

LC-MS/MSによる自然毒の迅速試験法の評価について

大藤 升美 土田 貴正 野澤 真里奈 茶谷 祐行

Rapid Determination of Natural Toxins that Caused Food Poisoning by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

Masumi OHFUJI Takamasa TSUCHIDA Marina NOZAWA Yoshiyuki CHATANI

フグの有毒成分であるテトロドトキシン、スイセンのリコリン、トリカブトのアコニチン及びメサコニチン、チョウセンアサガオのアトロピン及びスコポラミンをLC-MS/MSにより測定する方法を検討した。それらの物質が検出されないことを確認した養殖ふぐの肝、ニラの葉、ゴボウを用いて添加回収試験等を行ったところ、平均回収率はテトロドトキシシンが106%、リコリンが92%、アコニチン92%、メサコニチン93%、アトロピン126%、スコポラミン96%と良好な結果が得られ、迅速検査法として用いることができることを確認した。

キーワード：液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置、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、スコポラミン

key words：LC-MS/MS, Tetrodotoxin, Lycorine, Aconitine, Mesaconitine, Atropine, Scopolamine

はじめに

本研究所は健康危機発生時における検査、調査の迅速かつ確かな対応と広域的な健康危機管理のための地方衛生研究所間での協力体制の確立を重点課題として取り組んでいるところである。平成22年度から24年度に、健康危機関連化学物質の中でも自然毒による健康危機管理事例に迅速かつ的確に対応することを目的とした「健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究」(以下「自然毒の研究」という。)¹⁴⁾が19地研の協力により実施され、本研究所も協力した。フグの有毒成分であるテトロドトキシン、スイセンのリコリン、トリカブトのアコニチン及びメサコニチン、チョウセンアサガオのアトロピン及びスコポラミンについて、約2時間～4時間で対象物質を定量することを目的としたLC-MS/MSによる迅速一斉分析法が研究分担者から示され、各地研においてLC-MS/MSの測定条件を検討し、精度管理が行われた。本研究所でもこれらの対象物質を迅速に測定できることを確認したので報告する。

材料と方法

1. 試料

試料は誤食する可能性が高い部位、食品とし、あらかじめテトロドトキシンが検出されないことが確認された養殖ふぐの肝、リコリンが検出されないことを確認したニラの葉、アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミンが検出されないことを確認したゴボウを添

加回収試験用試料とした。なお、養殖ふぐの肝は自然毒の研究において研究分担者から供与されたものを用いた。

2. 評価対象物質

テトロドトキシン、リコリン、アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン

3. 試薬

3-1. テトロドトキシン

テトロドトキシン標準品はTOCRIS bioscience社製を用いた。標準原液(100 μ g/mL)はテトロドトキシン標準品1mgを0.1%酢酸で溶解し10mLとした。標準溶液は0.5~200ng/mLの濃度となるよう0.1%酢酸・アセトニトリル(1:1)混液で調製した。

ろ紙はNo.5A(桐山製作所社製)、限外ろ過はMerck Millipore Amicon Ultra-4 10kDa(Merck社製)、メンブランフィルター(0.45 μ m)はMillex-LH13(Merck社製)、メンブランフィルター(0.20 μ m)はMillex-LG4(Merck社製)、LC用カラムはXbridge Amide(Waters社製)(粒子径3.5 μ m、内径2.1mm、長さ150mm)を用いた。

3-2. リコリン

リコリン標準品はBIOMOL社製リコリン塩酸塩(純度98%)を用いた。リコリン塩酸塩10mgをメタノールで溶解し20mLとしたものを標準原液(リコリンとしての濃度は443.69 μ g/mL)とした。標準溶液は0.5~200ng/mLの濃度にメタノールで調製した。

ろ紙はGFP(桐山製作所社製)、メンブランフィルター(0.20 μ m)はMillex-LG4(Merck社製)、LC用カラムはXbridge C18(Waters社製)(粒子径3.5 μ m、内径2.1mm、長さ150mm)を用いた。

(平成25年7月31日受理)

3-3. アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン

アコニチン標準品、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン標準原液は研究分担者から供与されたものを用いた。

アコニチン標準品はSigma-Aldrich社製アコニチン(純度95%)を用い、アコニチン標準原液(500 μ g/mL)はアコニチン5mgにメタノールを加えて正確に10mLとした。

