

〔資料〕

LC-MS/MSを用いた植物性自然毒の一斉分析

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 竹田 正美・小澤 祐子・山森 泰大
石川県健康福祉部 健康推進課 松 榮 美希

〔和文要旨〕

植物性自然毒による食中毒発生時、迅速に原因植物を究明するため、誤食による食中毒の発生件数が多い6植物が含有する14種類の有毒成分を対象として、LC-MS/MSを用いた一斉分析法の検討を行った。調理食品を用いて添加回収試験を実施したところ、回収率、精度ともに良好な結果が得られ、本法が緊急時の迅速分析法として有効であると考えられた。また、本法を用いて、イヌサフラン、グロリオサ、ジャガイモ、スイセン、バイケイソウについて有毒成分の含有量の測定を行い、植物性自然毒による食中毒発生時に参考となるデータが得られた。

キーワード：植物性自然毒、一斉分析、LC-MS/MS

1 はじめに

有毒植物の誤食による食中毒は、全国的に発生しており毎年死亡事例も報告されている¹⁾。植物性自然毒が原因と疑われる食中毒発生時には迅速な原因植物の特定が求められるが、植物の形態による鑑別には熟練した知識を要し、調理等により原形をとどめていないため判別できない場合もある。

そこで、植物性自然毒が原因と疑われる食中毒発生時に、植物や調理残品中の有毒成分を迅速に検出し原因植物を特定するため、LC-MS/MSを用いた植物性自然毒の一斉分析法の検討を行った。また、この方法を用いて、誤食による食中毒事例が多い5植物について有毒成分の含有量を調査したので、その結果を併せて報告する。

2 材料と方法

2.1 試料

(1) 添加回収試験

ホウレンソウのお浸し：ホウレンソウを沸騰させた水1Lで約1分茹でて調整した。

ニラと卵の炒め物：フライパンに油5gをひいて加熱後、

ニラ100gと卵100gを加え炒めて調整した。

(2) 有毒植物

イヌサフラン(葉、球根)、グロリオサ(球根)、ジャガイモ、スイセン(葉、鱗茎)、バイケイソウ(葉の塩づけ)

2.2 分析対象成分

食中毒事例が多い6植物¹⁾に含有され、標準物質が入手できた14成分を対象とした(表1)。

表1 有毒植物と分析対象成分

| 有毒植物名 | 成分名 |
|--------|---|
| イヌサフラン | コルヒチン |
| グロリオサ | デメコルシン |
| ジャガイモ | α-ソラニン α-チャコニン |
| スイセン | ガラタミン リコリン |
| トリカブト | アコニチン ジュサコニチン ヒパコニチン メサコニチン |
| バイケイソウ | ジェルピン プロトベラトリンA プロトベラトリンB ベラトラミン |

Simultaneous Analysis of Phytotoxins by LC-MS/MS. by TAKEDA Masami, OZAWA Yuko, YAMAMORI Yasuhiro (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science), MATSUE Miki (Health Promotion Division, Health and Welfare Department, Ishikawa Prefecture)

Key words : Phytotoxin, Simultaneous Analysis, LC-MS/MS

2・3 試薬等

アコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチンおよびメサコニチンの標準品として、ブシジエステルアルカロイド混合標準物質（富士フィルム和光純薬(株)製）を使用した。プロトベラトリンBの標準液は岐阜県保健環境研究所から譲渡されたものを使用した。その他の標準品は、富士フィルム和光純薬(株)、Sigma-Aldrich、東京化成工業(株)または関東化学(株)製を使用した。

抽出に使用したメタノールはHPLC用、LC移動相に使用したメタノールおよびギ酸はLC-MS用、その他の試薬は特級（全て富士フィルム和光純薬(株)製）を用いた。水は、超純水を使用した。

精製にはAgilent Technologies社製のCaptiva EMR-Lipid (3mL, 300mg)を使用した。メンブレンフィルターはSartorius製Minisart RC4 0.2μmを用いた。

2・4 標準溶液の調製

ブシジエステルアルカロイド混合標準物質0.35mgをアセトニトリル5mLに溶解し標準原液とした（アコニチン10μg/mL、ジェサコニチン10μg/mL、ヒパコニチン30μg/mL、メサコニチン20μg/mL）。その他標準品は、メタノールで溶解して標準原液を調製した。これら標準原液を混合しメタノールで希釈して各1μg/mL（ヒパコニチン3μg/mL、メサコニチン2μg/mL）の混合標準液を調製した。

