

HPLCおよびLC-MS/MSによるじゃがいも中の α -ソラニン, α -チャコニン測定法の検討

堀井 裕子

Determination of α -Solanin and α -Chaconine in Potatoes by HPLC and LC-MS/MS

Yuko HORII

目的: α -ソラニン, α -チャコニンはジャガイモに含まれるグリコアルカロイドであり, 芽, 皮部分に多く含まれている。これらアルカロイドは緑化したものや未熟なジャガイモに特に含有量が多く, このようなジャガイモの摂取で嘔吐, 下痢, 腹痛などの食中毒症状を示す。厚生労働省の食中毒発生事例によるとジャガイモによる食中毒は全国ではほぼ毎年, 主に学校で発生し, 2017 ~ 2019年の3年間に4件の事例が報告されている。

このようなことから, 当県においても健康危機発生時における検査体制の確保が重要と考え, ジャガイモ食中毒の原因物質である α -ソラニン, α -チャコニン測定法の検討を行なったのでその結果を報告する。

方法:

1. 試料: 試料として生のじゃがいも (以下, 生いも), 茹でたじゃがいも (茹でいも), 市販のフライドポテト (フライドポテト) の3形状のジャガイモについて検討した。

2. 標準品および試薬等: α -ソラニン標準品はSigma社製を, α -チャコニン標準品はEXTRASYNTHESIS社製を用いた。各標準原液は標準品 5 mg を正確に量り採り, メタノールで正確に 10 mL とした。(500 μ g/mL)

0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0): リン酸二水素ナトリウム二水和物 9.6 g およびリン酸水素二ナトリウム十二水和物 14.0 g を水に溶解し 500 mL とし, pH7.0 に調整した。

固相抽出カラム: Waters 社製 Sep-Pak Plus C18 (360 mg) は, あらかじめメタノールおよび水各 10 mL でコンディショニングして使用した。Sep-Pak Plus NH2 はアセトニトリル 10 mL でコンディショニングをして用いた。

メタノールおよびアセトニトリルはHPLC 用ま

たは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。

3. 装置及び測定条件

(1) 装置

HPLC: 島津高速液体クロマトグラフシステム (ポンプ: LC-10ADvp, フォトダイオードアレイ検出器 (PDA): SPD-M10Avp, インジェクター: SIL-10ADvp, カラムオープン: CTO-6A, デガッサー: DGU-2A, システムコントローラー: SCL-10Avp, データ処理: CLASS-VP)

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

(2) HPLC 条件

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 5 μ m), 移動相: アセトニトリル - 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) - 水 (130 : 7 : 63), カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 検出器: PDA (測定波長 190 ~ 370 nm, 定量 205 nm), 注入量 50 μ L

(3) LC-MS/MS 条件

・LC 条件

カラム: AQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm i.d. $\times$ 100 mm, 1.8 μ m), カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 10 μ L, 移動相 A: 0.02% ギ酸水溶液, 移動相 B: アセトニトリル, グラジエント条件: A 液 80% (0 分) $\rightarrow$ 70% (7 分) $\rightarrow$ 5% (8 分, 2 分間保持) $\rightarrow$ 80% (10 分, 5 分間保持)

・MS/MS 条件

イオン化法: ESI (+), 測定モード: MRM, 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: 500 $^{\circ}$ C, コーンガス流量: 50 L/hr, ソース温度: 150 $^{\circ}$ C, 測定イオン: α -ソラニン プリカーサーイオン m/z 868.5 (コーン電圧 92 V), プロダクトイオン 定量 m/z

98.1 (コリジョンエネルギー 86 eV), 参照 m/z 398.4 (72 eV), α -チャコニン プリカーサーイオン m/z 852.5 (コーン電圧 20 V), プロダクトイオン 定量 m/z 98.1 (コリジョンエネルギー 88 eV), 参照 m/z 706.6 (70 eV).

4. 試験溶液調製：試験溶液は衛生試験法注解[1]を参考に、一部変更して以下の通り実施した(図1)。生いもは粉碎機で粉碎し、茹でいも、フライドポテトは包丁で細切し、その5 gを採取した。採取した試料にメタノール 30 mLを加えてホモジナイズし、吸引ろ過後、メタノールを加えて全量を50 mLとした。このメタノール抽出液 5 mLをとり、水 12 mLを加えて混合し、固相抽出カラム：Sep-Pak Plus C18に負荷した。続いて30%メタノール 5 mLで洗浄し、メタノール 15 mLで溶出した。得られたメタノール溶出液を減圧下で溶媒を留去後、残留物をメタノール 1 mLに溶かしHPLC用試験溶液(図中試験溶液①)とした。フライドポテトについては引き続き以下の操作を行った。先の試験溶液① 1 mLにアセトニトリル 19 mLを加えて混合し、固相抽出カラム：Sep-Pak Plus NH2に負荷した。続いてアセトニトリル 5 mLで洗浄し、メタノール 10 mLで溶出した。得られたメタノール溶出液を減圧下で溶媒を留去し、残留物をメタノール 1 mLに溶かしてHPLC用試験溶液(図中試験溶液②)とした。LC-MS/MS測定用試験溶液はHPLC用試験溶液をメタノールでさらに2000倍に希釈したものとした。