メサコニチン標準品は松浦薬業製メサコニチン(純度98%)、アトロピン標準品はSigma-Aldrich社製アトロピン(純度99%)、スコポラミン標準品はSigma-Aldrich社製スコポラミン臭化水素酸塩三水和物(純度98%)を用い、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン標準原液はメタノールで各々500 μ g/mL、2000 μ g/mL、スコポラミンとして2000 μ g/mLとなるように調製されたものを用いた。

アコニチン標準原液4mL、メサコニチン標準原液4mL、アトロピン標準原液1mL、スコポラミン標準原液1mLを正確に量り、メタノールで10mLとし混合標準溶液とした。本液1mLはアコニチン200 μ g、メサコニチン200 μ g、アトロピン200 μ g、スコポラミン200 μ gを含む。標準溶液は0.5~200ng/mLの濃度に混合標準溶液をメタノールで希釈して調製した。

ろ紙はGFP(桐山製作所社製)、メンブランフィルター(0.20 μ m)はMillex-LG4(Merck社製)、LC用カラムはScherzo SM-C18(Imtakt社製)(粒子径3.0 μ m、内径2.0mm、長さ150mm)を用いた。

4. 装置

LC部:Agilent Technologies社製1100series, MS/MS部:Applied Biosystems社製API3000

5. 試験溶液の調製

5-1. テトロドトキシン

研究分担者から示された方法¹⁾に準じた。すなわち、磨砕試料10gを正確に量り採り、0.1%酢酸溶液25mLを加え、沸騰水浴中で10分間加熱、攪拌抽出した。冷却後、吸引ろ過し、0.1%酢酸溶液でろ紙を洗い、得られたろ液を合わせ正確に50mLとし抽出溶液とした。抽出溶液1mLをとり、0.1%酢酸溶液で10倍に希釈し、希釈溶液とした。希釈溶液の2mLを分取しメンブランフィルター(0.45 μ m)に通し、Amicon Ultra-4 10kDaを用いて限外ろ過(3500rpm、10分間、5 $^{\circ}$ C)をした。そのろ液1mLを分取しアセトニトリル1mLを加え、メンブランフィルター(0.20 μ m)に通しLC-MS/MS用試験溶液とした。

5-2. リコリン

研究分担者から示された方法²⁾に準じた。すなわち、細切した試料5gを正確に量り採り、メタノール20mL

を加え、3分間ホモジナイズした後、GFPろ紙を用いて吸引ろ過した。残渣にメタノール20mLを加えホモジナイズ抽出した後ろ過し、ろ液を合わせ、メタノールで正確に100mLとし抽出溶液とした。抽出溶液2mLを分取し、メタノールで50倍に希釈し、希釈溶液とした。希釈溶液の2mLをメンブランフィルター(0.20 μ m)に通しLC-MS/MS用試験溶液とした。

5-3. アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン

5-2. リコリンと同様にLC-MS/MS用試験溶液を調製した。

6. LC-MS/MS測定条件

テトロドトキシンの測定条件は表1に、リコリンは表2に、アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミンは表3に示した。

7. 定量

測定対象物質は標準溶液及び試験溶液を装置に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

8. 評価方法

8-1. LC-MS/MS条件、標準溶液の直線性、マトリックス効果及び検出限界について

LC-MS/MS条件、標準溶液の直線性、マトリックス効果及び検出限界について検討、評価した。

マトリックス効果はマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液の面積比を算出した。検出限界はS/N=3となる最小検出量を算出した。

8-2. 添加回収試験

本法の性能を評価する濃度は、対象物質が中毒を起こす濃度または植物に含まれる量とし、添加回収試験を行った。回収率の目標値は迅速検査法であることから50%~200%とし、併行精度はRSD%<30とした*1。

テトロドトキシンについては添加回収試験用試料に10MU/gに相当する濃度である2.2 μ g/gになるよう添加した。リコリンは、添加回収試験用試料にリコリン標準溶液を50.0 μ g/gになるよう添加した。アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミンは、添加回収試験用試料に各々40.0 μ g/gとなるように添加した。試験回数はいずれも5試行とした。

結果

1. テトロドトキシン

LC-MS/MSの測定条件はオペレーションソフトのイン

*1 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課。平成25年3月26日。事務連絡(2013)

