

短 報

中毒原因となる有毒植物の多成分一斉分析法の開発

笠原 翔悟, 笠原 義正

Development of Simultaneous Analysis Method for Natural Toxins in Poisonous Plants

By Shogo KASAHARA and Yoshimasa KASAHARA

自然毒による食中毒が起きた際の原因究明方法として、同一の方法で複数の毒成分を同時に分析できるLC-MS/MSによる一斉分析法について検討した。5種類の植物の14成分について検討を行ったところ、マルチモードカラムを用いることで極性の異なる成分を同時に測定可能な分析条件が得られた。また、試料の抽出、精製などの前処理方法についても検討を行った。さらに、この方法を用いた有毒植物の分析により新たな知見が得られた。

Key Word：自然毒 Natural Poisons, 一斉分析法 Simultaneous Analysis Method, 高速液体クロマトグラフ
タンデム質量分析計 LC-MS/MS

I はじめに

山形県は山に囲まれ自然が豊かであることから、山菜やキノコを採る人が多く、それゆえ誤食による食中毒が後を絶たない。厚生労働省が公表している2000年から2014年までの食中毒統計によると、山形県は植物性自然毒による食中毒発件数が全国で2番目に多い県である(Fig. 1)。また人口10万人あたりの発生率は全国で最も高い。これらの自然毒による食中毒を未然に防ぐには、自然毒に関する多くの知見を得ること、中毒発生時に迅速に原因を究明すること、自然毒に関する情報を広く発信していくことが不可欠である。

自然毒による食中毒が起きた際の原因食品の特定では、はじめに未調理品や残品の形態調査を行う。しかし、たいていは調理済みであり元の状態が判別できない場合が多い。また形態的特長および中毒症状で原因を特定するためには、植物の分類や中毒症

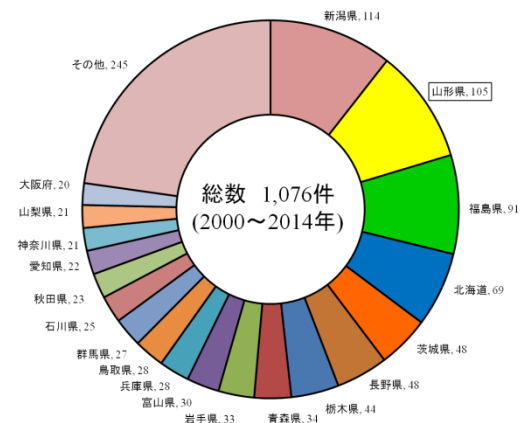


Fig.1 植物性自然毒による食中毒発件数

状に関する専門的な知識が要求される。以上の方法で原因が特定されない場合、分析機器を用いた成分分析法が用いられる。この方法は前述のような形態学的、医学的知識が必要でなく、毒の標準品があれば分析機器を用いて特定できる。しかしながら、現状では中毒原因となりうる各植物に対して、試料前処理方法や機器の分析条件が異なっている。これら

を同一の方法で行うことができれば、時間、操作ともに簡略化され、より迅速に中毒の原因究明を行うことができる。そこで本研究では、同一の方法で多様な植物の有毒成分が分析可能になる一斉分析法について検討した。本研究で対象としたのは、山形県において中毒の報告が多いトリカブト、スイセン、チョウセンアサガオ、バイケイソウおよび、全国的に中毒の多いジャガイモの5種類14成分とした (Table 1)。また、この方法の検討により、一斉分析法に関する知見だけでなく、植物の毒成分に関する新たな知見が得られたのであわせて報告する。

Table 1 対象植物および成分

植物	毒成分	
トリカブト	アコニチン	メサコニチン
	ヒパコニチン	ジェサコニチン
バイケイソウ	ベラトリン	ベラトラミン
	ジェルビン	プロトベラトリンA
チョウセンアサガオ	アトロピン	スコポラミン
スイセン	リコリン	ガラントミン
ジャガイモ	α -ソラニン	α -チャコニン

