

植物性自然毒の多成分一斉分析法の検討

○櫻井正晃、青木和子¹、湯浅全世¹現：つくば保健所

要旨

自然毒による食中毒は、重篤な症状を引き起こすものも多く、原因究明のため早急に検査結果を出すことが求められている。今回、植物性自然毒について同一の方法で複数の有毒成分を同時に分析できる LC-MS/MS による一斉分析方法を検討したので報告する。

キーワード：

植物性自然毒、LC-MS/MS、コルヒチン、リコリン、ベラトラミン、ジェルビン、ソラニン、チャコニン、アトロピン、スコポラミン、一斉分析法

はじめに

自然毒食中毒は、フグ毒や貝毒等の動物性と、キノコや高等植物の植物性に分類される。食中毒全体の発生件数に占める自然毒による食中毒の割合は低いが、1回の喫食量が少量でも症状が重篤化しやすく致死的になる場合もある。

自然毒の中でも高等植物を原因とする事例の多くは家庭で発生し、食用にできる植物と有毒植物との誤認に起因することが多い¹⁾。

植物性自然毒食中毒は、平成 18 年以降当県でも 11 件発生しており²⁾、今後も様々な植物性自然毒食中毒の発生が予想される。そのため、

このような事態に対応するため、多数の自然毒を一度に分析可能な迅速一斉分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 対象自然毒成分

全国で発生した有毒植物による食中毒事例を参考³⁾に、発生件数が多いものとしてコルヒチン等 8 成分を表 1 のとおり分析対象項目として選定した。

表 1 分析対象化合物と含有植物^{4), 5)}

自然毒成分	含有植物及び誤食事例
コルヒチン	【グロリオサ】球根を山芋と誤認 【イヌサフラン】 葉をギボウシ、ギョウジャニンニクと誤認、球根をジャガイモ、タマネギと誤認
リコリン	【スイセン】葉をニラと誤認
ベラトラミン ジェルビン	【バイケイソウ】葉をオオギボウシ、ギョウジャニンニクと誤認
ソラニン チャコニン	【ジャガイモ】光の当たる場所での保管、皮付きのまま喫食
アトロピン スコポラミン	【チョウセンアサガオ】 根をゴボウ、つぼみをオクラ、葉をモロヘイヤ、アシタバ、種子をゴマと誤認 【ハシリドコロ】芽生えをフキノトウ、柔らかい葉をギボウシと誤認

2. 試料

1) 標準品 (全 8 成分)

コルヒチン、リコリン、ベラトラミン、ジェルビンは東京化成工業(株)製を、ソラニン、チャコニンはフナコシ(株)製を、アトロピン、スコポラミンは富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。

2) 試薬

アセトニトリル、メタノールは富士フィルム和光純薬(株)製 LC/MS 用、その他の試薬は、特級品を使用した。

3) 添加回収試験用試料

試料は、対象自然毒成分が検出されない生のホウレンソウを添加回収試験用試料とした。また、ホウレンソウを油で炒めたものを調理加工品 (油炒め) とした。

3. 試験溶液の調製法

藤谷の方法⁵⁾を参考に、0.1%ギ酸含有メタノール抽出を行った。

すなわち、試料を細切し、その 5g に 0.1%ギ酸含有メタノール 20mL を加えホモジナイズした後、吸引ろ過し、残渣を再度 0.1%ギ酸含有メタノール 10mL でホモジナイズ、吸引ろ過をした。0.1%ギ酸含有メタノール 5mL を用いて、刃とホモジナイザーカップ中の残留物を洗う操作を 3 回繰り返し、これらの洗液をろ液に合わせ、0.1%ギ酸含有メタノールを用いて正確に 50mL に定容した。

この溶液を 0.1%ギ酸含有メタノールで希釈し、0.2 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを LC-MS/MS 用の試験溶液とした (図 1)。

