

LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討

(1) 植物毒リコリンの迅速分析

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 (衛生化学科)

【調査研究】

LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討

(1) 植物毒リコリンの迅速分析

Study for Rapid Analysis Method of Natural Poisons by LC/MS/MS

(1) Rapid Analysis of Plant Poison Lycorine

浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美 (衛生化学科)

Toyohiro Urayama, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura
(Department of Food and Drug Chemical Research)

要 旨

食中毒発生時には、原因究明のため早く検査結果を出すことが求められており、毎年発生している自然毒による食中毒に対し、LC/MS/MSを用いた迅速分析を検討したので報告する。

[キーワード：自然毒, リコリン, LC/MS/MS法]

[Key words : Natural Poisons, Lycorine, LC/MS/MS]

1 はじめに

スイセンの葉の誤食などの植物性自然毒による食中毒は毎年発生している。

自然毒による食中毒は致死率の高いものも多く、迅速な原因究明が求められている。しかし、通常の検査方法では抽出液の精製等に長時間を要し、迅速な対応は困難である。

そこで、今回、LC/MS/MSを用いた機器分析により、前処理工程を短縮した迅速分析法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 分析対象物質

厚生労働省が公表している過去の食中毒発生事件一覧¹⁾を参考に、事故が毎年発生しているリコリンを分析対象項目として選定した。

植物性自然毒であるリコリンは、ヒガンバナ、スイセンなどのヒガンバナ科の植物に含まれる有毒成分で、スイセンの葉をニラと間違えて調理してしまう食中毒が全国では毎年発生している。

2.2 試料

添加回収試験には、市販のニラを用いた。(写真1)

濃度測定用の試料として、当センター周辺の道路脇に自生するヒガンバナ(写真2~6)と、当センターにおいて生育させたスイセン(写真7~8)の葉と球根を12月に採取し使用した。なお、ヒガンバナは、晩夏から初秋に枝も葉も節もない花茎が地上に突出し花が咲き、花茎が消えて晩秋に葉が出てくる性質があり、花茎と葉を分析対象とし

たほか、球根は花期(9月採取)と葉期(12月採取)をそれぞれ分析することとした。



写真1
ニラ(市販品)(添加用)



写真2
ヒガンバナ(花期)



写真3
ヒガンバナ(葉期)



写真4
ヒガンバナ(葉と球根)



写真5
ヒガンバナ・花茎



写真6
ヒガンバナ・球根



写真7 スイセン



写真8 スイセン

2.3 試薬等

- 1) リコリン塩酸塩標準品：BIOMOL社製(自然毒共同研究²⁾で配布されたもの)
- 2) 超純水：ELGA社製超純水製造装置PURELAB flexで精製

- 3) メタノール：LC/MS用
- 4) 酢酸アンモニウム：試薬特級
- 5) 0.20 μ mメンブランフィルター：Millex-LG, 0.20 μ m, 4 mm (Millipore社製)

2.4 装置及び測定条件

1) LC

HPLC：島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム
 カラム：Waters社製 XBridge C18 3.5 μ m (2.1mm ID.x15cm)

カラム温度：40℃

移動相：A液（5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液），

B液（5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液）

グラジエント条件：A/B=85/15（0-0.1min）→15/85（10-20min）→85/15（20.1-35min）

移動相流量：0.2mL/min

試料注入量：5 μ L

2) MS/MS

MS：Applied Biosystems製 API3200 QTrap

インターフェース：Turbo V source

測定法：MS/MSモード

イオン化モード：ESI positive mode

イオン源温度：600℃

イオン化電圧：5500V

測定イオン（precursor ion>product ion）：

（定量）288.1>147.1（確認）288.1>119.3, 288.1>91.1

2.5 前処理操作

自然毒共同研究²⁾で示された操作を参考に次のとおり前処理した。

粉碎した試料約5gを50mLポリプロピレン遠沈管に取り、メタノール20mLを加え3分間ホモジナイズした。

3000rpmで5min遠心分離後、上清をGFPろ紙で減圧ろ過した。残渣が残ったポリプロピレン遠沈管にメタノール20mLを加え3分間ホモジナイズし、GFPろ紙で減圧ろ過し、先のろ液に合わせた。更に、ろ紙上の残渣をメタノール5mL×3回で洗浄・減圧ろ過し、先のろ液に合わせた。ろ液にメタノールを加えて100mLに定容し、抽出溶液とした。

抽出溶液から200 μ L分取し、メタノールを加えて100mLに定容し、そこから約2mLを分取し0.20 μ mメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.6 標準液の調製

リコリン塩酸塩標準品5.63mg（リコリン5mg相当）をメタノールで10mLにメスアップしたものを500 μ g/mL標準液とした。

2.7 検量線溶液の調製

リコリン標準液をメタノールで順次希釈し、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ng/mLの検量線溶液を調製した。

なお、50及び100ng/mLは直線性が無かったため棄却し、0.1~20ng/mLの検量線とした。

3 結果及び考察

3.1 クロマトグラムと検量線

LC/MS/MSクロマトグラムを図1に、検量線を図2に示す。シャープなピークのクロマトグラムが得られ、0.1~20ng/mLの範囲で $r^2=0.9996$ の良好な直線が得られた。なお、50ng/mL及び100ng/mLは、直線から外れていることが確認されたため、検量線から外すこととした。

