

## 植物性自然毒の多成分迅速一斉分析法の検討

徳島県立保健製薬環境センター

岩城 達也・宮脇 淳也・長谷 良子\*1・石丸 智子

Study on Rapid Simultaneous Analysis Method for Phytotoxins

Tatsuya IWAKI, Jyunya MIYAWAKI, Ryoko HASE and Tomoko ISHIMARU

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

### 要 旨

植物性自然毒による食中毒が発生した際に原因を速やかに特定するため、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。）による一斉分析法の検討を行った。植物性自然毒の 15 成分について、LC-MS/MS の測定条件、試料からの抽出や精製等の前処理の検討を行い、模擬試料としてカレーを用いた添加回収試験を実施したところ、良好な結果が得られたので報告する。

Key words : 植物性自然毒 Phytotoxins, 一斉分析 Simultaneous Analysis

### I はじめに

植物の中には、体内に毒成分を持っているものが多く知られており、植物性自然毒による食中毒は、細菌性食中毒と比較すると件数や患者数は少ないものの、症状が重篤化しやすく、死に至る事例もあり、食品衛生上の重要な課題とされている。

中毒事例が発生した際、原因を速やかに特定するため、当センターは、食品の残品等を分析し、毒成分を同定する役割を担っており、様々な植物性自然毒を迅速に分析できる体制を構築しておく必要がある。

そこで、健康危機事象に対する分析体制強化の一環として、多数の植物性自然毒の成分を一度に分析可能とする「多成分迅速一斉分析法」の確立に向け、LC-MS/MS の測定条件、試料（調理済み食品等）からの抽出や精製等の前処理の検討を行ったので、報告する。

### II 方法

#### 1 分析対象成分

厚生労働省の統計<sup>2)</sup>を参考に、食中毒事例の原因として発生件数が多いもの、致命率の高いものを中心とした 15 成分（表 1 に示す。キノコ毒であるイルジン S を含む。）を分析対象とした。

表 1 分析対象成分

	成分名	植物種
1	リコリン	スイセン, スノーフレーク
2	ガラントアミン	
3	コルヒチン	イヌサフラン, グロリオサ
4	デメコルシン	
5	ジェルピン	バイケイソウ類
6	ベラトラミン	
7	シクロパミン	
8	α-ソラニン	ジャガイモ
9	α-チャコニン	
10	アトロピン	チョウセンアサガオ類, ハシリドコロ
11	スコボラミン	
12	アコニチン	トリカブト類
13	メサコニチン	
14	ヒパコニチン	
15	イルジン S	ツキヨタケ

\*1 現 東部保健福祉局

## 2 標準品及び試薬等

### (1) 標準品

リコリン塩酸塩は Med Chem Express 社製, ガランタミン臭化水素酸塩, ジェルビン, ベラトラミンは東京化成工業(株)製, コルヒチンは和光純薬工業(株)製, デメコルシン, アトロピン硫酸塩水和物, スコポラミン臭化水素酸塩水和物, アコニチン, メサコニチン, ヒパコニチンは富士フィルム和光純薬(株)製, シクロパミンは Toronto Research Chemicals 社製,  $\alpha$ -ソラニン,  $\alpha$ -チャコニンは PhytoLab 社製, イルジン S は林純薬工業(株)製を用いた。

### (2) 混合標準溶液

各標準品から 50  $\mu\text{g/mL}$  の混合標準原液(メタノール溶液)を調製した。この混合標準原液を適宜メタノールで希釈し、測定条件の検討及び添加回収試験等に使用する混合標準溶液とした。

### (3) 試薬等

メタノール, 蒸留水は, HPLC 用を使用した。

精製用カラムは, Oasis PRiME HLB (60 mg/3 cc, Waters 社製)を使用した。

## 3 装置

LC-MS/MS : ExionLC AC/QTRAP4500 (SCIEX 社製)

