

# 超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置による植物性自然毒の一斉分析法について

佐藤 真耶 平松 綾香 井田 博之 足立 有佳里 宇野 玲子

Simultaneous Determination of Plant Toxins  
by Ultra Performance Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometer

Maya SATO Ayaka HIRAMATSU Hiroyuki IDA Yukari ADACHI Reiko UNO

## 要 旨

植物性自然毒が原因となる食中毒は、ウイルスなどと比較して発生件数は少ないものの、多様な植物に由来し種類や化学的特性も多岐にわたり、なかには症状が重篤化しやすく致命率が高いものもある。また、植物性自然毒による食中毒は多くが家庭内等での有毒植物の誤食によるものであり、残った食材や調理品等の検体の状況は様々であるため、原因物質の特定が難しい場合も想定される。そのような場合には一斉分析にて検査を行うことが望まれるが、当所では自然毒成分について個別の分析法を採用しているため迅速性が求められる事件対応として課題が残っている。そこで、代表的な植物性自然毒として、アコニチン、メサコニチン、アトロピン、スコポラミンおよびリコリンについて、超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置を用いて、より簡便な一斉分析法を検討した。分析方法の妥当性を評価するため、装置の測定条件を最適化した後、各物質について検量線の直線性を確認した。さらに、検討対象の自然毒を含有しない市販の食用菜の花を用いて選択性の確認および標準品添加回収試験を実施し、真度、併行精度および室内精度を算出した。その結果、各物質の検量線は2-20 ng/mLの範囲で相関係数0.99以上の良好な直線性を示した。また、各物質の検出を妨害するピークは確認されず、選択性は良好であり、標準品添加回収試験では、真度は78.3-102.2%、併行精度は2.7-3.3%、室内精度2.8-4.1%と全ての物質で目標値を満たした。以上のことから、本分析法は検討した自然毒成分5種の一斉分析法として活用可能だと確認できた。今後は一斉分析可能な自然毒成分の拡充や、マトリックスによる影響が大きいことが懸念される調理済み品についても検討を行い、食中毒事件に備えた危機管理対応の強化を図っていきたい。

キーワード：添加回収試験、妥当性評価、アコニチン、メサコニチン、アトロピン、スコポラミン、リコリン  
Keywords：Additive recovery test, Validation, Aconitine, Mesaconitine, Atropine, Scopolamine, Lycorine

## はじめに

厚生労働省が公開している食中毒統計資料 ([https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html)) によると、令和6年に国内で発生した食中毒事件数は1,037件、患者数14,229名であった。そのうち植物性自然毒が原因の食中毒事件数は41件、患者数は93名であり、ウイルスや細菌、寄生虫と比較するとその発生件数は少ない。しかし、自然毒のなかには症状が重篤化しやすく致命率の高い物質もあり、令和6年の食中毒による死者は、全て植物性自然毒が原因物質であった。当所では、過去に高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) による自然毒の迅速試験法について報告<sup>1)</sup>を行っている。しかし、本試験法は6種類 (テトロドトキシン、リコリン、アコニチン、メサコニチン、アトロピンおよびスコポラミン) の自然毒成分について成分ごとに3種類の異なる分析カラムおよび測定条件を採用した分析法となっている。自然毒が原因と疑われる食中毒事件では、調理残品からは原因植物の確認が難しい場合や患者からの聞き取りが困難な場合も想定され

るが、そのように原因物質の特定が難しい事件の場合には、現状では3種類の試験法を併行して行う必要がある。加えて、各分析法の分析カラムおよび移動相が異なることから、測定条件の切り替えや装置の安定化にも時間を要し、迅速な対応が求められる食中毒事件の分析法としては課題が残る。一方、他の地方衛生研究所では植物性自然毒についてLC-MS/MSを用いた一斉分析事例も多数報告<sup>2,4)</sup>されている。今回、それらの報告も参考として、定性能力に優れるとともに定量も可能な超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置 (UPLC-TOFMS) を用いた自然毒成分5種 (アコニチン、メサコニチン、アトロピン、スコポラミンおよびリコリン) の一斉分析法の検討を行ったので、その結果を報告する。

