

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

堀井 裕子

Validation of Simultaneous Analysis Method
for Phytotoxins in Processed Foods by LC-MS/MS

Yuko HORII

目的：植物性自然毒による食中毒は、発生件数は少ないものの過去10年間（2013～2022年）で毎年死亡例が確認されており[1]、重大な健康被害をもたらしている。富山県においては、2021年にトリカブトによる食中毒が発生し2名が救急搬送された。これは富山県の食中毒統計が残っている1956年以来初めての事例であり、今後も予期せぬ健康被害の発生時に備えて検査体制を整備することが重要である。そこで、食中毒の発生頻度が高い有毒植物に含まれる自然毒成分を対象に高速液体クロマトグラフトンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた多成分一斉分析法を検討し、検査対象が調理食品となる場合を想定して本法の性能評価をしたのでその結果を報告する。

方法：

- 1. 試料：**単一植物試料として茹でたほうれん草、生しいたけ、複数の食材を使用して調理された食品（以下、調理食品）として市販のそうざい：きのこ野菜の寄せ鍋（寄せ鍋）、レバニラの合計4種類を使用した。
- 2. 分析対象植物および自然毒成分：**分析対象は食中毒発生頻度が高い有毒植物8種類が含有する自然毒16成分とした（表1）。
- 3. 標準品および試薬等：**標準品は、リコリン：medchemexpress製、ガラントアミン：Adooq Bioscience製、コルヒチン：Focus biomolecules製、デメコルシン、アトロピン、ベラトラミン、ジェルビン、フプリフジン：Cyman chemical製、スコポラミン：Tronto Research Chemicals製、 α -ソラニン：ALDRICH製、 α -チャコニン：EXTRASYNTHESIS S.A.製を使用し、ベラトラミンとジェルビンはアセトニトリル、その他はメタノールで溶解し標準原液を調製した。アコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン、メサコニチンは富士フィルム和光純薬（株）製ブシジエステ

表1. 分析対象植物および自然毒成分

植物種	自然毒成分名
スイセン、ヒガンバナ	リコリン
スノーフレーク、タマスダレ	ガラントアミン
イヌサフラン	コルヒチン
グロリオサ	デメコルシン
チョウセンアサガオ類	アトロピン
ハシリドコロ	スコポラミン
バイケイソウ類	ベラトラミン
	ジェルビン
アジサイ、アマチャ	フプリフジン
トリカブト類	アコニチン
	ジェサコニチン
	ヒパコニチン
	メサコニチン
ジャガイモ	α -ソラニン
	α -チャコニン
ツキヨタケ	イルジンS

ルアルカロイド混合標準物質（アコニチン 0.05 mg, ジェサコニチン 0.05 mg, ヒパコニチン 0.15 mg, メサコニチン 0.1 mg の混合物）を用い、アセトニトリル 2.5 mL で溶解し、標準原液とした（アコニチン 20 μ g/mL, ジェサコニチン 20 μ g/mL, ヒパコニチン 60 μ g/mL, メサコニチン 40 μ g/mL）。イルジンSは林純薬工業（株）製の1,000 μ g/mLメタノール溶液を標準原液として用いた。

上記の標準原液を用いて、リコリン、ガラントアミン、コルヒチン、デメコルシン、アトロピン、スコポラミン、ベラトラミン、ジェルビン、フプリフジン、アコニチン、ジェサコニチンは1 μ g/mL, ヒパコニチンは3 μ g/mL, メサコニチンは2 μ g/mL, α -ソラニン, α -チャコニン, イルジンSは10 μ g/mLとなるように混合し、混合標準液（メタノール溶液）を調製した。

10% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA): TCA 10 g を水に溶解し 100 mL とした.

固相抽出カラム: Agilent 社製 Captiva EMR Lipids 300 mg (以下 EMR Lipids), Waters 社製 Oasis PRiME HLB 150 mg (以下 PRiME HLB)

メタノールおよびアセトニトリルは LC/MS 用, その他の試薬は特級を用いた. 水は milliQ-Direct 8 で精製した超純水を使用した.

