kV	
Ion source temp.	350 °C	

## 6) 添加回収試験

添加回収試験用の尿は LGC Standards 社より入手した。尿 1mL に各植物毒を 100 ng/mL となるように添加したものを試料とした。添加回収試験用の加工食品には、市販のレトルトカレーをミルサーによって均質化したものを使用した。均質化したカレー 1 g に各植物毒を 10 µg/g となるように添加したものを試料とした。試料は 3 併行で抽出し、添加した植物毒標準品の濃度に対する回収率の平均値と相対標準偏差 (RSD) を評価した。

本分析は、食中毒事例が起こった際に迅速に植物毒を検出することを目的とするため、加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法の性能評価基準を参考に回収率の目標値を 50-200%、併行精度の目標値を RSD として 30% 以内にそれぞれ設定した[4]。

## 7) 抽出

### (1) 尿

Oasis HLB をメタノール 5 mL、蒸留水 5 mL でコンディショニング後、尿 1 mL を負荷し、10 %メタノール 5 mL で洗浄後、メタノール 1 mL で溶出した。抽出液はシリンジフィルターでろ過後、適宜メタノールで希釈して測定を行った。

### (2) 加工食品

試料 1 g にメタノール 20 mL を加え、30 分間振とう抽出後、10 分間遠心分離 (7,000 rpm, 4 °C) を行い、上清をシリンジフィルターでろ過したものを抽出原液とした。

抽出原液は次に示すように、各カラムでそれぞれ精製後に分析した。Oasis HLB をメタノール 5 mL、蒸留水 5 mL でコンディショニング後、抽出原液 1 mL を負荷し、10 %メタノール 5 mL で洗浄後、メタノール 1 mL で溶出した。Autoprep MF-S に抽出原液を 1.2 mL 負荷し、自然落下で溶出した試料溶液を回収した。

Mycospin 400 に抽出原液を 1 mL 負荷した後、Vortex でカラムを混合後に、2 分間の遠心分離 (10,000 rpm, 4 °C) によって溶出した試料溶液を回収した。精製後の試料溶液は適宜メタノールで希釈して測定を行った。

## III 結果と考察

### 1) イオン化条件の検討

全ての植物毒において、ポジティブモードでプロトン付加分子  $[M + H]^+$  が観測されたため、これをプリカーサーイオンとした。また、最も感度が高いプロダクトイオンを定量用に設定した (表 2)。

表2. LC-MS/MSによる各植物毒の測定条件

標準品	Monoisotopic (Da)	Precursor ions (m/z)	Productions (m/z)	CV (V)	CE (V)
① Nicotine	162.2	163.2	130.1	30	20
② Anabasine	162.2	163.2	80.0	30	20
③ Galanthamine	287.4	288.1	231.0	30	20
④ Scopolamine	303.4	304.2	156.0	30	20
⑤ Atropine	289.4	290.1	124.0	40	20
⑥ Colchicine	399.4	400.1	310.0	30	30
⑦ Demecolcine	371.4	372.2	310.1	30	20
⑧ Mesaconitine	631.3	632.3	104.9	50	60
⑨ Aconitine	654.3	646.3	104.9	60	60
⑩ Hyapaconitine	615.3	616.3	104.9	50	60
⑪ Veratramine	409.6	410.5	84.0	50	30
⑫ Jervine	425.6	426.6	114.0	50	30
⑬ Cyclopamine	411.6	412.6	114.0	50	30

