

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

富永 智子・中村 哲也・長谷 良子・堀見 朋代

Rapid analysis of Atropine and Scopolamine in Food by LC-MSMS

Tomoko TOMINAGA, Tetsuya NAKAMURA, Ryouko HASE, and Tomoyo HORIMI

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

高速液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いたチョウセンアサガオの自然毒成分であるアトロピン及びスコポラミンの迅速分析法について検討し、定性及び定量分析ができることを確認した。

Key words : チョウセンアサガオ *Datura*, アトロピン *Atropine*, スコポラミン *Scopolamine*

I はじめに

徳島県の植物性自然毒による食中毒の発生件数は、過去10年間（平成23年から令和2年）で2件であり、非常に少なく抑えられている。一方、検査技術の維持及び継承が課題であるため、健康危機管理事象への対策として、より簡便な迅速分析法による検査体制の整備に取り組んでいるところである。

当センターでは、過去にチョウセンアサガオの自然毒成分であるアトロピン及びスコポラミンの分析について、健康危機管理事象模擬訓練時にガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）、薄層クロマトグラフィー（TLC）及び高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた分析を実施している²⁾。

今回は、他自治体の分析事例を参考に、LC-MS/MSを用いた、食品に含まれるアトロピン及びスコポラミンの迅速分析法について検討したため、報告する。

II 方法

1 検体

家庭で調理された味噌汁（具材：ごぼう水煮、豆腐、蒟蒻）

2 試薬

(1) 標準品

硫酸アトロピン標準品は、和光純薬工業（株）製（特級）、臭化水素酸スコポラミン標準品は、和光純薬工業（株）製（一級）を使用した。

(2) 試薬等

メタノール、蒸留水は、HPLC用を使用した。

精製カラムは Waters 社製 Oasis HLB（60 mg/3 cc 粒径 30 μm）を使用した。

3 標準溶液

硫酸アトロピンと臭化水素酸スコポラミンをそれぞれメタノールで 10 mL に定容し、標準原液（1000 μg/mL）とした。混合標準溶液（20 μg/mL, 1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 0.2 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL）は、標準原液を混合し、メタノールで段階的に希釈して調製した。

4 装置及び分析条件

LC-MS/MS

(1) 装置

（HPLC 部）資生堂社製 NANOSPACE SI-2

（MS 部）サーモエレクトロン社製

TSQ Quantum Ultra

(2) 分析条件

(HPLC 部)

カラム : Scherzo SM-C18 (2.0 mm I.D. × 150 mm,
粒子径 3 μm, Imtakt 社製)

カラム温度 : 40°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

グラジエント組成 : A/B = 70/30 (2 min) → (13 min) →

44/56 → (1 min) → 5/95 (9 min) → 70/30 (5 min)

流速 : 200 μL/min

注入量 : 5 μL

(MS 部)

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化法

イオンスプレー電圧 : 3500 V (+)

コリジョンガス圧 : 1.2 mTorr

Sheath Gas Pressure : 41

Aux Gas Pressure : 15

Capillary Temperature : 300°C

アトロピン, スコポラミンの定量イオン, 確認イオン及び
コリジョンエネルギー (CE) は表 1 に示した.

表 1 モニターイオン等

化合物名		Q1	Q3	CE
アトロピン	定量イオン	290.3	124.1	22
	確認イオン		93.1	28
			91.1	31
			77.1	49
スコポラミン	定量イオン	304.3	138.1	19
	確認イオン		156.1	15
			103.1	31
			110.1	17

5 検査方法

図 1 及び図 2 に示す 2 種類の方法について検討した.

方法 1 : 牛山ら³⁾の手法を参考に図 1 に示す方法で実施した.

方法 2 : 村上ら⁴⁾の手法を参考に図 2 に示す方法で実施した.

アトロピン及びスコポラミンの最低中毒量はそれぞれ 70 μg/kg, 14 μg/kg とされていること⁵⁾, また, 他自治体の中毒事例における調理済み残品中の含有量の結果^{3), 5)}を参考に, 本検討では, 試料 1 g 中のアトロピン及びスコポラミンの濃度が 100 μg となるよう標準原液を添加した.