検量線用標準溶液は混合標準液を0.2% (w/v) トリクロロ酢酸含有8% (v/v) メタノール溶液で適時希釈して調製した。

2・5 装置および測定条件

液体クロマトグラフはAgilent製1260 Infinityを、質量分析計はAgilent製6460 Triple Quad LC/MSDを使

用し、測定条件は表2および表3に示した。

表2 LC-MS/MS測定条件

| | |
|----------|---|
| カラム | Agilent製 Poroshell 120 EC-C18 (内径2.1mm, 長さ100mm, 粒径2.7μm) |
| カラム温度 | 40℃ |
| 移動相 | A : 0.1%ギ酸含有5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール |
| 流量 | 0.3mL/min |
| グラジエント条件 | B : 2%(0-2min)→60%(5min)→90%(11-12min)→2%(12.01-20min) |
| 注入量 | 5μL |
| イオン化法 | ESI ポジティブ |
| ドライガス | N ₂ , 300℃, 10mL/min |
| ネブライザー | N ₂ , 50psi |
| シースガス | N ₂ , 200℃, 11mL/min |
| キャピラリー電圧 | 3000V |
| 測定モード | MRM (多重反応モニタリング) |

2・6 試験溶液の調製

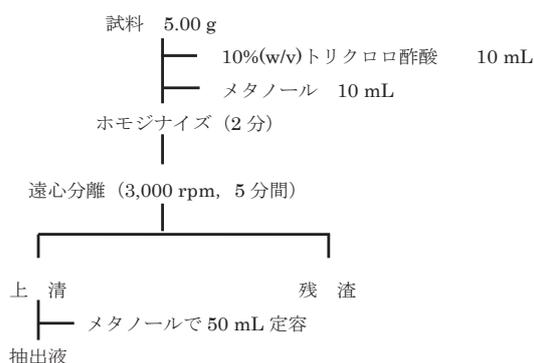
南谷らの報告²⁾を参考に図1に示す方法で行った。

試料5.00gを50mLのポリプロピレン製遠沈管にはかりとり、10% (w/v) トリクロロ酢酸溶液10mLおよびメタノール10mLを加えて2分間ホモジナイズした後、遠心分離 (3,000rpm, 5分間) し、上清を採りメタノールで50mLに定容した。ガラス製の遠沈管にセットしたCaptiva EMR-Lipid に抽出液2mLを負荷し、2,500rpmで1分間遠心分離し、溶出液は廃棄した。さらに抽出液1mLを負荷し、同様に遠心分離して得られた溶出液を採り、水を加えて10mLに定容し、0.2μmメンブレンフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

表3 保持時間およびMRM条件

| 成分名 | 保持時間 (分) | フラグメン ター電圧 (V) | プリカーサ イオン (m/z) | 定量イオン | | 確認イオン | |
|-----------|-------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | | プロダクト イオン (m/z) | コリジョン エネルギー (V) | プロダクト イオン (m/z) | コリジョン エネルギー (V) |
| リコリン | 3.26 | 170 | 288.1 | 147.0 | 29 | 119.0 | 41 |
| ガランタミン | 3.75 | 130 | 288.2 | 213.0 | 21 | 198.0 | 33 |
| デメコルシン | 6.11 | 120 | 372.2 | 340.1 | 13 | 310.0 | 21 |
| プロトベラトリンB | 6.99 | 250 | 810.4 | 792.3 | 49 | 658.3 | 58 |
| コルヒチン | 7.08 | 170 | 400.2 | 358.1 | 21 | 310.1 | 25 |
| α-チャコニン | 7.34 | 270 | 852.5 | 98.1 | 114 | 398.4 | 90 |
| α-ソラニン | 7.34 | 380 | 868.5 | 98.1 | 102 | 398.3 | 90 |
| メサコニチン | 7.34 | 210 | 632.3 | 572.2 | 33 | 354.1 | 49 |
| ジェルビン | 7.36 | 210 | 426.3 | 114.1 | 37 | 109.1 | 41 |
| ヒパコニチン | 7.49 | 170 | 616.3 | 556.2 | 33 | 338.1 | 45 |
| プロトベラトリンA | 7.53 | 250 | 794.4 | 776.3 | 45 | 658.3 | 50 |
| アコニチン | 7.54 | 250 | 646.3 | 586.2 | 37 | 368.2 | 49 |
| ベラトラミン | 7.62 | 170 | 410.3 | 295.1 | 33 | 84.2 | 37 |
| ジェサコニチン | 7.63 | 210 | 676.3 | 135.0 | 55 | 616.3 | 37 |