表 1. テトロドトキシンの LC-MS/MS 測定条件

LC/MS/MS								
LC 部	Agilent Technologies 社製 1100series							
分離カラム	Waters 社製 Xbridge Amide (粒子径 3.5μm、内径 2.1mm、長さ 150mm)							
流量	0.2mL/分							
注入量	5μL							
カラム温度	40°C							
移動相及び送液条件	移動相：A 液及び B 液についてアイソクラティックで送液する。							
A 液：0.1% ギ酸	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)					
B 液：アセトニトリル	0	40	60					
	10	40	60					
MS/MS 部								
MS/MS 部	Applied Biosystems 社製 API3000							
イオン化法	ESI							
ターボガス温度 (TEM)	500°C							
ターボスプレー流量	6000mL/分							
モード	positive モード							
ネブライザーガス流量 (NEB、mL/分)	7							
カーテンガス流量 (CUR、mL/分)	7							
コリジョン反応ガス流量 (CAD、mL/分)	12.0							
イオンスプレー電圧 (IS、V)	3000							
スキャンタイプ	MRM							
ソフトウェア	Analyst 1.5							
		Q1	Q3	DP(V)	FP(V)	CE(V)	CXP(V)	Dwell(msec)
テトロドトキシン	定量イオン	319.9	161.9	56	360	51	10	200
	確認イオン	319.9	302.2	56	360	35	16	200

表 2. リコリンの LC-MS/MS 測定条件

LC/MS/MS								
LC 部	Agilent Technologies 社製 1100series							
分離カラム	Waters 社製 Xbridge C18 (粒子径 3.5μm、内径 2.1mm、長さ 150mm)							
流量	0.2mL/分							
注入量	5μL							
カラム温度	40°C							
移動相及びグラジエント条件	移動相：A 液及び B 液について濃度勾配法で送液する。							
A 液：5mmol/L 酢酸アンモニウム含有水	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)					
B 液：5mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール	0	85	15					
	0.1	85	15					
	10	15	85					
	20	15	85					
	20.1	85	15					
	35.1	85	15					
MS/MS 部								
MS/MS 部	Applied Biosystems 社製 API3000							
イオン化法	ESI							
ターボガス温度 (TEM)	500°C							
ターボスプレー流量	6000mL/分							
モード	positive モード							
ネブライザーガス流量 (NEB、mL/分)	6							
カーテンガス流量 (CUR、mL/分)	14							
コリジョン反応ガス流量 (CAD、mL/分)	12.0							
イオンスプレー電圧 (IS、V)	3000							
スキャンタイプ	MRM							
ソフトウェア	Analyst 1.5							
		Q1	Q3	DP(V)	FP(V)	CE(V)	CXP(V)	Dwell(msec)
リコリン	定量イオン	287.8	147.1	56	360	39	10	150
	確認イオン	287.8	119.0	56	360	51	8	150