真度については厚生労働省妥当性評価ガイドライン⁶⁾に則り, 70-120%を目標値として評価した.

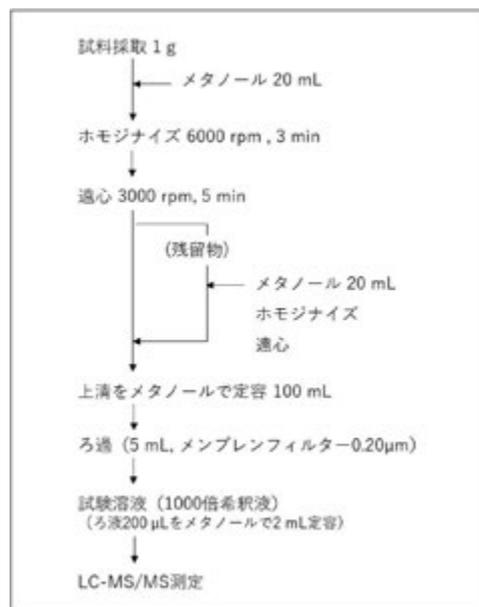


図 1 方法 1



図 2 方法 2

III 結果及び考察

1 定性

方法 1, 2 とともに, アトロピン及びスコポラミンの定量イオンのクロマトグラムにおけるピーク形状及び保持時間 (以下「RT」という.) が一致した (図 3). また, クオリファイアイオン比により定性できることを確認した.

2 検量線

混合標準溶液のうち, 0.5 μg/mL, 0.2 μg/mL, 0.1 μg/mL, 0.01 μg/mL の 4 点を溶媒検量線の範囲とし, 良好な直線性 (R²=0.9995 以上) を得ることができた (図 4).