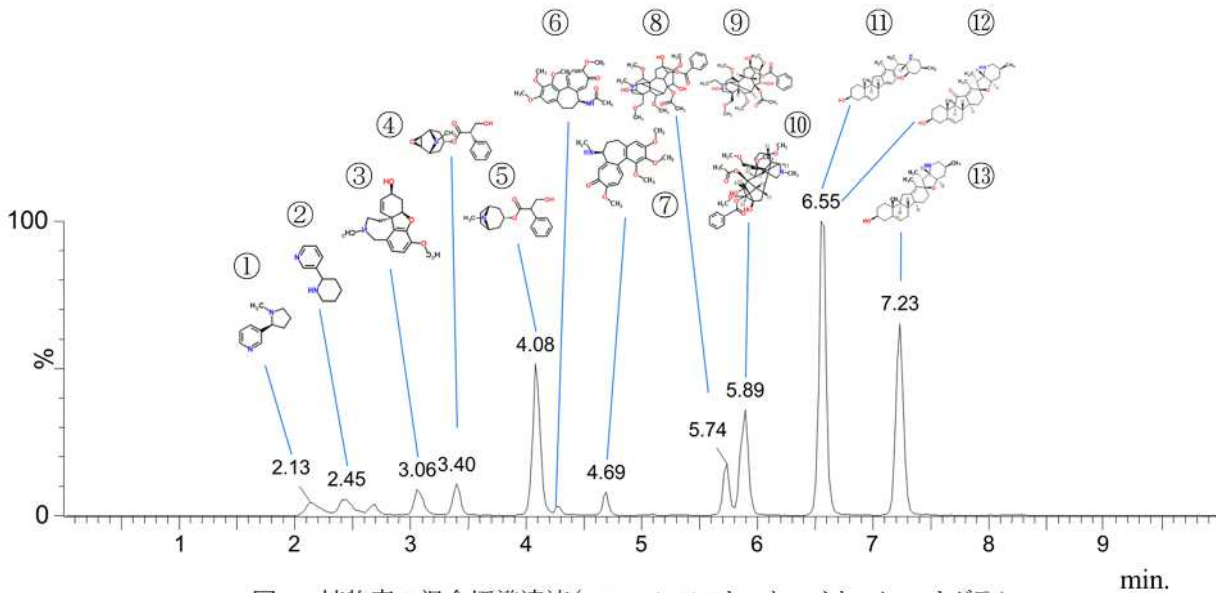


図1 13植物毒の混合標準溶液(100 ng/mL)のトータルイオンクロマトグラム  
\* 各植物毒と定量条件は表2に示す。

## 2) 最適化した分離条件による植物毒の分離の確認

最適化した分離条件で 13 種の植物毒標準品について測定を行ったところ、迅速分析用の分離条件では 1 測定 10 分以内で分離が可能となった。図 1 には 13 種の植物毒の 100 ng/mL 混合標準液を分析した時のトータルイオンクロマトグラムと構造を示す。

迅速分析用の分離条件ではいずれの植物毒も 20-500 ng/mL の範囲で直線性を示し、従来の分離条件での定量下限(定量下限:20 ng/mL)や直線性の範囲の差異は確認されなかった。

## 3) 尿からの植物毒の検出

立野らによる健康者の尿での添加回収試験における報告[2]を参考に、各植物毒を尿 1 mL あたり 100 ng になるように添加し、添加回収試験を実施した。尿を Oasis HLB によって精製後に分析した時の各植物毒の回収率と標準偏差を図 2 に示す。今回検討を行った 13 種の植物毒の回収率の範囲は 68-152 % であり、いずれも目標とした 50-200% の回収率を満たした。各植物毒の RSD の範囲は 1.7-24 % であり、目標とした 30 % 以内の RSD を満たした。

LC-MS/MS による尿中の植物毒の分析は、山辺らによって尿中のアトロピンとスコポラミンの迅速定量についての検討が行われている[5]。この検討の中では、尿を Oasis HLB で精製後に陰イオン交換カラムの BondElut DEA (Agilent 社製)により精製することによって、スコポラミンの回収率が向上すること

が報告されている。また、小西らによるチョウセンアサガオの喫食による食中毒事例における尿中のヒヨスチアミンとアトロピンの検出事例でも尿を Oasis HLB で精製後に、陰イオン交換カラムの Inert-Sep SlimJ PSA (GL Science 社製)で精製することで良好な回収率が得られることが報告されている[6]。このように塩基性化合物であるアトロピンやスコポラミンなどの化合物では陰イオン交換カラムで精製を行うことによって、回収率と精度の向上が期待される。小西らの報告では、チョウセンアサガオの喫食による食中毒における中毒患者の尿から 170-670 ng/mL のスコポラミンが検出されたことが報告されている[6]。検討した迅速分析法では尿中の 100 ng/mL のスコ