## 材料と方法

### 1. 試料

今回検討を行った植物性自然毒による食中毒は、主に家庭菜園や山菜狩りなどで食用植物と誤認して採取したものが原因となることが多い。そこで、花らいや葉、茎を食用とする野菜の一種であり、アコニチン、メサコニチン、アトロピン、スコポラミンおよびリコリンが検出されないと見込まれる、

(令和8年1月27日受理)

市販の食用菜の花をミキサーにより細切均一化したものをブランク試料として用いた。

## 2. 対象物質

アコニチン、メサコニチン、アトロピン、スコポラミンおよびリコリンについて、検討を行った。

## 3. 標準品および試薬等

アコニチン標準品は Merck 製を用い、アコニチン標準品 25 mg をメタノールで溶解し 50 mL としたものを標準原液 (500 µg/mL) とした。メサコニチン標準原液 (500 µg/mL)、アトロピン標準原液 (2,000 µg/mL) およびスコポラミン標準原液 (2,000 µg/mL) はメタノール溶媒の林純薬工業(株)製を用いた。リコリン標準品は東京化成工業(株)製を用い、リコリン標準品 25 mg をメタノールで溶解し 50 mL としたものを標準原液 (500 µg/mL) とした。検量線の作成及び添加回収試験で用いる混合標準溶液は各自然毒の標準原液を混合し、メタノールを使用して 5 µg/mL となるように調製した。検量線溶液は 2-20 ng/mL の範囲となるようにメタノールを使用して段階的に希釈して調製した。

メタノールは LC/MS 用、*n*-ヘキサンは残留農薬・PCB 試験用、1 mol/L 硝酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用のいずれも富士フイルム和光純薬製を用いた。水は水道水を Merck 製 Milli-Q Direct16 により精製して使用した。セラミックホモジナイザーは Agilent Technologies 社製の 50 mL チューブ用、メンブレンフィルターはアドバンテック東洋製の 25HP020AN (孔径 0.20 µm) を用いた。

## 4. 機器及び測定条件

UPLC は Waters 製の ACQUITY UPLC H-Class システム、TOFMS は Waters 製の Xevo G2-XS QToF システムを用いた。

UPLC 及び TOFMS の測定条件は表 1 に示した。移動相

表 1. 超高速液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析装置の測定条件

UPLCのパラメータ			
カラム	Waters製 ACQUITY UPLC HSS C18 長さ150 mm、内径2.1 mm、粒径1.8 µm		
カラム温度	40°C		
注入量	2 µL		
流量	0.2 mL/分		
移動相	A液：10 mmol/L 硝酸アンモニウム溶液 B液：メタノール		
グラジエント条件			
	注入後の時間 (分)	移動相A % (v/v)	移動相B % (v/v)
	0	99	1
	2	99	1
	14	1	99
	20	1	99
	25	99	1
	30	99	1
TOFMSのパラメータ			
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ポジティブモード)		
スキャンモード走査範囲	m/z 100~1000		
キャピラリー電圧	2 kV		
サンプルコーン電圧	20 V		
ソースオフセット電圧	80 V		
ソース温度	120°C		
脱溶媒温度	450°C		
コーンガス流量	50 L/h		
脱溶媒ガス流量	800 L/h		

は先行事例<sup>1,3-5)</sup>を参考にメタノールおよび硝酸アンモニウム溶液を採用し、カラムは当課で保有しているカラムの内、汎用性の高い ODS カラムの中でも塩基性化合物の分離に優れる Waters 製 ACQUITY UPLC HSS C18 を選択した。今回検討した自然毒成分は全て塩基性化合物であることからポジティブモードでの測定を選択し、本分析法では、迅速な判定が求められる危機管理対応を想定し、解析を簡素化するため、コリジョンエネルギーを加えず衝突誘起解離を起こさない条件で測定を行った。また、その他の条件については Waters 社より提供のあった機器の推奨設定を採用した。