## 4 試料

添加回収試験用の食品には, 油脂や香辛料等の複雑なマト

リックスを含むとされるカレーを選定し, 市販のレトルトカレーを用いた。

## III 結果及び考察

### 1 LC-MS/MS の測定条件の検討

#### (1) MS/MS 条件

対象成分のメタノール溶液をインフュージョンで MS 部へ導入し, イオン化条件を検討した。

全対象成分のプリカーサーイオンが検出され, プロダクトイオンのうち, 感度及び選択性が高いものを 2 つずつ選び, 定量イオンと定性イオンとした。その結果を表 2 に示す。

#### (2) LC 条件等

既報<sup>3,4)</sup>を参考に, 分析カラム, 移動相等を選択した。なお, 測定時間を 30 分から 25 分へと短縮するとともに, 分析する成分が多いことから, できるだけ保持時間が重ならないようにするため, グラジエント条件を変更した。

次に, イオン源温度を 300, 350, 400, 450, 500, 550 $^{\circ}\text{C}$ に設定して, 混合標準溶液を測定したところ,  $\alpha$ -チャコニンは 400 $^{\circ}\text{C}$ , イルジン S は 500 $^{\circ}\text{C}$ を超えるとピーク面積値が小さくなる等の影響があることから, 全対象成分の検出に最適な 350 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。

これらの結果から得られた条件を表 3 に示す。

表 2 分析対象成分の MRM 条件

成分名	プリカーサーイオン (m/z)	定量イオン			定性イオン		
		(m/z)	DP (V)	CE (V)	(m/z)	DP (V)	CE (V)
リコリン	288.0	146.9	81	41	119.0	81	53
ガランタミン	288.1	213.1	86	33	198.0	86	45
コルヒチン	400.1	358.1	106	31	152.0	106	125
デメコルシン	372.1	310.0	81	33	152.1	81	115
ジェルビン	426.2	67.1	136	75	91.0	136	115
ベラトラミン	410.2	295.1	146	39	84.0	146	69
シクロパミン	412.2	114.1	151	41	109.0	151	43
$\alpha$ -ソラニン	868.4	398.2	191	103	98.1	191	161
$\alpha$ -チャコニン	852.4	706.5	201	95	98.0	201	149
アトロピン	290.1	124.2	91	35	93.0	91	41
スコポラミン	304.1	138.0	66	33	156.0	66	25
アコニチン	646.2	586.3	36	49	77.0	36	167
メサコニチン	632.2	572.2	11	49	77.0	11	167
ヒパコニチン	616.2	556.3	66	47	524.2	66	53
イルジン S	265.1	217.1	66	15	201.2	66	19

表 3 LC-MS/MS 測定条件

(HPLC 部)	
カラム	Scherzo SM-C18 (2.0 mm I.D. $\times$ 150 mm, 粒子径 3 $\mu\text{m}$ , Imtakt 社製)
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
移動相	A 液 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 B 液 メタノール
グラジエント	A/B = 90/10 (0min) $\rightarrow$ 30/70 (2.5min) $\rightarrow$ 0/100 (15-18.9min) $\rightarrow$ 90/10 (19-25min)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 $\mu\text{L}$
(MS 部)	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 positive
スプレー電圧	5500 V
イオン源温度	350 $^{\circ}\text{C}$

## 2 検量線及び定量限界

混合標準溶液を5~100ng/mLの範囲内で5点調製し、測定で得られたピーク面積値から検量線を作成したところ、各対象成分いずれも良好な直線性 ( $r^2=0.99$  以上) が得られた。

定量限界は、5 ng/mL とし、S/N  $\geq 10$  であることを確認した。

## 3 前処理方法の検討

### (1) 抽出方法

既報<sup>3,4)</sup> や山口らの報告<sup>5)</sup> を参考に、抽出溶媒としてメタノールを用い、振とうによる抽出とした。なお、振とう時間については、既報<sup>3,4)</sup> の30分から15分へと短縮した。