3.2 添加回収試験結果

結果を表1に示す。厚生労働省の妥当性評価ガイドライン³⁾で目標値とされる回収率（真度）70~120%及び相対標

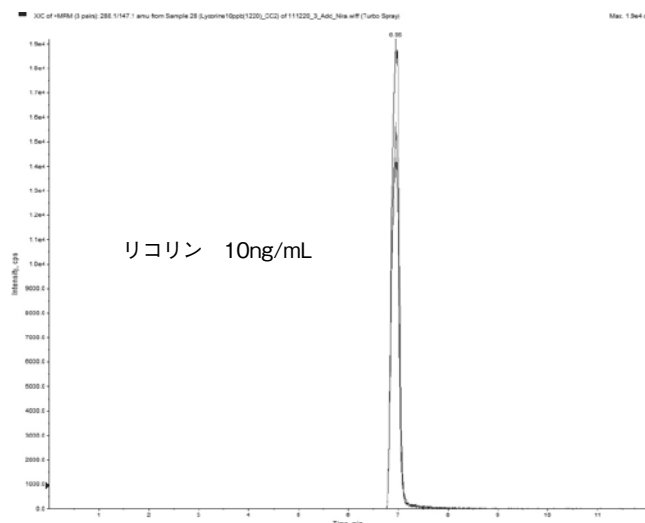


図1 リコリンのLC/MS/MSクロマトグラム

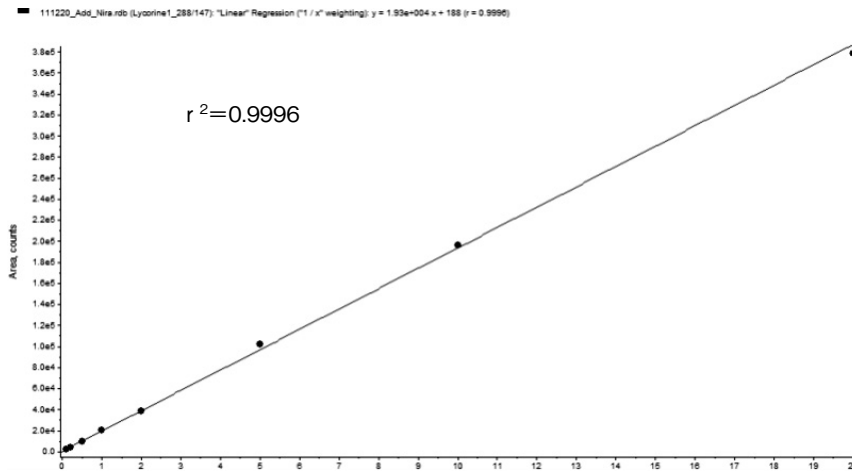


図2 リコリンの検量線 (0.1~20ng/mL)

準偏差 (併行精度) 10%以下のいずれも満たしており、良好な結果であった。

表1 リコリンの添加回収試験結果

	平均回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
50 μ g/g添加 (n=5)	95.8	2.2
5 μ g/g添加 (n=2)	98.7	2.4

3.3 実試料の濃度測定

結果を表2に示す。ヒガンバナの球根及び葉の測定結果は、(独)農業環境技術研究所の研究報告⁴⁾「ヒガンバナの生の鱗茎(球根)中に0.5mg/g (=500 μ g/g)、生葉中に0.3mg/g (=300 μ g/g)」とほぼ一致していた。また、球根中のリコリン濃度は、花期と葉期で違いは見られなかった。

4 まとめ

植物毒リコリンについて、LC/MS/MSを用いた迅速分析法を検討し、次のことがわかった。

- 1) リコリンを高感度かつ迅速に分析でき、添加回収試験結果も厚生労働省の妥当性評価ガイドラインの目標値を満足する良好な結果であった。
- 2) 実際のヒガンバナの濃度測定をしたところ、測定値は文献値とほぼ一致しており、本分析法が実試料にも適用可能と推察された。

今後も、対象物質の追加、定量性の向上等について研究していく予定である。

表2 リコリンの実試料測定結果

(n=2)

		定量値 (ng/mL)	試料量 (g)	最終液量 (mL)	平均濃度 (μ g/g)	相対標準 偏差 (%)
ヒガンバナ	茎(花下)	9.10~9.42	5.07~5.12	50,000	90.9	1.75
	葉	4.56~4.64	5.00~5.01	250,000	230	1.09
	球根(花期)	9.29~9.34	5.09~5.12	250,000	456	0.04
	球根(葉期)	8.81~8.98	5.02~5.17	250,000	436	0.73
スイセン	葉	16.9~18.1	5.02~5.16	50,000	172	2.91
	球根	4.37~4.68	5.05~5.13	250,000	222	5.95

文 献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 2) 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・分担研究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), 平成23年度総括・分担研究報告書, 47-57, 2012
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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について, 食安発第1115001号, 平成19年11月15日, 2007
- 4) ヒガンバナの他感作用とその作用物質リコリンおよびクリニンの同定,
http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result15/result15_16.html