4. 装置及び測定条件

(1) 装置

LC-MS/MS: 高速液体クロマトグラフ: Waters ACQUITY UPLC H-Class, 質量分析計: Waters Xevo TQ-S micro

(2) LC-MS/MS 条件

・LC 条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mmL D. × 100 mm, 1.8 μ m), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 注入量: 5 μ L, 移動相 A: 5 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 移動相 B: メタノール, グラジエント条件: A 液 99% (0 分) → 40% (3 分) → 35% (5 分) → 1% (5.5 分, 4.5 分間保持) → 99% (10 分, 5 分間保持)

・MS/MS 条件

イオン化法: ESI (+), 測定モード: SRM, キャピラリー電圧: 1.0 kV, 脱溶媒ガス流量: 600 L/hr, 脱溶媒ガス温度: 450°C, コーンガス流量: 50 L/hr, ソース温度: 150°C, 測定イオン (表 2)

5. 試験溶液調製 (図 1): 南谷の方法 [2] に準じて実施し, 詳細は既報に示した [3]. イルジン S を測定するには試験溶液を 0.2% (w/v) TCA 含有 8% (v/v) メタノール溶液でさらに 10 倍希釈した.

6. 検量線の作成: 混合標準液を 0.2% (w/v) TCA 含有 8% (v/v) メタノール溶液で希釈し, リコリン, ガランタミン, コルヒチン, デメコルシン, アトロピン, スコポラミン, ベラトラミン, ジェルビン, フブリフジン, アコニチン, ジェサコニチン 0.0005 ~ 0.02 μ g/mL, ヒパコニチン 0.0015 ~ 0.06 μ g/mL, メサコニチン 0.001 ~ 0.04 μ g/mL, α -ソラニン, α -チャコニン 0.005 ~ 0.2 μ g/mL, イルジン S 0.0005 ~ 0.01 μ g/mL の検量線用標準溶液を調製した.

7. 添加回収試験: 細切した食品試料 5 g に混合標準液を 0.5 mL 添加した. 添加濃度はリコリン, ガランタミン, コルヒチン, デメコルシン, アトロピン, スコポラミン, ベラトラミン, ジェルビン, フブリフジン, アコニチン, ジェサコニチン 0.1 μ g/g, ヒパコニチン 0.3 μ g/g, メサコニチン 0.2 μ g/g, α -ソラニン, α -チャコニン, イルジン S 1 μ g/g である. 試料は 1 種類の食品につき添加試料 5 個を調製し, 回収率および併行精度を求めた.

結果及び考察:

1. 測定条件の検討: LC 条件は南谷の方法 [4] を

表 2. 各自然毒成分の SRM 条件

自然毒成分	定量イオン m/z	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	参照イオン m/z	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
リコリン	288.2 > 147.0	25	25	288.2 > 119.0	25	35
ガランタミン	288.2 > 213.1	25	20	288.2 > 198.1	25	30
コルヒチン	400.3 > 326.1	20	24	400.3 > 310.1	20	25
デメコルシン	372.3 > 310.1	10	20	372.3 > 340.2	10	15
アトロピン	290.1 > 124.1	28	22	290.1 > 93.0	28	28
スコポラミン	304.2 > 156.1	15	15	304.2 > 138.1	15	20
ベラトラミン	410.4 > 295.3	15	30	410.4 > 114.1	15	30
ジェルビン	426.5 > 114.1	36	35	426.5 > 109.1	36	30
フブリフジン	302.1 > 120.1	12	14	302.1 > 100.0	12	22
アコニチン	646.5 > 586.5	32	30	646.5 > 105.0	32	60
ジェサコニチン	676.5 > 616.5	32	34	676.5 > 107.0	32	96
ヒパコニチン	616.5 > 556.5	36	32	616.5 > 105.0	36	64
メサコニチン	632.5 > 572.5	36	32	632.5 > 105.0	36	66
α -ソラニン	868.5 > 98.1	92	86	868.5 > 398.4	92	72
α -チャコニン	852.6 > 706.5	20	70	852.6 > 98.0	20	90
イルジン S	265.2 > 217.1	15	10	265.2 > 247.2	15	10