抽出



精製

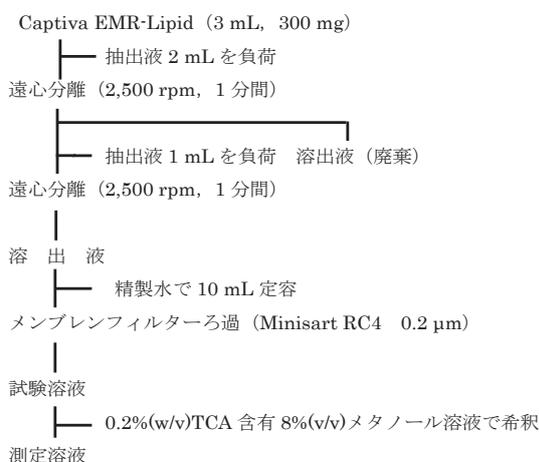


図 1 試験法フロー

2・7 添加回収試験

ホウレンソウのお浸しとニラと卵の炒め物に、表 4 に示した 8 成分を試料中濃度が $1 \mu\text{g/g}$ となるように添加し、5 併行で試験を実施した。

本分析は、食中毒発生時に迅速に有毒成分を検出することを目的とするため、「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法」³⁾の評価基準を参考に目標値を、回収率は 50～200%，併行精度 (RSD%) は 30% 未満とした。

2・8 有毒植物中の有毒成分含有量

誤食による食中毒の発生件数が多く、検体が入手できた 5 植物 (イヌサフラン、グロリオサ、ジャガイモ、スイセン、バイケイソウ) について図 1 に示す方法に従って試験溶液を調整し LC-MS/MS で有毒成分を測定した。

3 結果と考察

3・1 LC-MS/MS 測定条件の検討

対象成分の MRM 条件は、機器付属の最適化ソフト MassHunter Optimizer により最適化した。プロダクトイオンのうちもっとも感度が高いものを定量用、次を確認用とした。

LC 条件について、緊急時に迅速に対応できるよう当

表 4 添加回収試験結果

| 成分名 | ホウレンソウのお浸し | | ニラと卵の炒め物 | |
|-----------------|------------|-------------|----------|-------------|
| | 回収率 (%) | 併行精度 (RSD%) | 回収率 (%) | 併行精度 (RSD%) |
| コルヒチン | 83.5 | 4.2 | 80.9 | 0.6 |
| α -ソラニン | 121.6 | 6.0 | 120.0 | 2.5 |
| α -チャコニン | 86.9 | 2.6 | 86.0 | 1.6 |
| ガラントミン | 80.7 | 3.3 | 85.2 | 0.8 |
| リコリン | 79.5 | 2.8 | 80.5 | 0.9 |
| ジェルビン | 70.5 | 2.4 | 71.4 | 3.3 |
| プロトベラトリン A | 82.4 | 1.4 | 74.7 | 3.1 |
| ベラトラミン | 75.0 | 1.5 | 74.0 | 1.9 |

センターで通常残留農薬分析に使用している分析カラムおよび移動相を用いて検討を行った。その結果、図 2 に示すように、分析時間が 20 分間で 14 成分について良好な分離とピーク形状が得られた。

3・2 添加回収試験

添加回収試験の結果を表 4 に示す。回収率は 70.5～121.6%，併行精度 (RSD%) 0.6～6.0% で、評価基準を満たし良好な結果となった。

本法は調理品にも適用可能で、前処理に要する時間も、1 時間程度と緊急時の迅速分析法として有効であると考えられる。

3・3 植物中の有毒成分含有量

植物性自然毒が疑われる食中毒が発生した際の参考とするため、誤食による食中毒が多い植物について、含有する有毒成分を測定した。各植物から検出された成分とその量を表 5 に示す。

(1) イヌサフラン、グロリオサ

イヌサフランとグロリオサはいずれもイヌサフラン科の園芸植物で、有毒成分としてコルヒチンやデメコルシンを含有しており、過去 10 年間 (2013～2022) にこれらの植物が原因の食中毒で併せて 15 名が死亡している¹⁾。ヒトの最小致死量は体重 50kg の場合、コルヒチンは 4.3mg 程度⁴⁾ で、コルヒチンより弱いデメコルシンも毒性があるとされている。

当センターで栽培したイヌサフランからコルヒチンとデメコルシンが検出され、葉約 80g、球根約 20g に最小致死量のコルヒチンを含有していた。また、市販のグロリオサの球根についてはデメコルシンは検出されなかったが、球根約 5g に最小致死量相当のコルヒチンが含有していた。