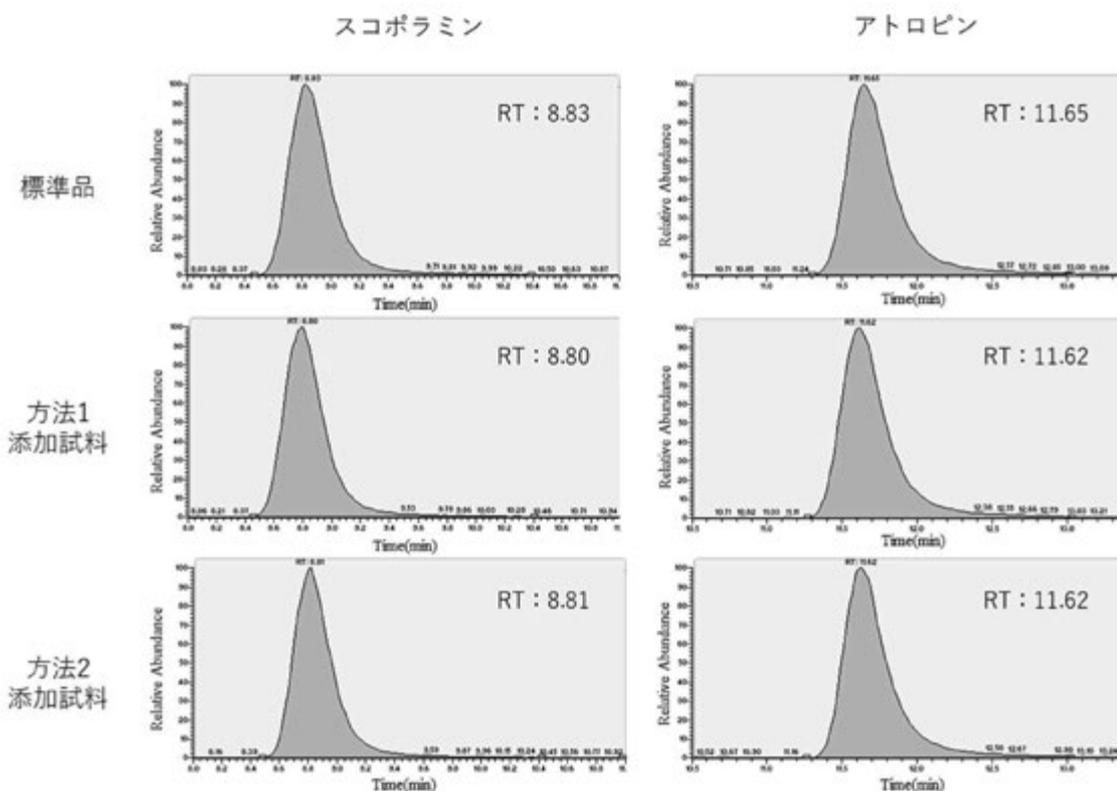


図3 各方法におけるアトロピン及びスコポラミンのクロマトグラム

3 方法1による添加回収試験

結果は表2のとおりとなった。アトロピンについては回収率が130%を超え、真度の目標値を上回る結果となった。他自治体の報告⁷⁾⁸⁾からも、アトロピンの定量においてはマトリックスの影響（以下「マトリックス効果」という。）について示唆されており、本検討でも同様の傾向となったと考えられる。これを踏まえ、ブランク試料（標準原液非添加の検体）を用いマトリックス検量線を作成及び定量した結果、目標値を満たした（表2）。なお、マトリックス検量線においても、溶媒検量線と同範囲の4点とし、良好な直線性（ $R^2=0.9998$ 以上）を得られることを確認している（図5）。

また、試料溶液の希釈倍率を上げることでマトリックス効果が少なくなることが報告されているため⁹⁾、ブランク試料の入手が困難である場合は、マトリックス効果の低減方法の1つとして、さらに希釈倍率を上げることも考慮される。

スコポラミンについては、いずれの検量線を用いても目標値を満たし、定量することができた。

4 方法2による添加回収試験

結果は表2のとおりとなった。溶媒検量線を用いて定量したところ、アトロピン、スコポラミンいずれにおいても真度は目標値を満たし、定量することができた。方法1と比較し、カラム精製を介することで、マトリックス効果が低減できた

と考えられる。ただし、アトロピンについては、依然として回収率が比較的高い傾向にあり、食品の種類などマトリックスによっては目標値を逸脱することが懸念される。また、今回は調理品として味噌汁のみの検討であるため、他の食品についても同様の試験を行い、回収率の傾向を把握することが望ましいと考えられる。

表2 添加回収試験における平均回収率（%）

	方法1 (n=3)		方法2 (n=3)
	溶媒 検量線	マトリックス 検量線	溶媒 検量線
アトロピン	136.5	114.4	116.5
スコポラミン	110.3	109.0	100.4

IV まとめ

他自治体の分析事例を参考に、2種類の方法でアトロピン及びスコポラミンの添加回収試験を実施し、回収率を比較した。

アトロピンについては、方法1で溶媒検量線を用い定量を行ったところ、真度の目標値を上回る結果となった。マトリックスの影響が示唆されたため、マトリックス検量線を用いたところ、目標値を満たすことができた。カラム精製を介し