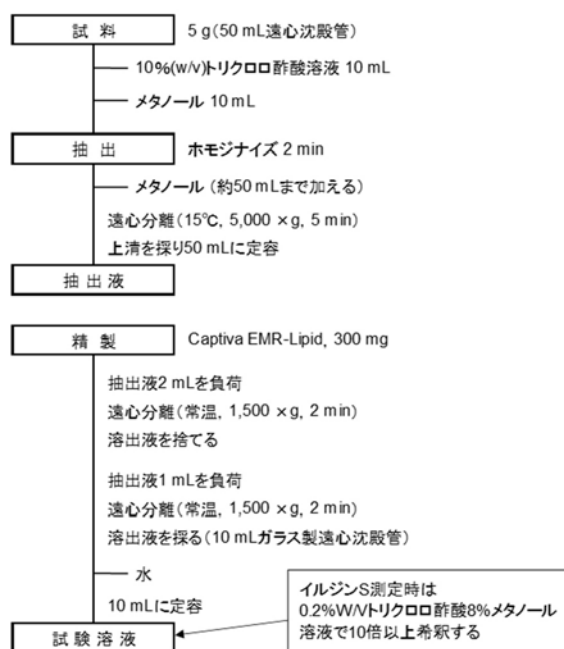


図1. 試験溶液調製法

参考に検討した。この報告ではLCの移動相に5 mM ギ酸アンモニウムとアセトニトリルを使用してスイセン、イヌサフラン等の高等植物の自然毒成分一斉分析を行っている。一方、イルジンSはこの移動相では検出できず、5 mM ギ酸アンモニウムとメタノールのグラジエント分析では良好に確認できたとし、異なる分析条件を提示している。今回はイルジンSを含めた植物性自然毒成分の一

斉分析を行うことを目的としているため、移動相については5 mM ギ酸アンモニウムとアセトニトリルまたはメタノールの2種類で測定し、ピークの検出状況を確認した。その結果、有機溶媒にメタノールを用いた場合にはすべての成分が検出されたが、既報のとおりアセトニトリルではイルジンSのみが検出できなかった。さらに、移動相の水系溶媒に酢酸アンモニウムを使用している例が報告されているため[5]、メタノールと5 mM ギ酸アンモニウムまたは5 mM 酢酸アンモニウムを移動相として標準液を測定し比較した。自然毒成分はいずれの移動相でも全て検出されたが、5 mM 酢酸アンモニウムを使用した場合には α -ソラニンの面積値は約3倍、イルジンSでは約0.5倍と検出感度が大きく異なる成分があった。今回の分析条件ではイルジンSの感度が最も低いため、イルジンSでより高い感度が得られる5 mM ギ酸アンモニウムとメタノールを移動相として用いることにした。

次にMS/MS条件の脱溶媒ガス温度について検討した。脱溶媒ガス温度を300, 350, 400, 450, 500, 550°Cに設定して標準液を測定したところ、イルジンSの面積値は300～400°Cでは変化はないが、450°C以上では温度が高くなるほど小さくなった。 α -チャコニンは450°Cで面積値が最も大きく、500°C以上では温度が高くなるほど、400°C以下では温度が低くなるほど面積値が小さくなった。その他の成分は全て550°Cで最も面積値