5. 検量線の作成： α -ソラニン、 α -チャコニン標準原液を混合して、さらにメタノールで希釈し、HPLC測定用には1, 4, 10, 20, 50 mg/L, LC-MS/MS測定用には0.0001, 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 mg/Lの検量線用標準溶液を調製した。

結果及び考察：

1. 測定条件の検討：HPLC法についてははじめに衛生試験法[1]の測定条件を参考に、分析カラムに順相カラムのInertSustain NH2 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μ m)を、移動相にアセトニトリル-リン酸緩衝液(pH3)を用いて条件の検討を行った。その結果、標準液では α -ソラニンと α -チャコニンは分離可能で、良好なピークが得られた。しかし、生イモから抽出した試験溶液を測定したところ、 α -ソラニンと α -チャコニンのピークにはともに試料由来成分による妨害が見ら

試料 5g
 |メタノール 30mL
 |ホモジナイズ 2分
 |吸引ろ過
 ろ液
 |メタノールで50mL定容
 抽出液 5mL
 |水12mLを加え希釈
 Sep Pak Plus C18 cartridge
 |30%メタノール洗浄 5mL
 |メタノール溶出 15mL
 溶出液
 |溶媒留去
 残留物
 |メタノール 1mL
 試験溶液①
 |アセトニトリル 19mL
 混合液
 |
 Sep Pak Plus NH2 cartridge
 |アセトニトリル洗浄 5mL
 |メタノール溶出 10mL
 溶出液
 |溶媒留去
 残留物
 |メタノール 1mL
 試験溶液②

図1. 試験溶液調整法

れた。さらに、測定を繰り返すに従って目的成分および妨害成分の保持時間が徐々に移動して分離状況が変わり、安定した測定が困難であった。そこで、逆相カラムによる測定例[2]を参考に、カラムをInertsil ODS-2、移動相はアセトニトリル-リン酸緩衝液(pH7.0)に変更して条件の検討を行ったところ、 α -ソラニンと α -チャコニンは良好なピーク形状を示し、保持時間の変動や妨害成分の影響もなく安定した分析が可能であった。このためHPLC測定には逆相カラムを用いた条件を採用した。

LC/MS/MS法については西川ら[3]の報告を参考に、逆相カラムを使用し、0.02%ギ酸とアセトニトリルによるグラジエント条件を作成した。 α -ソラニンと α -チャコニンの質量分析条件についてはインフュージョンにより最適な測定イオンを検討し、プリカーサーイオンにはいずれもプロ

トン化分子である m/z 868.5 (α -ソラニン), m/z 852.5 (α -チャコニン) を, 定量用プロダクトイオンには m/z 98.1 (α -ソラニン, α -チャコニン) を選定した.

2. 試験溶液調製の検討: 試料から α -ソラニン, α -チャコニンを抽出する溶媒 [1, 4] および抽出方法 [1, 4, 5] については数種類の報告がある. そこで試料に最適な抽出条件を設定するために, 抽出溶媒 2 種類 (メタノールと 5% 酢酸) および抽出方法 3 種類 (ホモジナイズ, 超音波, 振とう) について比較検討を行った.

抽出の操作性を確認するために, 生いも, 茹いも, フライドポテト 5 g を 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に各 6 本採取した. 3 本にメタノール, 残り 3 本に 5% 酢酸をそれぞれ 30 mL 加え, 各溶媒についてホモジナイズ 2 分, 超音波 (Branson 出力 125 W) 15 分, 振とう 15 分の 3 種類の抽出方法を実施した. その結果, 生いも, フライドポテトはいずれの抽出溶媒および抽出方法においても試料と溶媒は十分に混和した. 一方, 茹いもは超音波や振とう抽出では, メタノール, 5% 酢酸の両溶媒で試料の分散が不十分で試料が塊となって残った. ホモジナイズ抽出ではどちらの抽出溶媒でも混和した. これらのことから, 抽出方法はホモジナイズを採用した.

次に, メタノールと 5% 酢酸による α -ソラニン, α -チャコニン抽出量の比較を行うために, これらを高濃度に含有すると報告されている [6] ジャガイモの品種, メーカーを試料として測定を行った. 生メーカーを粉砕機で粉砕したものを容器に採り, 抽出溶媒としてメタノールまたは 5% 酢酸を加えたもの (各 $n=3$ で実施) をホモジナイズ抽出し, 以下, 試験溶液調製法に従った. 2 種類の溶媒で試験溶液を調製したときに, メタノールでは操作に問題はなかったが, 5% 酢酸では抽出液を吸引ろ過する工程でろ紙が目詰まりし, ろ液の回収が不良であった. 調製した試験溶液を測定したところ (表 1), α -ソラニン, α -チャコニ

ン濃度は 2 種の抽出溶媒で有意な差はないものの, メタノールに比べて 5% 酢酸抽出のほうが低い値を示したため, 抽出溶媒はメタノールを選択した.