### (2) 精製方法

今回の検討では、植物だけでなく、油等を含む調理済み食品に対応できる分析法を確立する目的がある。そのため、堀井や山本らの報告<sup>6)</sup> を参考に、脂質等の除去ができ、調理済み食品に有用と考えられた Oasis PRiME HLB を使用して、精製を行うこととした。

洗浄に用いるメタノール濃度を検討するため、Oasis PRiME HLB に5, 10, 15, 20%メタノール溶液の混合標準溶液 (各100 ng/mL) をそれぞれ5 mL 負荷し、流出液を得た。この流出液と各メタノール濃度の混合標準溶液 (各100 ng/mL) をを LC-MS/MS で測定し、ピーク面積を比較することで、流出率を確認した。

5, 10%メタノール溶液では、特に対象成分の流出はないが、15%メタノール溶液ではイルジン S が5.4%流出、20%メタノール溶液ではイルジン S が26.2%流出した。このことから、洗浄溶媒は、10%メタノール溶液とした。

### (3) 試験溶液の希釈倍率の検討

希釈倍率の検討においては、検出感度及び機器への負担を考慮するとともに、検体や成分によっては、夾雑物の影響で測定成分のイオン化が促進又は抑制され、測定値が真値を示さない可能性が考えられる<sup>9)</sup>。

そこで、市販のレトルトカレーを前処理し、溶出液に混合標準溶液を各最終希釈倍率 (100, 200, 400 倍) で20 ng/mL となるように添加したサンプルと、20 ng/mL の混合標準溶液を LC-MS/MS で測定し、それぞれのピーク面積を比較した。図1に結果を示すが、各希釈倍率とも大きな差はない。

植物中の自然毒の濃度は、数  $\mu\text{g/g}$  から数千  $\mu\text{g/g}$  のものが多い<sup>9)</sup> とされており、数  $\mu\text{g/g}$  程度でも定量できるよう、試験溶液の希釈倍率を100倍とした。