表3. アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミンのLC-MS/MS測定条件

LC/MS/MS																																																												
LC部	Agilent Technologies 社製 1100series																																																											
分離カラム	Imtakt 製 Scherzo SM-C18 (粒子径 3.0µm、内径 2.0mm、長さ 150mm)																																																											
流量	0.2mL/分																																																											
注入量	5µL																																																											
カラム温度	40°C																																																											
移動相及びグラジエント条件																																																												
移動相：A液及びB液について濃度勾配法で送液する。																																																												
A液：10mmol/L 硝酸アンモニウム溶液																																																												
B液：メタノール																																																												
	<table border="1"> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> <tr> <td>0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> </table>	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0	40	60	4	40	60	10	5	95	15	5	95	15.01	40	60	30	40	60																																						
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																																																										
0	40	60																																																										
4	40	60																																																										
10	5	95																																																										
15	5	95																																																										
15.01	40	60																																																										
30	40	60																																																										
MS/MS部																																																												
イオン化法	Applied Biosystems 社製 API3000																																																											
ターボガス温度 (TEM)	ESI																																																											
ターボスプレー流量	500°C																																																											
モード	6000mL/分																																																											
ネブライザーガス流量 (NEB、mL/分)	positive モード																																																											
カーテンガス流量 (CUR、mL/分)	14																																																											
コリジョン反応ガス流量 (CAD、mL/分)	10																																																											
イオンスプレー電圧 (IS、V)	4.0																																																											
スキャンタイプ	5000																																																											
ソフトウェア	Scheduled MRM																																																											
	Analyst 1.5																																																											
	<table border="1"> <tr> <th></th> <th>Q1</th> <th>Q3</th> <th>DP(V)</th> <th>FP(V)</th> <th>CE(V)</th> <th>CXP(V)</th> </tr> <tr> <td rowspan="2">アコニチン</td> <td>定量イオン</td> <td>646.34</td> <td>586.5</td> <td>56</td> <td>370</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>確認イオン</td> <td>646.34</td> <td>105.1</td> <td>56</td> <td>370</td> <td>87</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">メサコニチン</td> <td>定量イオン</td> <td>632.52</td> <td>572.5</td> <td>51</td> <td>350</td> <td>47</td> </tr> <tr> <td>確認イオン</td> <td>632.52</td> <td>105.1</td> <td>51</td> <td>350</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">アトロピン</td> <td>定量イオン</td> <td>290.15</td> <td>124.3</td> <td>51</td> <td>350</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>確認イオン</td> <td>290.15</td> <td>93.1</td> <td>51</td> <td>350</td> <td>43</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">スコポラミン</td> <td>定量イオン</td> <td>304.07</td> <td>138.0</td> <td>36</td> <td>260</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>確認イオン</td> <td>304.07</td> <td>156.1</td> <td>36</td> <td>260</td> <td>23</td> </tr> </table>		Q1	Q3	DP(V)	FP(V)	CE(V)	CXP(V)	アコニチン	定量イオン	646.34	586.5	56	370	47	確認イオン	646.34	105.1	56	370	87	メサコニチン	定量イオン	632.52	572.5	51	350	47	確認イオン	632.52	105.1	51	350	75	アトロピン	定量イオン	290.15	124.3	51	350	35	確認イオン	290.15	93.1	51	350	43	スコポラミン	定量イオン	304.07	138.0	36	260	29	確認イオン	304.07	156.1	36	260	23
	Q1	Q3	DP(V)	FP(V)	CE(V)	CXP(V)																																																						
アコニチン	定量イオン	646.34	586.5	56	370	47																																																						
	確認イオン	646.34	105.1	56	370	87																																																						
メサコニチン	定量イオン	632.52	572.5	51	350	47																																																						
	確認イオン	632.52	105.1	51	350	75																																																						
アトロピン	定量イオン	290.15	124.3	51	350	35																																																						
	確認イオン	290.15	93.1	51	350	43																																																						
スコポラミン	定量イオン	304.07	138.0	36	260	29																																																						
	確認イオン	304.07	156.1	36	260	23																																																						

表4. 結果

化合物	添加回収試験結果		検量線 直線性の範囲 (ng/mL)	相関係数	最小検出量 (pg) S/N=3	マトリックス効果 比 (マトリックス標準 / 溶媒標準)
	平均回収率 (%)	RSDr (%)				
テトロドトキシシン	106*	3.0	1-50	1.000	0.35	1.14
リコリン	92	0.6	2-50	0.9998	0.26	0.94
アコニチン	92	1.0	0.5-100	0.9998	0.08	0.98
メサコニチン	93	2.3	0.5-200	0.9999	0.09	1.00
アトロピン	126	2.2	0.5-80	0.9983	0.16	0.80
スコポラミン	96	2.3	0.5-200	0.9999	0.10	0.93

*マトリックス比で補正

フュージョン分析によって表1の最適条件を得た。

移動相の送液条件はアイソクラティックとし、アセトニトリルの比率はマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液の面積比によるマトリックスの影響を考慮し検討した。アセトニトリルの比率が50%では面積比が0.63と低くマトリックスの影響があるとみられ、60、65、70%では面積比が1.15~1.20とほとんど変わらずマトリックスの影響が少なかった。アセトニトリルの比率60、65、70%のうち保持時間が最も短い60%とすることとした。

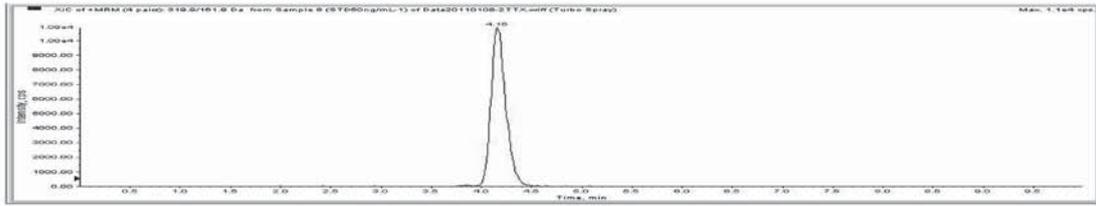
標準溶液の直線性、マトリックス効果、検出限界、添加回収試験の結果については表4に示した。添加回収試験結果はマトリックス効果が若干認められたので、マトリックス比で補正し平均回収率を求めた。また、定量イオンでのマスクロマトグラムを図1に示した。