抽出溶液の精製・濃縮操作については衛生試験法を参考に実施した. 衛生試験法では C18 固相抽出カラムによる精製を行っており, 負荷する試料溶液および洗浄溶媒のメタノール濃度は 40% としている. しかし, 新藤ら [7] はメタノール濃度 40% では固相から目的成分の一部が溶出し, 30% では良好な回収が得られたと報告している. そこで, 試料溶液と洗浄溶媒はともにメタノール濃度が 30% になるように調製し精製を行った. また, 試料について, ジャがいもなどの一般食品は C18 固相抽出カラムのみによる精製試験溶液 (図 1 の試験溶液①) で HPLC 測定することとなっているが, フライドポテトなどの油脂性試料についてはさらに NH₂ 固相抽出カラムによる精製を行うことになっている (図 1 の試験溶液②). 今回, フライドポテトについて HPLC 法で測定を行ったところ, 試験溶液①では α -ソラニン付近に妨害ピークがみられたが, 試験溶液②ではみられず, 油脂性食品については NH₂ 固相抽出カラムによる精製が必要であることが確認された.

この方法による定量限界は試料当たり, HPLC 法では 2 mg/kg, LC-MS/MS 法では 0.0002 mg/kg であった.

日本中毒情報センターによると, ジャがいもによる食中毒は, ソラニンやチャコニンなどのグリコアルカロイド全体の量として成人では 200 ~ 400 mg, 小児では 15.6 ~ 40 mg で発症するとされている. 小児において, 食中毒が発生する可能性のある 15 mg のグリコアルカロイドを摂取するには, それらの濃度が 150 mg/kg のジャがいもを 100 g 食べることになる. この濃度は HPLC 法の定量下限値に比べて十分大きく, 汎用的な装置で測定を行うことができるが, 一方で, HPLC 法は妨害ピークの影響を受けやすいという欠点がある. 今回のフライドポテトの測定においても HPLC 法では固相抽出カラムを 2 種類使用して精製する必要があった. しかし, LC-MS/MS 法で固相抽出カラム 1 種類のみで精製した試験溶液①の測定を試みたところ, 妨害ピークなく測定することができた. このように, 妨害成分が多いと考えられる加工度の高い食品を試料として測定する場合には, 選択性の高い LC-MS/MS 法の使用が有用であると考えられる.

表 1. 2 種類の抽出溶媒における α -ソラニン, α -チャコニン抽出量

抽出溶媒	α -ソラニン(mg/kg)		α -チャコニン(mg/kg)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
メタノール	293	21.1	341	22.2
5% 酢酸	274	14.9	308	16.0
n=3				

表 2. 各試料における添加回収試験結果

	HPLC法						LC/MS/MS法					
	生いも		茹でいも		フライドポテト		生いも		茹でいも		フライドポテト	
	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度	真度	併行精度
	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%	回収率%	RSD%
α -ソラニン	76.8	5.6	89.6	5.0	84.8	9.1	70.1	3.9	67.3	7.5	69.3	8.8
α -チャコニン	84.9	4.4	85.3	4.7	83.0	8.5	73.3	2.3	70.8	7.0	72.7	7.0

各n=3で実施

3. 添加回収試験：皮を含む表面を厚さ5～7 mm程度取り除いた生いも、同様に表面を取り除いた茹でいも、フライドポテト（各 n=3 で実施）に α -ソラニン、 α -チャコニンの各標準原液を50 mg/kg になるように添加し、試験溶液調製操作に従って回収試験を行った（表2）。その結果、HPLC 法では α -ソラニンの回収率76.8～89.6 %（併行精度5.0～9.1 %）、 α -チャコニンは回収率83.0～85.3 %（4.4～8.5 %）、LC-MS/MS 法では α -ソラニン回収率67.3～70.1 %（併行精度3.9～8.8 %）、 α -チャコニン回収率70.8～73.3 %（2.3～7.0 %）であり、ジャガイモ食中毒発生時の検査方法として使用可能であると考えられる。

文 献

1. 衛生試験法・注解 2015（日本薬学会編），277～279，金原出版
2. 折口菜都希，柚田有加，安藤尚子，他. (2014). 奈良県保健環境センター年報，49，59～60
3. 西川 徹，川口喜之，村上正文（2006）. 長崎県衛生公害研究所報，52，11～13
4. 浅野正博，後藤直子，一色賢司（1996）. 日本食品化学工学会誌，43(5)，593～597
5. 澤崎加奈恵，山岸 浩，青木保憲（2014）. 福井県衛生環境研究センター年報，13，102～103.
6. 下井俊子，牛山博文，観 公子，他. (2007). 食品衛生学雑誌，48(3)，77～82
7. 新藤哲也，牛山博文，観 公子，他. (2004). 食品衛生学雑誌，45(5)，277～282