II 実験

試料

分析法検討用試料として、衛生研究所敷地内で採取したスイセン、衛生研究所で栽培したチョウセンアサガオ、山形市蔵王で採取したコバイケイソウおよび県内で流通しているジャガイモを用いた。

試薬

標準品：アコニチン、ヒパコニチン、メサコニチン、ジェサコニチンは三和生薬（株）、アトロピン、スコポラミン、ジェルビン、ソラニン、ガラントミンは和光純薬工業（株）、ベラトラミン、プロトベラトリンA、チャコニン、リコリンはフナコシ（株）、ベラトリンはSigma-Aldrich社から購入した。その他の試薬：ギ酸、ギ酸アンモニウムは和光純薬工業（株）製、メタノール、アセトニトリルはそれぞれ関東化学（株）製、Sigma-Aldrich社製の高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

固相カートリッジ：Waters社製 OasisHLB 6 cc (500 mg)を用い、使用前にメタノールおよび水でコンディショニングした。

装置

高速液体クロマトグラフはAgilent社製1100シリーズ、質量分析装置はAB Sciex社製API2000を用いた。装置の詳細および測定条件をTable 2に示す。

Table 2 測定装置及び測定条件

LC装置	Agilent社製 1100シリーズ
カラム	Imtakt社製 Scherzo SM-C18 (2.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μ m)
移動相	A液: 10 mMギ酸アンモニウム水溶液 B液: メタノール系
流量	0.2 mL/min
注入量	5 μ L
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
MS/MS装置	AB Sciex社製API2000
イオン化	ESI

試料溶液の調製

試料の抽出および精製はFig. 2～4に示す3方法で行った。すなわち、方法I：メタノールで抽出した後に固相カートリッジによる精製を行う方法 (Fig. 2)、方法II：酸性条件下で塩酸抽出した後に固相カートリッジによる精製を行う方法 (Fig. 3)、方法III：メタノールで抽出し希釈する方法 (Fig. 4)である。

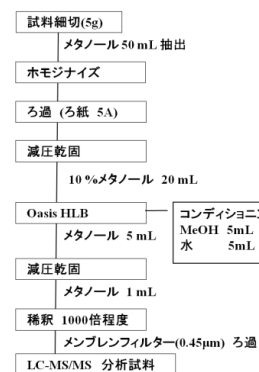


Fig. 2 試料調製方法

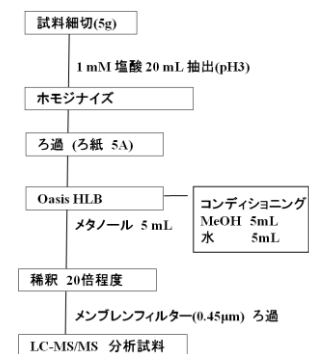


Fig. 3 試料調製方法

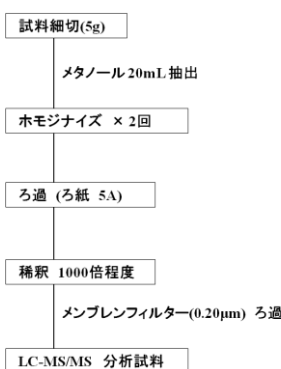


Fig. 4 試料調製方法

III 結果及び考察

一斉分析条件の検討

LC-MS/MS 条件

初めに, Table 1 に示した毒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. イオン化法は ESI を用い, MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードで行った. 全ての対象成分においてポジティブモードでプロトンが付加した分子がみられたため, これをプレカーサーイオンとし, 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. この結果を Table 3 に示す.