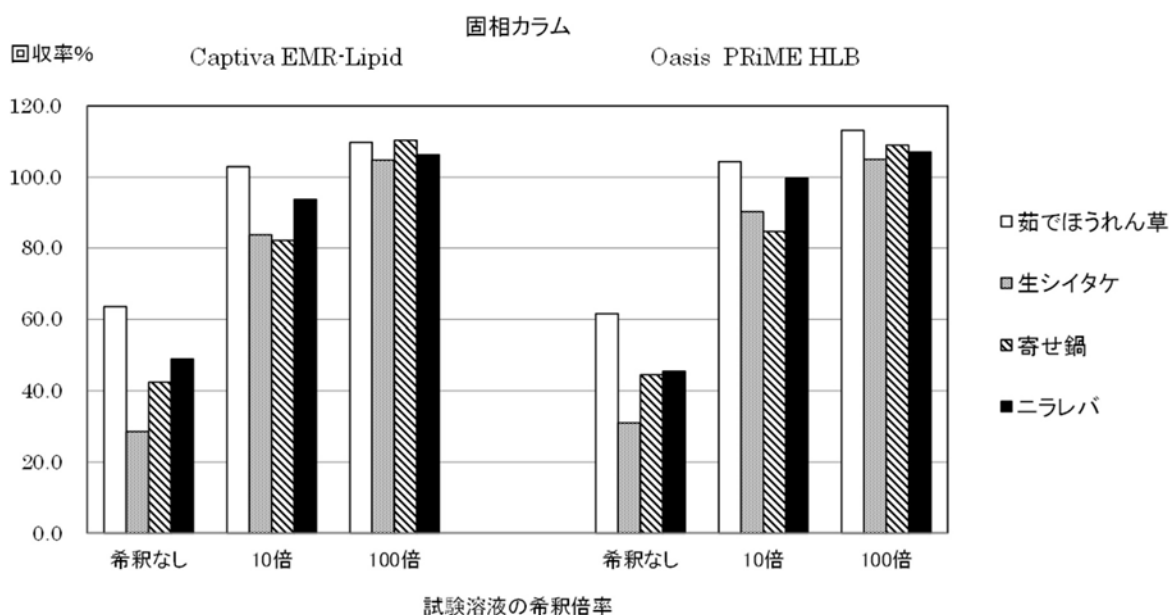


図2. 食品試料の試験溶液に添加したイルジンSの回収率

が大きく、温度が低くなるにつれて面積値も小さくなった。この結果から脱溶媒ガス温度は全ての成分の検出に最適な450℃とした。

2. 試験溶液調製法の検討：今回の検討では、単一の植物から油などで調理された食品まで、幅広い検査対象食品に対応できる分析法を確立することを目標にしている。そこで、ギョウザやカレーを対象とした場合に良好な結果が得られている南谷の方法 [2] に従って4種類の食品の抽出液を調製した。南谷はこの抽出液を固相カラム EMR Lipids で精製して試験溶液を調製しているが、脂質等の除去ができることから調理食品に有用と考えられた PRiME HLB も使用し、2種類で比較した。

4種類の食品試料から EMR Lipids を用いて調製した試験溶液からは、全ての試料において自然毒成分は検出されなかった。次にこれらの試験溶液に混合標準液を添加（添加濃度は添加回収試験と同濃度）して測定したところ、全ての添加溶液でイルジン S の回収率が70%未満と低い値であった（図2）。その他の成分は全て回収率が70%以上であった。LC-MS/MSによる分析では目的成分がイオン化されるときに、試験溶液中の夾雑成分の影響で目的成分のイオン化が抑制又は促進され、定量値が真値を示さないことがある。この対策として山口らは、試験溶液を希釈することで夾

雑成分の影響を減少させることができることを報告している [6]。そこで、先の試験溶液を0.2% (w/v) TCA 含有8% (v/v) メタノール溶液で10倍および100倍に希釈し、これらに混合標準液を添加してイルジン S の回収率を確認した（図2）。試験溶液を10倍希釈して標準液を添加した溶液では、全ての食品試料で回収率が70%以上となり、100倍希釈ではさらに回収率が向上した。この結果は PRiME HLB を用いて調製した試験溶液でも同様であった。このように、ほとんどの対象成分は夾雑成分の影響を受けず良好に測定できるが、イルジン S のみは試験溶液を10倍以上希釈する必要があることが示された。この結果はいずれの固相カラムを使用しても同様で、特に PRiME HLB に優位性はなかった。そこで、試験溶液調製には南谷の方法のとおり固相カラムは EMR Lipids を採用し、イルジン S を測定する場合は試験溶液を10倍以上希釈することとした。