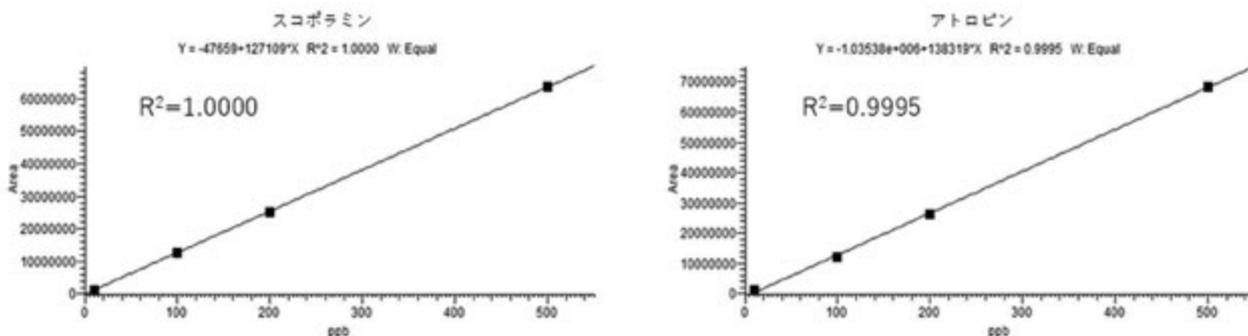


図4 溶媒検量線

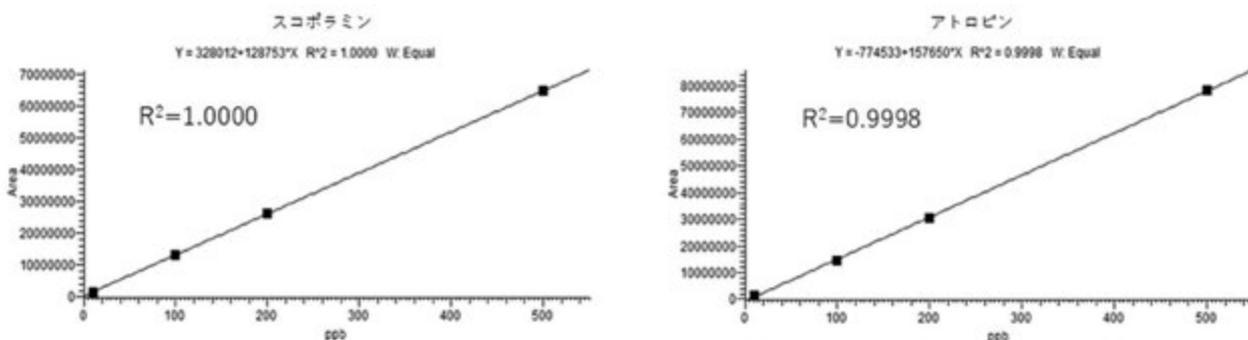


図5 方法1のマトリックス検量線

た方法2では、溶媒検量線を用いて目標値を満たすことができた。

スコポラミンについては、方法1（溶媒検量線及びマトリックス検量線）及び方法2のいずれにおいても定量で目標値を満たすことができた。

いずれの方法も短時間で前処理することが可能であり、緊急の危機管理事象における定性試験やスクリーニングに適用できることが示唆された。アトロピンについては定量性を向上させるため、マトリックス効果を考慮した希釈倍率や精製等のさらなる検討が必要であると考えられる。

今後はチョウセンアサガオ由来の食中毒が想定される調理品等を中心に同様の検討を行うほか、その他の自然毒成分についても、本検討で得られた知見を活かして分析法の整備を進めていきたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省ホームページ：食中毒「4. 食中毒統計資料」
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2021年8月20日現在)
- 2) 中西淳治, 浅川和宏, 佐々木智理, 他：平成25年度健康危機管理模擬訓練におけるアトロピン及びスコポラミンの分析事例について, 徳島県立保健製薬環境センター年報, **4**, 22-28 (2014)

- 3) 牛山温子, 赤星千絵, 大澤伸彦, 他：LC-MS/MS およびDNA バーコーディングを用いた食中毒事例におけるチョウセンアサガオ類の鑑別, 食品衛生学雑誌, **58**, 86-95 (2017)
- 4) 村上太郎, 紀雅美, 山口之彦, 他：LC-MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討, 大阪市立環境科学研究所報告, **79**, 17-22 (2017)
- 5) 東京都福祉保健局健康安全部食品監視課編集：平成19年東京都の食中毒概要3特集 植物性自然毒による食中毒, 125-127, 東京都福祉保健局健康安全部食品監視課, 東京 (2009)
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて, 平成19年11月15日, 食安発第1115001号 (2007)
- 7) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 他：LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討 (2) アトロピン, スコポラミン, アコニチン及びメサコニチンの同時分析, 岡山県環境保健センター年報, **37**, 129-132 (2013)
- 8) 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, **19**, 67-71 (2018)
- 9) 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)