## 5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、所要時間が短く簡易な方法として、佐藤ら<sup>5)</sup>の報告を参考に行った。すなわち、試料 1.0 g に水-メタノール (1:9) 10 mL および *n*-ヘキサン 10 mL を加えたのちに、セラミックホモジナイザーとともに5分間の振とう抽出し、3,500 rpm で5分間の遠心分離を行い、下層 (水-メタノール層) をメンブレンフィルターでろ過し試験溶液とした。文部科学省の食品成分データベース (<https://fooddb.mext.go.jp/index.pl>) によると、本検討で試料として用いた菜の花は脂質含量が 100 g あたり 0.2-0.4 g と少ないが、将来的には本調製方法を調理済み品に拡充することを目標としていることから *n*-ヘキサンによる脱脂操作を加えた。また、佐藤ら<sup>5)</sup>の方法では抽出時はホモジナイザーにより 10,000 rpm で1分間ホモジナイズした後に遠心分離を行っているが、本検討ではセラミックホモジナイザーによる振とう抽出への変更を試みることにした。そのため、スイセン葉を試料として、ホモジナイザーで抽出する佐藤ら<sup>5)</sup>の方法とセラミックホモジナイザーを用いた抽出方法の二法でリコリンの検出量の比較を行った。

## 6. 評価方法

### 6-1. 検出ピークの同定及び検量線の直線性

最も低い検量線溶液 (2 ng/mL) を UPLC-TOFMS に注入し、スキャン分析により得られた自然毒成分 5 種の測定精密質量と計算精密質量を比較した。また、測定精密質量と計算精密質量の差の絶対値を計算精密質量で除して相対質量確度を求めるとともに、測定により得られた同位体パターンを Waters 社が提供する計算精密質量の同位体パターンと比較し一致を確認した。

検量線溶液 (2-20 ng/mL) について得られたピーク面積から、絶対検量線法で検量線を作成した。検量線の相関係数は 0.99 以上を目標値とし、検量線範囲が定量限界以上であることを確認するため全ての濃度でシグナル/ノイズ比は 10 以上を目標値とした。

### 6-2. 標準品添加回収試験

標準品を用いた添加回収試験の実施に当たり、本検討方法の選択性を確認するため、ブランク試料 (菜の花) を用いて、前述のとおり試験溶液を調製し、UPLC-TOFMS に注入して各自然毒成分について妨害ピークの有無を確認した。各自然

毒成分は原則として不検出が望まれることから、妨害ピークの許容範囲を最も低い検量線溶液濃度 (2 ng/mL) のピーク面積の 1/3 未満とした。なお、本検討では農産物をはじめとした食品中に残留する化学物質の機器分析による試験法を対象とした「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」(厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、平成 19 年 11 月 15 日、食安発第 1115001 号、以下「妥当性評価ガイドライン」という。)を参考にした。

ブランク試料 1 g に各自然毒の濃度が 1 µg/g となるように混合標準溶液 (5 µg/mL) を添加し 30 分程度静置した後に、前述の方法により調製した試験溶液を UPLC-TOFMS にて測定し、絶対検量線法で定量した。分析法の妥当性は妥当性評価ガイドラインに従い、1 日 2 併行の標準品添加回収試験を 5 日間実施して評価した。各評価項目の目標値は、真度を 70-120%、併行精度 (RSD%) 10% 未満、室内精度 (RSD%) 15% 未満とした。なお、各自然毒の添加濃度は佐藤ら<sup>5)</sup>の報告を参考とした。

## 結果及び考察

### 1. 検出ピークの同定及び検量線の直線性

検量線溶液 (2 ng/mL) を測定し得られた全イオン電流クロマトグラムから各自然毒成分についてプロトン付加イオンの計算精密質量を抽出したところ、結果は図 1 に示すとおり自然毒成分 5 種についていずれも妨害ピークは認められず、十分にピークが分離されていた。また、計算精密質量、測定精密質量および相対質量確度を表 2 に示す。相対質量確度は 1.7 ppm 以下と自然毒成分 5 種全てで 5 ppm 以下となり先行事例<sup>5)</sup>と同等の結果が得られた。同位体パターンについても計算精密質量の同位体パターンと一致したことから、検出されたピークは今回検討した自然毒成分 5 種と同一であると判断した。

検量線溶液 (2-20 ng/mL) を測定したところ、自然毒成分 5 種について各検量線の相関係数は 0.99 以上と直線性は良好であり、シグナル/ノイズ比も全ての濃度で 10 以上で