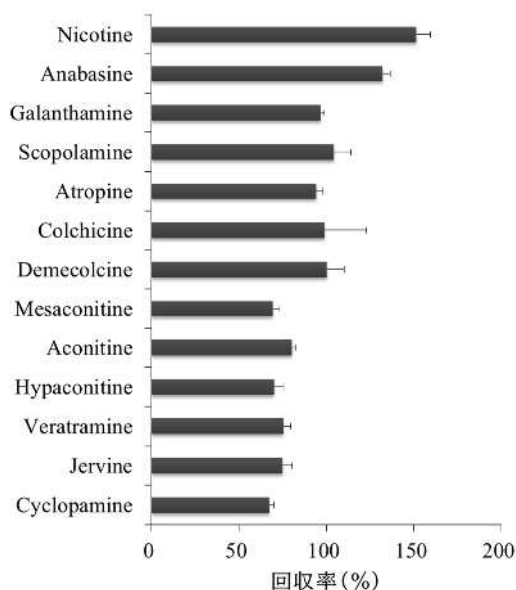


図2 尿から抽出した植物毒の回収率

\*尿に添加した各植物毒(100 ng/mL)に対する回収率の平均値と標準偏差(n=3)

ポラミンが検出可能であったため、チョウセンアサガオの喫食による食中毒が起こった際には検出可能であると考えられる。また、グロリオサによる食中毒事例では尿中から 1.5 mg/L のコルヒチンが検出されている[7]。尿中のコルヒチン濃度は 1,500 ng/mL と換算されるため、食中毒が発生した際には迅速一斉分析法で検出することが可能である。

#### 4) 加工食品(カレー)からの検出

加工食品での添加回収試験では、久野らによる有毒植物中の植物毒含有量の結果を参考に[3]、各植物毒をカレー 1 g あたり 10 µg 含むように添加した試料を用いて検討を行った。試料をメタノールで振とう抽出した抽出原液をメタノールで希釈し、測定を行ったところ、分離条件の前半に溶出されるニコチンとアナバシンが検出されなかった。これらの植物毒はカレー中の油脂や香辛料などのマトリクスが共存したことによって、イオン化抑制を受けていると推定されたため、抽出原液を各精製カラムで精製後に測定を行った。精製後の植物毒の回収率の平均値と標準偏差を図 3 に示す。Oasis HLB による精製後にはアナバシンが検出されなかった。Mycospin 400 による精製後の回収率の範囲は 54-113% であり、目標と

した 50-200 % の回収率を満たした。しかしながら、*RSD* の範囲は 2.5-33.9 % であり、コルヒチンとジェルビンの併行精度が目標とした 30% 以内の *RSD* を満たさなかった。Mycospin 400 はゼアラレノン、トリコテセン系カビ毒、アフラトキシン、オクラトキシン、フモニシンを対象とするスピン型多機能カラムであり、家畜用飼料用のトウモロコシ中のカビ毒の検出に適用されている[8]。本カラムはカレー中のコルヒチンとジェルビン以外の植物毒 11 種を精製する際に適用可能であることが確認された。

Autoprep MF-S で精製した植物毒の回収率と *RSD* の範囲はそれぞれ 65-107 % と 0.3-24 % であり、目標とした回収率と *RSD* を満たした。Autoprep MF-S はアフラトキシンを対象とするイムノクロマト測定用クリーンアップ多機能カートリッジとして販売されているが、本カラムもカレーから植物毒を精製する際にも適用可能であることが確認された。

カレーから抽出した植物毒の精製を検討した 3 種のカラムの中では、Autoprep MF-S のみが目標とした回収率と *RSD* を満たしたため、油脂や香辛料などの複雑なマトリクスから 13 種の植物毒を精製する際には Autoprep MF-S が有効であると考えられる。