これらの結果を踏まえて実施した、前処理方法のフローを図2に示す。

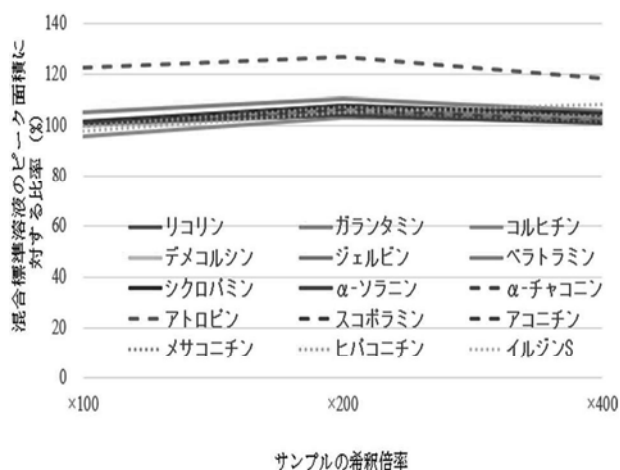


図1 試験溶液の希釈倍率の検討

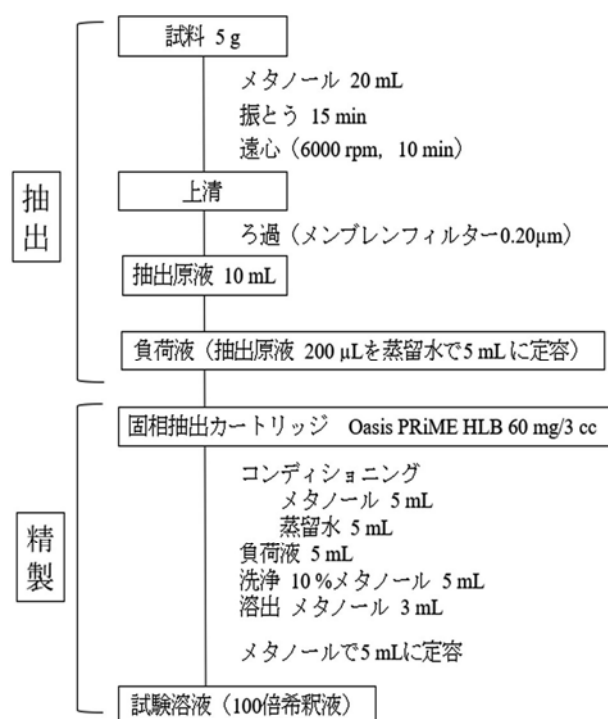


図2 前処理方法のフロー

## 4 添加回収試験

市販のレトルトカレーをミキサーによって均質化し、各対象成分が2  $\mu\text{g/g}$  となるよう混合標準溶液を添加したものを試料とした。試験は3併行で実施し、添加した濃度に対する回収率の平均値と併行精度を算出した。

本分析法は、食中毒事例が発生した際に迅速に植物性自然同の成分を検出することを目的としているため、目標値は、平成25年3月26日付け事務連絡「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」<sup>8)</sup> を参考に、選択性は添加濃度ピーク面積の1/3未満、回収率は50~200%、併行精度は相対標準偏差 (RSD%) において30%未満とした。

#### (1) 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、妨害ピークは検出されなかった。

#### (2) 回収率及び併行精度

回収率及び併行精度の結果を表4に示す。全対象成分において、回収率の範囲は80.9～116.8%、相対標準偏差(RSD%)の範囲は1.0～5.6%となり、目標値を満たした。

表4 添加回収試験結果

成分名	カレー	
	回収率(%)	併行精度(RSD%)
リコリン	99.3	5.6
ガラントミン	98.5	2.5
コルヒチン	86.1	4.0
デメコルシン	88.7	3.8
ジェルピン	92.6	2.4
ベラトラミン	93.6	1.7
シクロバミン	80.9	2.0
α-ソラニン	94.8	1.6
α-チャコニン	89.9	5.4
アトロピン	116.8	4.1
スコポラミン	98.9	3.3
アコニチン	97.2	2.2
メサコニチン	96.4	2.2
ヒバコニチン	95.1	3.9
イルジン S	92.9	1.0

#### IV まとめ

植物性自然毒による食中毒が発生した際に原因を速やかに特定するため、LC-MS/MSによる一斉分析法の検討を行った。

植物性自然毒の15成分(キノコ毒であるイルジン Sを含む。)について、LC-MS/MSの測定条件、試料からの抽出や精製等の前処理について検討を行い、模擬試料としてカレーを用いた添加回収試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

本分析法は、1検体につき、前処理が1時間程度、LC-MS/MSの測定時間は25分程度と短時間で、操作も簡便であり、植物性自然毒による食中毒が発生した際に、迅速に分析できる有用な手法であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：自然毒のリスクプロファイル  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html) (2025年8月6日現在)
- 2) 厚生労働省ホームページ：食中毒統計資料  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html) (2025年8月6日現在)
- 3) 富永智子, 中村哲也, 長谷良子, 他：LC-MS/MSによる食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速分析法の検討について, 徳島県立保健製薬環境センター年報, **11**, 15-18 (2021)
- 4) 中村哲也, 富永智子, 岩城達也, 他：LC-MS/MSによる加工食品中のリコリン分析法の検討, 徳島県立保健製薬環境センター年報, **13**, 33-35 (2023)
- 5) 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, 熊本県保健環境科学研究所報, **47**, 48-55 (2017)
- 6) 堀井裕子：LC-MS/MSによる調理食品中の植物性自然毒一斉分析法の検討, 富山県衛生研究所年報, **46**, 131-135 (2023)
- 7) 山本幸, 宮城島利英, 小郷沙矢香, 他：尿および吐物中の植物性自然毒一斉分析法の検討, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **65**, 33-38 (2022)
- 8) 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, 平成25年3月26日, 事務連絡 (2013)