

LC/MS/MSによる食品中のアトロピン，スコポラミンの迅速定量

山辺真一，肥塚加奈江，田邊英子，北村雅美，今中雅章（衛生化学科）

【調査研究】

LC/MS/MSによる食品中のアトロピン，スコポラミンの迅速定量

Rapid Determination of Atropine and Scopolamine in Foods using LC/MS/MS

山辺真一，肥塚加奈江，田邊英子，北村雅美，今中雅章（衛生化学科）

Sinichi Yamabe, Kanae Koeduka, Eiko Tanabe, Masami Kitamura, Masaaki Imanaka

要 旨

濃縮，蒸発乾固等の操作を必要とせず，迅速かつ高精度な食品中アトロピン，スコポラミンの同時分析法を開発した。生ゴボウ，キンピラゴボウを用いて添加回収実験を行ったところ回収率，相対標準偏差ともに良好であった。

[キーワード：チョウセンアサガオ，ゴボウ，アトロピン，スコポラミン，LC/MS/MS]

[Key words : *Datura metel*, *Arctium lappa* L, atropine, scopolamine, LC/MS/MS]

1. はじめに

アトロピン，スコポラミンはチョウセンアサガオ，ハシリドコロ，ヒヨス，ベラドンナなどのナス科植物に含まれるトロパンアルカロイドの一種であり，両者ともに微量の場合は医薬品成分として使用されるが，一定量以上の摂取で頻脈，呼吸困難，幻覚などの中毒症状を示す¹⁾。上記植物のうち，チョウセンアサガオについては，根茎がゴボウと酷似していることから，全国的には毎年中毒事例が報告²⁾されており，岡山県内でも数年毎に中毒事例が発生している。平成18年度には5月に高梁市で，11月に旧御津郡建部町（現岡山市建部町）の2件が発生した。

チョウセンアサガオの誤食が疑われる場合は，喫食物中のアトロピン，スコポラミンの定量を衛生試験法等^{3,4)}を参考に行っている。この方法は抽出効率，精製能が優れた良い方法であるが，GC測定を前提としているため，エーテル抽出3回，稀塩酸による逆抽出，更にエーテル抽出後，濃縮，測定の工程により，煩雑で抽出濃縮操作に約1日を要している。食中毒事例の場合には，一刻も早い結果が要求されるので，今回，簡便な抽出および精製後LC/MS/MSにより測定を行う方法を試み，良好な結果を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

添加回収試験には生ゴボウの根茎および，それを調理

して作成したキンピラゴボウを粉碎して用いた。

2.2 試薬及び標準液

硫酸アトロピン，臭化水素酸スコポラミン標準品：

和光純薬(株)製特級試薬

その他の試薬：残留農薬分析用，LC/MS用試薬を用いた

固相カラム：Waters製 オアシスMCXカラム

500 mg/6 cc

標準原液(1000 mg/L)：硫酸アトロピン12.0 mg（アトロピンとして10.0 mg），臭化水素酸スコポラミン13.3 mg（スコポラミンとして10.0 mg）を正しく秤量し，個別にメタノールに溶解して10 mLとする。

混合標準液(10 mg/L)：標準原液各1 mLを100 mLメスフラスコに採りメタノールで定容する

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 HPLC条件

(装置) 島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム
(分析カラム) Supelco製 Discovery HS F5, 3 μ m,

150 x 2.1 mm

(移動相流量) 0.2 mL/min

(注入量) 5 μ L (カラム温度) 40 $^{\circ}$ C

(移動相)

5mM 酢酸アンモニウム含有H₂O：5mM 酢酸ア

ンモニウム含有CH₃OH 20:80

Total run time : 15min

2.3.2 LC/MS/MS条件

(装置) Applied Biosystems 製 API3200 QTrap
LC/MS/MS system

(インターフェース) Turbo V source

(イオン化モード) ESI positive mode

(イオン源パラメーター)

Curtain Gas : 30 psi , Collision Gas : 5psi ,

IonSpray Voltage : 4500 V Temperature : 600

℃ , Ion Source Gas1 : 70 psi , Ion Source Gas2 :

80 psi Interface Heater : ON

(測定モード) : MRM法

MRMの測定条件は自動最適化法(アプライド)により求め、自動最適化の結果より表1のとおり親イオン、子イオン(定量、定性用)を決定した。

表1 モニターイオン

	分子量	親イオン(m/z)	子イオン(m/z)	
			定量イオン	定性イオン
スコポラミン	303.1	304.0	138.0	103.0
アトロピン	289.2	291.1	124.0	93.0