2. リコリン

LC-MS/MSの測定条件はオペレーションソフトのインフュージョン分析によって表2の最適条件を得た。

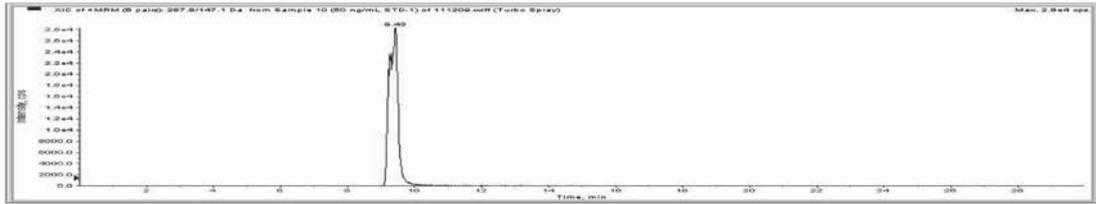
テトロドトキシシ

(a)



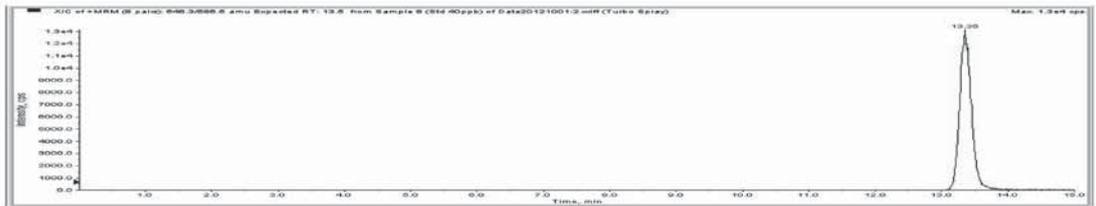
リコリン

(b)



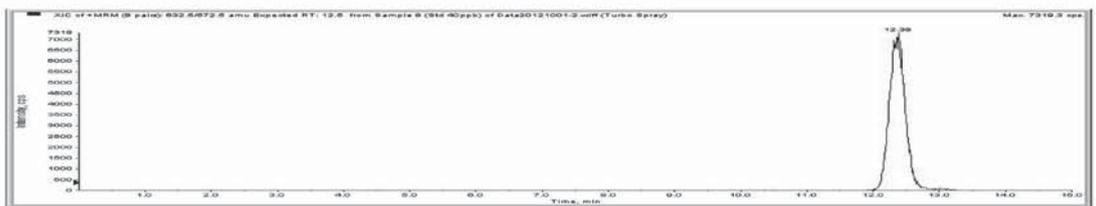
アコニチン

(c)



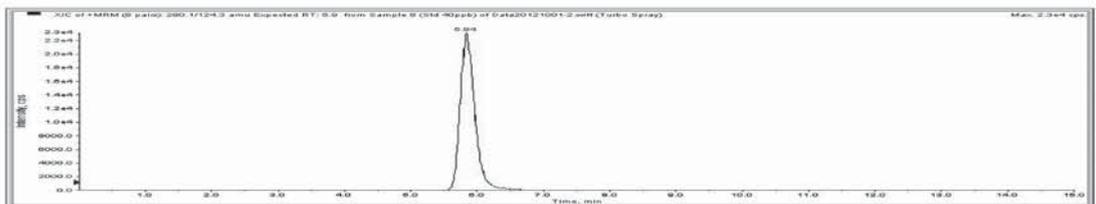
メサコニチン

(d)



アトロピン

(e)



スコポラミン

(f)