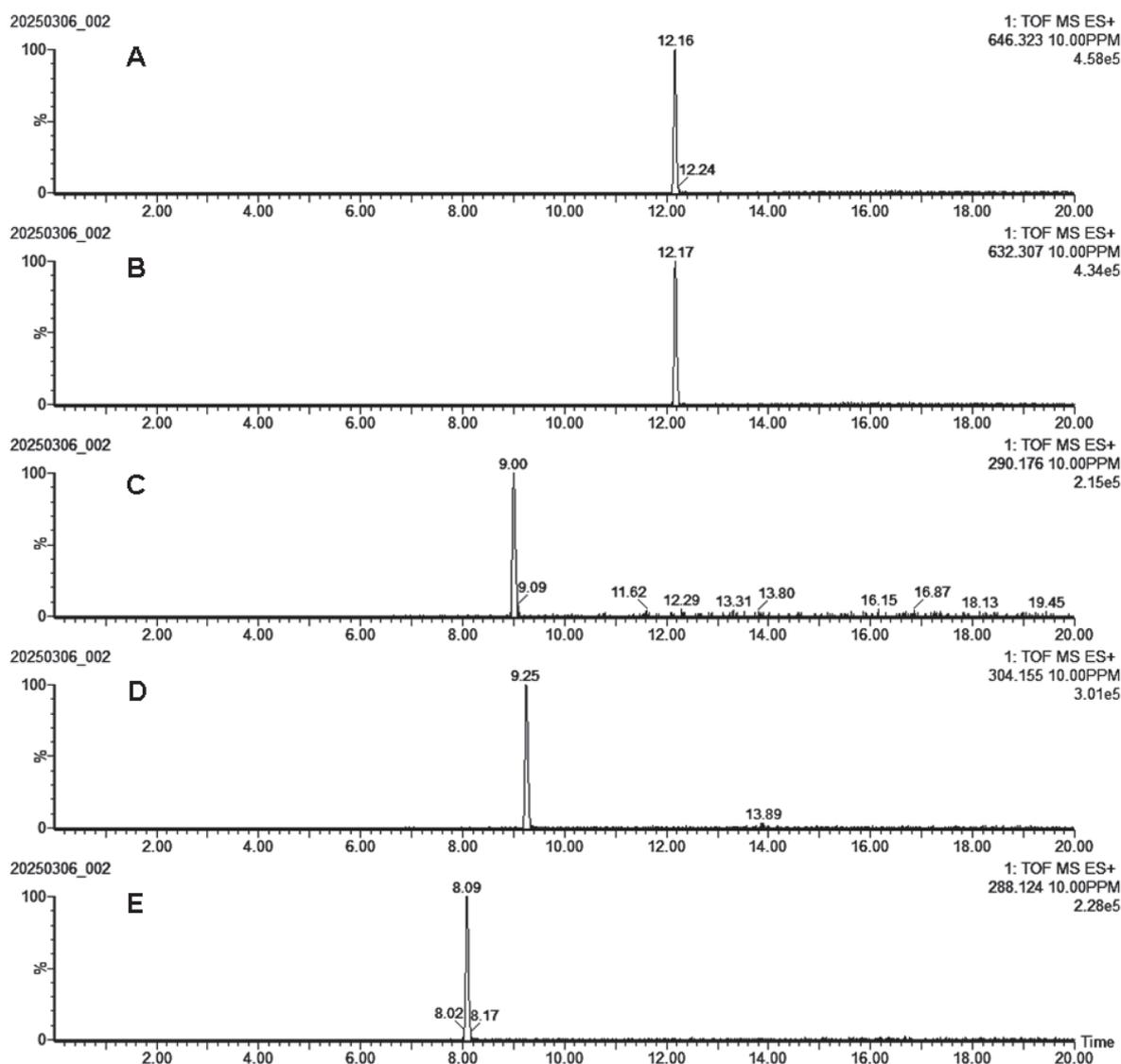


図 1. 全イオン電流クロマトグラムから自然毒成分のプロトン負荷イオン計算精密質量を抽出したクロマトグラム  
A: アコニチン、B: メサコニチン、C: アトロピン、D: スコポラミン、E: リコリン