Table 3 14 成分モニタリングイオン

	Precursor ions (m/z)	Product ions ^{a)} (m/z)	Product ions ^{b)} (m/z)
Solanine	869.2	98.3	398.9
Chaconine	853.3	98.2	707.3
Hypaconitine	616.2	76.9	555.9
Mesaconitine	632.4	104.9	571.7
Aconitine	646.2	105.1	586.1
Jesaconitine	676.3	135.0	615.9
Lycorine	288.2	147.1	119.2
Galanthamine	288.3	213.2	198.2
Atropine	290.3	124.2	103.1
Scopolamine	304.3	138.1	156.2
Jervine	426.4	66.9	91.0
Veratramine	410.4	295.3	84.3
Veratrine	592.3	456.1	438.4
ProtoVeratrine A	816.4	698.5	658.9

^{a)} Used for quantitation

^{b)} Used for confirmation

LC 条件

対象となる毒成分の分子量は 100 程度から 900 と幅広く, 極性も様々であるため, 一斉分析には極性が異なる物質を幅広く保持できるカラムが必要であ

る.そこで本研究では, 逆相系の ODS とイオン交換の性質を併せ持つマルチモードカラムを用いて検討を行った. 初めに, 移動相として A 液を 10 mM ギ酸アンモニウム, B 液をメタノールとしていたが, 一部でピークの重なりがみられた. そこで B 液をメタノール: アセトニトリル (98: 2) としたところ, Fig. 5 に示したように, 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.

試料分析法の検討

次に, 対象とする植物ごとに実際の植物を用いて毒成分の抽出方法について検討した.

ジャガイモ: 日光に晒し緑化させたジャガイモを用い, 試料調製方法 I, II により抽出を行ったところ, α -ソラニン, チャコニンの含有量はそれぞれ 0.86 $\mu\text{g/g}$, 0.082 $\mu\text{g/g}$ であり, とともに抽出が可能であった. またこの 2 成分はグリコアルカロイドと呼ばれるアルカロイドであることから, 既に報告されている ¹⁾ トリカブト毒の抽出法である塩酸による抽出も試みた. その結果, α -ソラニン 0.98 $\mu\text{g/g}$, チャコニン 0.096 $\mu\text{g/g}$ であり, いずれの抽出溶媒でも抽出可能であった.

スイセン: 麟茎部を用いて検討を行ったところ, Table 4 に示すとおり, ガランタミンのみが検出され, リコリンは検出されなかった. この原因については後述する. また検出されたガランタミンについては, 麟茎が大きくなるとともに含有量の減少傾向が見られた.