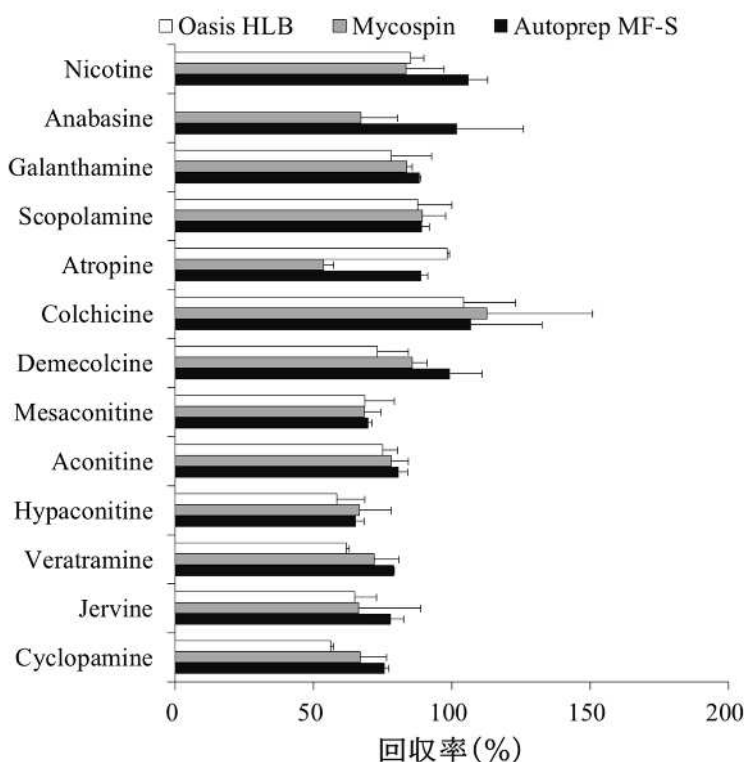


図3 カレーから抽出した植物毒の回収率

\*1 カレーに添加した各植物毒(10 µg/g)に対する回収率の平均値と標準偏差(n=3)

## 5) 野草茶中のスコポラミンおよびアトロピンによる食中毒事例への応用

本分析法は大阪市内で発生した野草茶中のスコポラミンおよびアトロピンによる食中毒事例の中でも応用が可能であった[9]。この事例では事前に札幌市で同様の食中毒が報告されていたため[10]、植物毒の同定が比較的容易であった。

しかしながら、植物毒による食中毒事例では原因の特定が困難な場合も想定される。このため、今後は本分析法で分析可能な植物毒と対象となる加工食品の範囲を確認することによって、植物毒による食中毒発生の際には迅速な対応が可能となると考える。そして、有毒植物による食中毒事例では混入した有毒植物の量とその有毒植物中の植物毒の含有量によって、残品に含まれる植物毒の量が変化すると推定される。また、加熱などの調理加工による影響によっても植物毒の残存量は変化すると推定される。実際に有毒植物による食中毒が起こった際には、本分析法で植物毒を迅速に検出した後に、検出された植物毒と混入した試料マトリクスによって抽出液の精製法やマトリクス検量線などの定量法を検討することによって、より精確に原因となった食品中の植物毒を定量できると考える。

## IV まとめ

13種の植物毒をUPLCによる分離条件の最適化によって、1測定10分間での迅速なスクリーニングが可能となった。検討を行った迅速分析法は尿とカレー中の13種の植物毒で目標とした50-200%の回収率と30%以内のRSDを満たしていた。検討を行った植物毒の迅速一斉分析は試料の前処理から測定まで1時間程度で分析ができるため、食中毒事例の際には迅速な対応が可能であると考えられる。

**謝辞** 植物毒の分離条件の検討にあたり、インタクト(株)から助言を戴きましたことを深謝いたします。本分析法の抽出条件の検討にあたり、元和歌山県環境衛生センターの久野恵子様から有毒植物の試料を提供して戴きましたことを深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福 肇, 森川 馨. 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). 食品衛生学雑誌 2012; 53: 105-120.
- 2) 立野幸治, 藤原美智子, 三浦泉. LC/MS/MSによる尿中植物性自然毒一斉分析手法の検討. 山口県環境保健センター所報 2009; 52: 54-57.
- 3) 久野恵子, 高井靖智, 橋爪崇, 山東英幸. 健康機器管理に対応した自然毒一斉分析法の検討—有毒植物および毒きのこ19成分—. 第48回全国衛生化学技術協議会年会講演集 2011: 41-42.
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課. 加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について. 事務連絡, 平成25年3月26日.
- 5) 山辺真一, 肥塚加奈江, 山本 淳, 石井 学, 今中雅章. LC/MS/MSによる尿中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量. 岡山県環境保健センター年報 2008; 32: 141-143.
- 6) 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 2008; 49: 266-271.
- 7) 宅間範雄, 荒尾真砂, 古田和美, 麻岡文代, 川田常人, 福永和俊. 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 -. 高知衛研報 2008; 54: 42-45.
- 8) Dagnac T, Latorre A, Fernández Lorenzo B, and Llompart M. Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2016; 33:1850-63.
- 9) 紀雅美, 仲谷正, 山口之彦, 昌山敦, 角谷直哉, 村上太郎, 清水充. 大阪市内で発生した自然毒による食中毒事例への対応について. 大阪市立環科研報告 2014; 76: 19-23.
- 10) 細木伸泰, 滝川香織, 小金澤望, 牧里江, 宮本啓二, 宮田淳. 野草茶からのスコポラミン検出事例について. 札幌市衛研年報 2013; 40: 48-54.