イヌサフランとグロリオサは、いずれも通常の喫食量でも致死量に達する有毒成分を含有している可能性があり誤食により、死亡する危険性が高いと考えられる。

(2) ジャガイモ

ジャガイモには、ソラニンやチャコニンなどのグリコアルカロイドが含まれており、そのうち 3～8 割が皮の

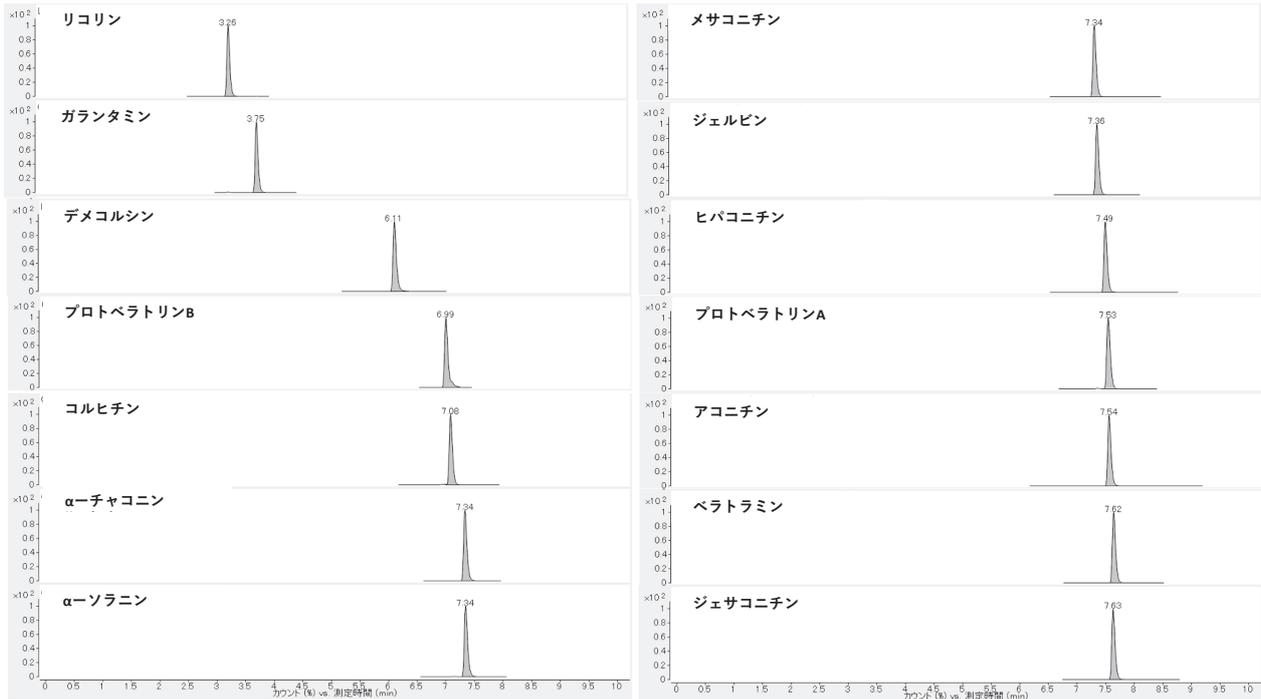


図2 14成分のクロマトグラム (ヒバコニチン30ng/mL, メサコニチン20ng/mL, 他10ng/mL)

表5 各植物に含まれる有毒成分

| 試料 | | 成分名 (含有量 (μg/g)) | | 参考 |
|---------------|-------|--------------------|-----------------|--------------|
| 植物名 | 部位 | | | |
| イヌサフラン | 葉 | コルヒチン (51.3) | デメコルシン (47.0) | |
| | 球根 | コルヒチン (219.7) | デメコルシン (230.8) | 球根重量 37.2g/個 |
| | 球根 | コルヒチン (201.2) | デメコルシン (245.9) | 球根重量 14.9g/個 |
| グロリオサ | 球根 | コルヒチン (1014.5) | デメコルシン (ND) | 球根重量 11.6g/個 |
| | 球根 | コルヒチン (813.0) | デメコルシン (ND) | 球根重量 12.9g/個 |
| ジャガイモ (メークイン) | 皮層部*1 | α-ソラニン (267.6) | α-チャコニン (227.6) | |
| | 髄質部*2 | α-ソラニン (19.1) | α-チャコニン (20.6) | |
| ジャガイモ (きたかむい) | 皮層部*1 | α-ソラニン (93.0) | α-チャコニン (136.7) | |
| | 髄質部*2 | α-ソラニン (2.4) | α-チャコニン (1.9) | |
| ニホンスイセン | 葉 | ガランタミン (3.5) | リコリン (24.5) | |
| | 鱗茎 | ガランタミン (1.2) | リコリン (180.1) | |
| ラップスイセン | 葉 | ガランタミン (29.7) | リコリン (ND) | |
| | 鱗茎 | ガランタミン (100.6) | リコリン (2.5) | |
| バイケイソウ | 葉 | プロトベラトリン A (27.9) | ジェルビン (ND) | |
| | | プロトベラトリン B (505.6) | ベラトラミン (ND) | |