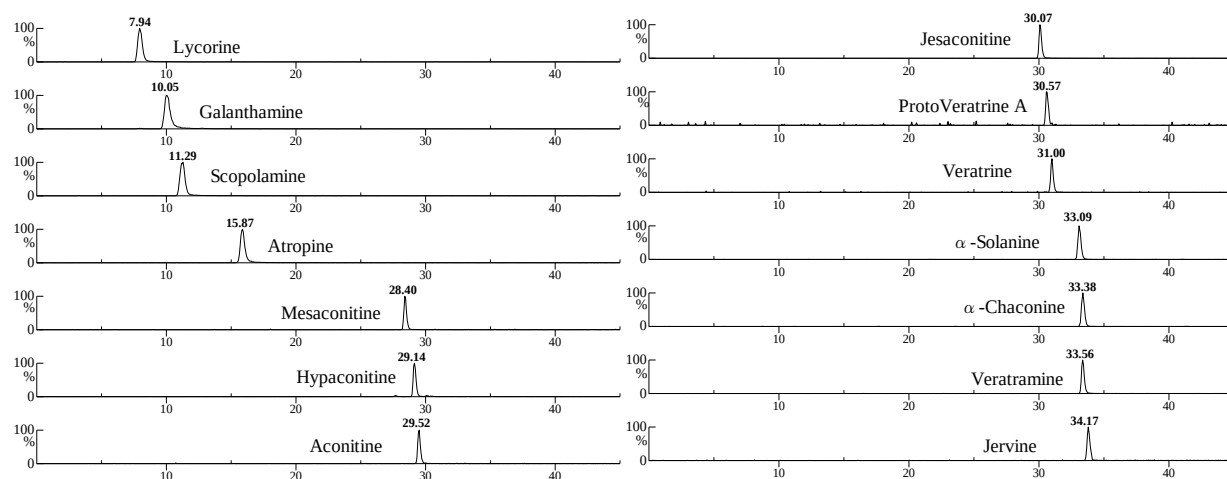


Fig.5 14 成分一斉クロマトグラム

Table 4 スイセン鱗茎中のリコリン, ガランタミン含有量

重量(g)	鱗茎の		鱗茎1個当たりのガランタミン含量(μg)
	アルカロイド含有量(μg/g)	リコリン	
1.22	N.D.	135	165
2.41	N.D.	114	274
3.23	N.D.	120	386
4.37	N.D.	99	433
5.73	N.D.	98	560

チョウセンアサガオ：葉を用いて抽出を行ったところ Table 5 に示す結果となり，スコポラミンのみが検出され，アトロピンは検出されなかった．またスコポラミン含有量は葉の大きさが大きくなるほど減少していた．

Table 5 チョウセンアサガオの葉中のアトロピン, スコポラミン含有量

重量(g)	アルカロイド類含有量(mg/g)		葉1枚当たりのスコポラミン含量(μg)
	アトロピン	スコポラミン	
0.093	N.D.	1.097	102
0.552	N.D.	0.243	134
1.197	N.D.	0.049	58.5

コバイケイソウ：メタノール抽出，塩酸抽出のいずれの方法においても，バイケイソウ類の4種の毒成分のうちベラトラミン，ジェルビンのみが検出された．また，試料調製方法 II および III で前処理時間を比較したところ，方法 III では固相抽出カートリッジによる精製を行わないため，方法 II に比べ1時間以上短い時間で調製が可能であった．食中毒検査のような迅速性が求められる検査の場合では方法 III がより適していると考えられる．しかし，精製が不十分であるため，試料には夾雑成分も多く含まれてしまう．通常，LC-MS/MS による測定では夾雑を多く含んだ状態で測定を行うと，マトリックス効果によりイオンサプレッションやイオンエンハンスメントが引き起こされる場合がある．本検討においてはマトリックスによる影響は確認されず，精製を簡略化した方法でも測定が可能であることがわかった．

スイセン，チョウセンアサガオ，コバイケイソウで検出されない成分があった原因について，以下のことが考えられる．Fig 2 に示したとおり，標準品を用いた分析ではすべて検出されていることから今回設定した分析条件に不備があるとは考えられ

ない．またいずれの成分もアルカロイドの一種であり，メタノールもしくは塩酸による抽出が可能であると考えられる．ジャガイモでは2成分ともに抽出されており，他の植物でも1成分以上は抽出されていることから抽出溶媒によって特定の成分が抽出されないことは考えにくく，抽出操作が原因である可能性も低い．一方で，トリカブトでは種や地域によって4種のアコニチン類の含有率が異なっており，毒成分が全く含まれていないトリカブトがあることを我々は報告している¹⁾．これらのことから今回，一部の成分が検出されなかった原因は，分析を行った試料にそれらの成分が含まれていなかった可能性が高い．しかしながら，前処理過程における消失や構造変化など不確定な部分が多いため今後さらなる検討が必要である．

まとめ

食中毒の原因物質となる有毒植物の毒成分について，LC-MS/MS を用いた一斉分析法を検討した．

ODS とイオン交換の性質を併せ持つマルチモードカラムを用いることにより，極性の異なる14成分の毒成分を分離可能な条件を確立した．

対象とする植物を用いて前処理条件の検討を行ったところ，14成分のうち4成分が検出されなかったが，これは前処理方法によるものではなく，用いた試料にもとから含まれていなかった可能性が示唆された．

IV 文献

- 1) 笠原義正, 伊藤健: トリカブトおよび食中毒原因食品中のアコニチン系アルカロイドの一斉分析, 食品衛生学雑誌, 42, 76-81(2008)