4. 標準試薬

各成分を適量採り、それぞれ 500 μ g/mL となるようにメタノールに溶解して混合標準原液とした。

5. 検量線溶液の調製

混合標準原液を 0.1%ギ酸含有メタノールで順次希釈し、5、10、25、50、100ng/mL の検量線溶液を調製した。

6. 装置及び測定条件

1) LC-MS/MS

装置：高速液体クロマトグラフ質量分析計

LC：waters社製 ACQUITY UPLC I-Class

MS：waters社製 XevoTQD

カラム：Imtakt Scherzo SM-C18

(Φ 2.0 \times 150mm、3.0 μ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相A液：10mMギ酸アンモニウム溶液

移動相B液：アセトニトリル

グラジエント条件：0-0.5min (A:B=90:10) \rightarrow

10min (A:B=60:40) \rightarrow 15-20min (A:B=20:80)

\rightarrow 20.1-25min (A:B=90:10)

流速：0.3mL/min

イオン化法：ESI (+)

測定モード：MRM

ソース温度：150 $^{\circ}$ C

脱溶媒ガス温度：500 $^{\circ}$ C

試料注入量：1.0 μ L

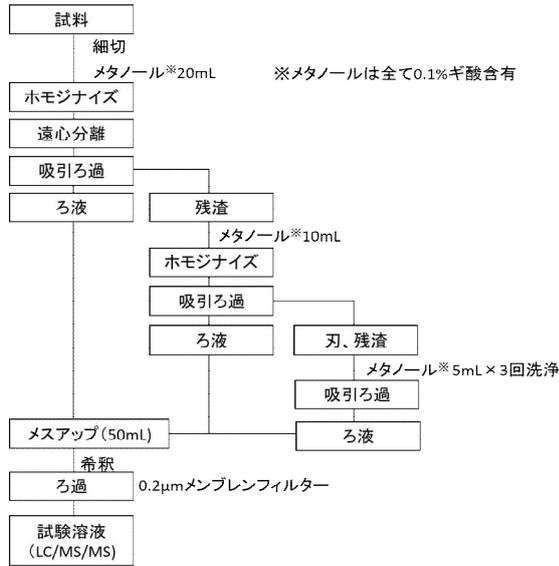


図1 試験溶液の調製方法

7. 添加回収試験

2-3) に示した試料 5.0g に対して、混合標準液（各成分が 2.0µg/g となるように調製）を添加した。添加後は、30 分放置した後に図1の試験フローに従い抽出操作を行った。

n=3 で併行試験を実施し、選択性、定量限界、回収率と相対標準偏差(RSD)を評価した。評価目標値は、厚生労働省の妥当性評価ガイドライン⁶⁾で目標値とされる回収率(真度) 70~120%、相対標準偏差 10%未満とした。

結果

1) 一斉分析条件の検討

はじめに、表1に示した各成分の標準品を用いて、これらを測定するために最適な LC-MS/MS の条件の検討を行った。この結果を表2に示す。

表2 8成分MS/MSパラメータ

成分	プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	定量	確認	Cone (V)	Coll (eV)
コルヒチン	400.1	309.8	325.9	46	24	
リコリン	288.2	118.8	146.8	50	32	
ベトララミン	410.3	83.9	295.0	62	32	
ジェルビン	426.4	113.8	108.9	62	36	
ソラニン	868.8	97.8	398.2	100	80	
チャコニン	852.7	97.8	84.8	96	76	
アトロピン	290.1	123.8	92.8	50	24	
スコポラミン	304.2	137.8	102.8	44	24	

また、設定した測定条件で分析を行ったところ、図2のとおり全成分について良好な分離となり一斉分析可能な LC-MS/MS の条件が得られた。

2) 食品試料の添加回収試験結果

2-3)の各試料に混合標準液を添加し、図1の試験フローに従い試験を実施した結果を表3に示す。生と油炒めそれぞれで真度 70~120%、相対標準偏差 10%未満を満たし、目標値を満たした。