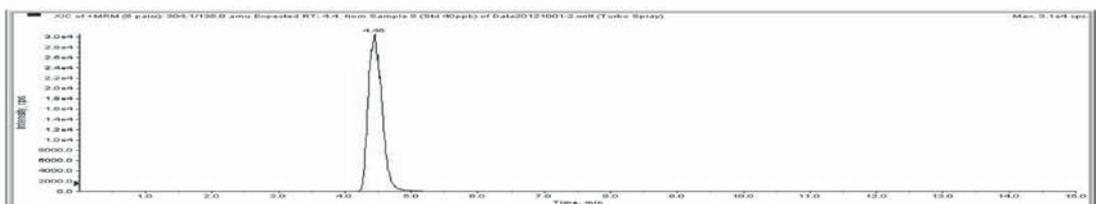


図 1. 標準溶液の LC-MS/MS のマスクロマトグラム

((a) 標準溶液 (50ng/mL, m/z 319.9 → 161.9), (b) 標準溶液 (50ng/mL, m/z 287.8 → 147.1), (c) 標準溶液 (40ng/mL, m/z 646.34 → 586.5), (d) 標準溶液 (40ng/mL, m/z 632.52 → 572.5), (e) 標準溶液 (40ng/mL, m/z 290.15 → 124.3), (f) 標準溶液 (40ng/mL, m/z 304.07 → 138.0))

標準溶液の直線性、マトリックス効果、検出限界、添加回収試験の結果については表4に示した。

また、定量イオンでのマスクロマトグラムを図1に示した。

3. アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミン

LC-MS/MSの測定条件はオペレーションソフトのインフュージョン分析によって表3の最適条件を得た。

標準溶液の直線性、マトリックス効果、検出限界、添加回収試験の結果については表4に示した。

また、定量イオンでのマスクロマトグラムを図1に示した。

考察

テトロドトキシン、リコリン、アコニチン、メサコニチン、アトロピン及びスコポラミンについてLC-MS/MS条件を決定し、本法による添加回収試験を行ったところ、回収率、併行精度とも結果は良好であった。

テトロドトキシンは毒力が10 MU/g以下の場合には食用に供しても健康を害するおそれがないとされている⁵⁾。添加した10 MU/g相当の濃度では回収率、併行精度は良好であった。また、10 MU/gの1/10である1 MU/g相当の0.22µg/gでも添加回収試験2試行を実施したところ、平均回収率はマトリックス比で補正して116%となり、本法で検出できることを確認した。

リコリンはスイセンの葉から坂本ら⁶⁾は3.1~41µg/g、上田ら⁷⁾は5.8~38µg/g検出しており、本法で検出することができる濃度である。

トリカブトの中毒に至る量については、笠原らはアコニチンの致死量1~2 mgの1/100と仮定すると0.01~0.02 mgとなり、おひたしに混入した食中毒事例でおひたし1gでアコニチン類44.5µgを含んでいたと報告している⁸⁾ことから、本法で検出することができると考えられる。

久野ら⁹⁾はトリカブトの根からアコニチン200µg/g、メサコニチン2000µg/g、チョウセンアサガオの根からアトロピン140µg/g、スコポラミン310µg/gを検出しており、本法で検出することができる濃度レベルである。

本法はこれら対象物質を迅速に検査できることが確認でき、食中毒事例が発生した際の検査には有効であると考えられる。

引用文献

- 1) 田中敏嗣. 2011. 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究 平成22年度 総括・分担研究報告書(調恒明), pp.47-57, 厚生労働省, 東京.
- 2) 田中敏嗣. 2012. 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究 平成23年度 総括・分担研究報告書(調恒明), pp.47-57, 厚生労働省, 東京.
- 3) 田中敏嗣. 2013. 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究 平成24年度 総括・分担研究報告書(調恒明), pp.25-42, 厚生労働省, 東京.
- 4) 田中敏嗣. 2013. 健康危機関連化合物特に自然毒の迅速かつ網羅的検査法の構築と精度管理に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究 平成22年度~24年度 総合研究報告書(調恒明), pp.67-81, 厚生労働省, 東京.
- 5) 厚生労働省監修. 2005. 食品衛生検査指針 理化学編, p.664, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京.
- 6) 坂本智徳, 赤木浩一. 2009. HILIC-MS/MSによるヒガンバナ科植物中のリコリンおよびガラントミンの分析. 福岡市保健環境研究所報, 35,89-92.
- 7) 上田泰人, 田中敏嗣. 2009. スイセンのLC-MS/MS分析について. 第46回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集, 172-173.
- 8) 笠原義正, 伊藤健. 2008. LC/MS/MSによる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, 49 (2), 76-81.
- 9) 久野恵子, 高井靖智, 橋爪崇, 山東英幸. 2011. 健康危機管理に対応した自然毒一斉分析法の検討 - 有毒植物およびきのこ19成分. 第48回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集, 118-119.