あったことから、今回設定した検量線範囲 (2-20 ng/mL) について、定量可能と判断できた。測定化合物の中で最も毒性の強い<sup>6)</sup> アコニチンの致死量は、厚生労働省が公開している自然毒のリスクプロファイル (<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000082112.html>) によると 2-6 mg であり、最も低い検量線濃度 (2 ng/mL) のアコニチンが含まれる食品を致死量まで摂取するには約 100 kg 必要となることから、本検討で設定した検量線範囲は十分に低い濃度であり、食中毒事件発生時の原因究明に十分有効であると考えられる。

表2. 検討対象物質

化合物	組成式	計算精密質量		測定精密質量	相対質量確度 (ppm)
		M	M+H	M+H	
アコニチン	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>11</sub>	645.3149	646.3227	646.3228	0.2
メサコニチン	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>11</sub>	631.2993	632.3071	632.3063	1.3
アトロピン	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	289.1678	290.1756	290.1751	1.7
スコボラミン	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303.1471	304.1549	304.1549	0.0
リコリン	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	287.1158	288.1236	288.1234	0.7

## 2. 試験溶液の調製

食中毒事件の対応においては、検体に自然毒成分ないし細菌等を含むその他の有毒物が含まれている可能性が高い。そこで、それら有毒物による共有器具や検査室等への汚染リスクを低減するため、器具は原則としてディスポーザブル品を用いることとした。抽出操作についてもセラミックホモジナイザーを用いた振とう抽出方法を検討し、佐藤ら<sup>5)</sup>の方法との比較を行った。その結果それぞれの抽出操作により調製した試料中の、リコリン含量は佐藤ら<sup>5)</sup>の方法では 82.13 µg/g、今回の方法では 80.69 µg/g となり、抽出方法の変更による差はほとんどなく、セラミックホモジナイザーを用いた振とう抽出への変更は検出結果に影響しないことが確認できた。

## 3. 標準品添加回収試験

妥当性評価ガイドラインを参考に実施した選択性の確認結果および1日2併行の標準品添加回収試験を5日間実施して評価した結果を表3に示す。ブランク試料(菜の花)において、

表3. 添加回収試験の結果 (2併行×5日間)

化合物	選択性	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
アコニチン	○	79.1	3.1	4.1
メサコニチン	○	78.8	2.9	4.1
アトロピン	○	102.2	2.7	2.8
スコボラミン	○	89.5	2.9	3.4
リコリン	○	78.3	3.3	3.8

自然毒成分5種全てで妨害ピークは認められなかった。また、真度は78.3-102.2%、併行精度は2.7-3.3%、室内精度は2.8-4.1%となり、自然毒成分5種全てについて妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。今回検討を行った自然毒成分5種について分析を行う場合、既報<sup>1)</sup>では複数の測定条件で検査を行う必要があるが、本分析法を採用することでより迅速な原因究明が可能になると考えられる。

## 引用文献

- 1) 大藤升美, 土田貴正, 野澤真里奈, 茶谷祐行. 2013. LC-MS/MSによる自然毒の迅速試験法の評価について. 京都府保健環境研究所年報, 58, 41-46
- 2) 福光徹, 萩尾真人, 熊坂謙一. 2024. キノコ毒を含む多様な植物性自然毒の一斉分析法. 食品衛生学雑誌, 65(6), 172-177
- 3) 堀井裕子. 2023. 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. 富山県衛生研究所年報, 46, 131-135
- 4) 吉富秀亮, 佐藤環, 堀就英. 2023. LC-MS/MSによる植物性自然毒37成分の迅速一斉分析法の妥当性確認. 福岡県保健環境研究所年報, 50, 89-93
- 5) 佐藤秀樹, 河野嘉了, 田中志歩, 常松順子, 松永美樹, 宮尾義浩, 中牟田啓子. 2024. LC-TOF-MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の確立. 食品衛生学雑誌, 65(1), 7-14
- 6) 池田良雄. 1953. 薬物致死量集. 株式会社南山堂, 東京.