3. 添加回収試験：4種類の食品に混合標準液を添加し、試験溶液調製法に従って試験溶液を調製した。イルジン S については試験溶液を10倍希釈して測定した。各食品における自然毒成分の回収率及び併行精度を表3に示す。イルジン S を除く各成分は全ての食品で回収率70%以上、併行精度10%未満であり、良好な結果であった。イルジン S は茹でほうれん草で回収率が64%とやや低く、

表3. 各試料における添加回収試験結果 (n=5)

自然毒成分	食品							
	茹でほうれん草		生シイタケ		寄せ鍋		ニラレバ	
	回収率 %	併行精度 RSD%	回収率 %	併行精度 RSD%	回収率 %	併行精度 RSD%	回収率 %	併行精度 RSD%
リコリン	77.4	3.3	85.0	2.6	85.9	4.1	82.8	1.2
ガラントミン	75.2	2.5	87.9	5.1	91.6	2.3	85.8	4.1
コルヒチン	80.2	8.3	87.8	4.3	87.9	9.3	79.9	5.9
デメコルシン	77.1	6.0	93.5	2.0	84.7	4.0	81.0	9.6
アトロピン	75.3	2.0	88.9	5.1	86.8	4.3	85.2	6.4
スコボラミン	76.8	2.5	88.3	4.2	89.8	3.7	87.6	3.6
ペラトラミン	71.4	6.5	92.0	3.3	93.1	2.1	90.3	2.1
ジェルビン	74.3	7.3	81.8	6.8	85.7	6.4	91.1	4.5
フプリフジン	73.5	3.9	82.9	7.3	89.0	2.1	81.3	8.9
アコニチン	76.4	6.3	95.1	4.4	86.6	4.1	89.6	2.7
ジェサコニチン	76.3	6.5	89.4	1.6	90.8	6.6	92.4	2.3
ヒバコニチン	79.9	5.0	91.7	3.0	90.5	3.2	93.3	4.2
メサコニチン	79.3	2.5	94.2	5.0	91.1	5.4	92.9	4.4
α-ソラニン	92.9	8.0	100.0	3.0	88.2	3.3	100.2	1.5
α-チャコニン	76.0	2.6	88.0	3.6	86.3	6.0	91.4	3.7
イルジンS*	64.3	15.1	75.9	19.8	77.7	7.7	84.6	9.8

* イルジンSは試験溶液を10倍希釈して測定

併行精度は茹でほうれん草 15.1%, 生シイタケ 19.8%とやや高い値であった。回収率, 併行精度の目標値について, 厚生労働省の事務連絡 [7] で, 健康被害防止の観点から開発される農薬等の混入を検出する検査法では回収率 50~200%, 併行精度 30%未満と示されている。今回検討した検査法は食中毒発生時の検査を想定していることから, この目標値を参考に評価し, 全ての成分が目標値を満たすことを確認した。

まとめ: 植物性自然毒による食中毒発生に備え, LC-MS/MSを用いた植物性自然毒の多成分一斉分析法を検討し, 食品試料での添加回収試験を実施した。その結果, 検討した検査法は, 単一の植物だけでなく調理食品についても適用可能であることが示された。今後は今回整備した検査法を用いて, 自然毒食中毒による健康危機発生時に迅速な対応をしていきたい。

文 献

1. 厚生労働省, 食中毒統計資料, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2023 年 5 月 29 日アクセス可能)
2. 南谷臣昭. (2019). 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: 令和元年度総括・分担研究報告書 (研究代表者: 登田美桜) 10-78
3. 堀井裕子, 中山恵理子 (2022). 富山衛研年報, 45, 104-106
4. 南谷臣昭. (2018). 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: 平成 30 年度総括・分担研究報告書 (研究代表者: 登田美桜) 9-30
5. 設楽紘史, 永山矩美子, 神田典子. (2017). さいたま市健康科学研究センター年報, 11, 134-137
6. 山口奈穂, 富永純司, 松本理世, 他. (2017). 熊本県保健環境科学研究所報, 47, 48-54
7. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡: 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, 平成 25 年 3 月 26 日