ND: 1 μg/g未満

*1 皮層部: 約1mmの厚さでむいた皮の部分

*2 髄質部: 皮層部を除いた部分

周辺にあるとされている⁵⁾。

市販されているジャガイモについて調べたところ、品種により含有量に差があったが、いずれの品種においても皮層部(約1mmの厚さでむいた皮)にα-ソラニンとα-チャコニンが高濃度に含まれ、髄質部(皮層部を除いた部分)にはわずかにしか含まれていなかった。

ジャガイモによる食中毒の多くは学校などでの自家栽培によるもので、ソラニン類を多く含む緑化したジャガイモや未成熟な小型のジャガイモの喫食を避けるだけで

なく、芽や皮層部を喫食しないよう注意する必要があると考えられる。

(3) スイセン

スイセンはヒガンバナアルカロイドの一種であるリコリンとガランタミンを含有しているが、品種により含有する成分が異なるという報告⁶⁾がある。

当センターで栽培した2種類のスイセンの葉と鱗茎に含まれる成分を比較すると、ニホンスイセンはリコリン、ラップスイセンはガランタミンの含有量が多かった。ま

た、いずれのスイセンも葉に比べ鱗茎の方が有毒成分を高濃度に含有していた。今回調べたスイセンは2品種だけであるが、スイセンの誤食事例が発生した際は、品種により含有成分が異なることを考慮する必要があると思われる。

(4) バイケイソウ

バイケイソウの有毒成分はプロトベラトリン、ジェルビン、ベラトラミンなどのベラトルムアルカロイドとされているが⁷⁾、過去に発生した、北海道の食中毒事例⁸⁾ではジェルビンと11-デオキシジェルビン、本県の事例⁹⁾ではプロトベラトリンAとBが検出されており、自生地により含有する成分が異なっていた。

県内で採取されたバイケイソウの葉の塩づけから、プロトベラトリンAおよびBが検出されたが他の成分は検出されなかった。県内で自生するバイケイソウには神経毒作用が強いプロトベラトリンが多く含まれており、誤食により重篤な症状を呈するおそがあることから注意喚起が必要と思われる。

4 まとめ

(1) 植物性自然毒の誤食による食中毒発生時、迅速に原因植物を究明するため検査法の検討を行った。

食中毒の発生件数が多い6植物が含有する14種類の有毒成分について、LC-MS/MSを用いて分析時間が20分間で測定できた。検討した方法で調理食品(ホウレンソウのお浸し、ニラと卵の炒め物)を用いて添加回収試験を実施し、回収率、精度ともに良好な結果が得られた。本法は調理品にも適用可能で、前処理に要する時間も1時間程度と緊急時の迅速分析法として有効な方法であると考えられる。

(2) 検討した方法を用いて、誤食による食中毒の発生件数が多い5植物(イヌサフラン、グロリオサ、ジャガイモ、スイセン、バイケイソウ)について有毒成分の含有量を測定した。

スイセンは品種により含有する有毒成分が異なっていることや、県内に自生するバイケイソウはプロトベ

ラトリンを含有しているなど、有毒植物による食中毒が発生した際に参考となるデータが得られた。

文 献

- 1) 厚生労働省：有毒植物による食中毒に注意しましょう、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yuudoku/index.html (2023年7月25日)
- 2) 南谷臣昭：植物性自然毒の多成分同時分析法の開発、令和2年度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 研究分担報告書(2021)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全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
- 4) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：イヌサフラン、<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html> (2023年7月25日)
- 5) 農林水産省：食品に含まれるソラニンやチャコニン、<https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/solanine/ganyuu/ganyu.html> (2023年7月25日)
- 6) 山本敬男, 小泉美樹, 小林浩：山梨県内で採取されたスイセンとその調理品に含まれるリコリン及びガラントミン測定法の検討と含有量の特徴、山梨県衛生環境研究所年報, **63**, 31-35 (2019)
- 7) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：バイケイソウ、<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000079821.html> (2023年7月25日)
- 8) 高橋正幸, 藤本啓, 武内伸治, 佐藤正幸, 小島弘幸：道内における植物性自然毒による食中毒事例(平成28年)、北海道立衛生研究所報, **67**, 99-102 (2017)
- 9) 大久保圭祐：バイケイソウによる食中毒、食品衛生学雑誌, **62**(2), 39-40 (2021)