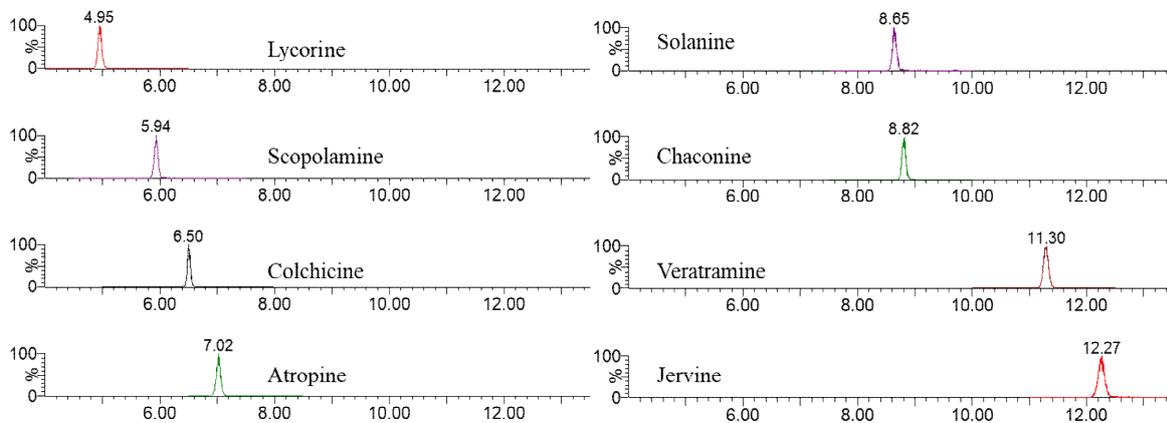


図2 8成分一斉クロマトグラム(混合標準液(各 100ng/mL))

今回は、調理加工品として油炒めを用いて行った。生の場合と比較して大きな違いはみられなかったが、醤油や塩分では正のマトリックス効果で真度が120%を超える場合もあると報告⁷⁾があるので、今後どのような調理加工検体が来ても対処できるよう、精製方法などについて更に検討していく必要があると考えられる。

表3 添加回収試験の結果

	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	ホウレンソウ			
		生(n=3)		油炒め(n=3)	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
コルヒチン	2.0	94.8	9.1	107.0	5.2
リコリン	2.0	90.6	4.3	95.3	8.8
ベトラミン	2.0	101.9	3.5	98.8	7.5
ジェルピン	2.0	103.8	5.7	100.0	4.9
ソラニン	2.0	112.7	4.2	102.1	2.9
チャコニン	2.0	106.0	3.4	91.0	8.7
アトロピン	2.0	104.8	5.0	102.2	8.4
スコポラミン	2.0	100.5	4.1	101.3	6.5

まとめ

植物性自然毒の原因となる有毒植物の迅速一斉分析の検討を行った。

添加回収試験の結果から、有毒植物中の自然毒成分の一斉分析法の検査体制を確立することができた。また、有毒植物が簡単な調理加工品（油炒め）中に含まれている場合での分析が可能となった。

当該分析法の前処理に要する時間は1件20分程度であり、精度も良好であることから、事案発生時における迅速な対応が可能となった。

今後は、どのような調理加工検体が来ても対処できるよう、精製方法などについて更に検討を進めていきたい。

文献

- 1) 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、食品衛生学会誌、55、55-63（2014）
- 2) 茨城県生活衛生課食の安全対策室ホームページ「食中毒発生状況」https://www.pref.ibaraki.jp/hokenfukushi/seiei/eisei/syokuhin_syokuchudoku.html（令和3年10月15日確認）
- 3) 厚生労働省 過去 10 年間の有毒植物による食中毒発生状況（平成 23 年～令和 2 年）https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/index.html（令和3年10月15日確認）
- 4) 厚生労働省；自然毒のリスクプロファイル、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/poison/index.html（令和3年10月15日確認）
- 5) 藤谷 圭佑：植物性自然毒の原因となる有毒植物の迅速一斉分析、浜松市保健環境研究所年報、27、40-42（2016）
- 6) 厚生労働省医薬品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 食安発第 1115001 号 平成 19 年 11 月 15 日、2007
- 7) 茶屋 真弓 他：LC/MS/MS による植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討、鹿児島県保健研究センター所報、19、67-71(2018)