2.4 添加回収

図1, 2に示す方法により抽出および精製方法を検討した。まず、試料をミキサーで粉碎均一化した後、100mLコニカルビーカーへ5g採取し2MIX混合標準液を0.5mL添加した。(混合標準液の濃度は実際の測定例を参考に生ゴボウの場合2500 μ g/L, キンピラゴボウの場合は250 μ g/Lとした。)30分経過後0.01N HCl 10mL, メタノール40mLを加えポリトロンでホモジナイズした。次に吸引ろ過し、残渣をコニカルビーカーに戻し0.01N HCl 5mL, メタノール25mLを加え再度ホモジナイズ後吸引ろ過し、ろ液を最初のろ液に合わせ100mLに定容した。生ゴボウの場合はこれをメタノールで100倍程度希釈し測定液とした。キンピラゴボウ等油分を含む試料の場合は、この抽出液に精製操作を加えた。精製は抽出液2mLを試験管に採り、0.1N HCl 8mL, ヘキサン2mLを加えて振とう、静置後ヘキサン相を除去する。次に、メタノール10mL, 水5mLでコンディショニングしたOasis MCXカラムに負荷し、0.1N HCl 4mL, メタノール3mL, 水3mLで洗浄した後、5% NH₄OH メタノール4mLで溶出した。溶出液を10mLにメタノールで定容し測定液とした。

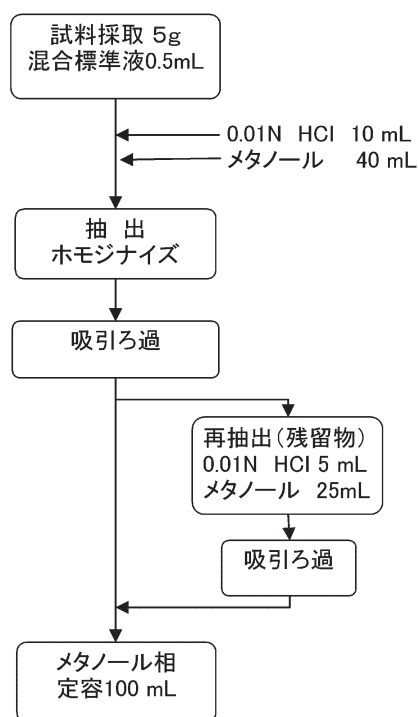


図1 抽出フロー

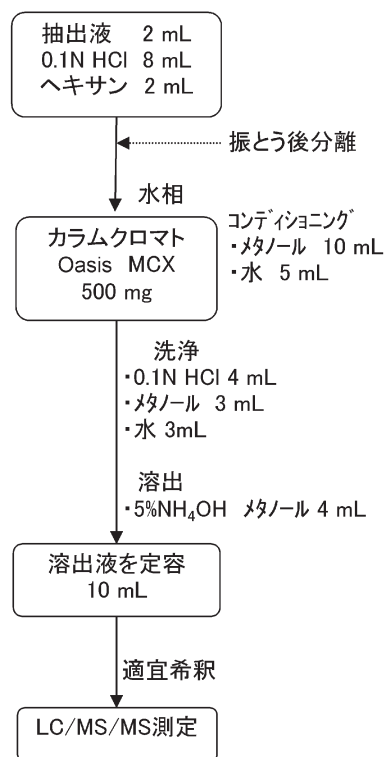


図2 精製、測定フロー

3 結果及び考察

3.1 HPLC条件および最小検出量の検討

アトロピン、スコポラミンの分離のため最初はC18系のLCカラムを試したが、テーリング、半値幅が大きいなどピーク形状が悪かった(図3, 下図)。一方フッ素化フェニル基を持ち、低疎水性化合物に対して大きな保持を示すとされる^{5,6)} Hilic系のDiscovery HS F5カラムを使用したところ、図3上段のクロマトとなり良好であったので以後の検討にはこのカラムを使用することとした。

Discovery HS F5カラム使用時の最小検出量(S/N=3, 注入量: 5 μL)を求めたところアトロピンの場合0.0009ng, スコポラミンの場合0.00014ngとなり、スコポラミンの方が6倍程度感度が良かった。

3.2 抽出溶媒の検討

抽出溶媒は抽出後の油分除去としてヘキサン分配を行うことを考慮し、アセトニトリル、およびメタノールの2種を検討した。表2のとおり抽出効率に大差なかったが、メタノールの方が若干良かったのでメタノールを用いることとした。

表2 抽出溶媒別の回収率

溶媒	回収率	
	アトロピン	スコポラミン
アセトニトリル	98.6%	91.8%
メタノール	103.2%	95.5%

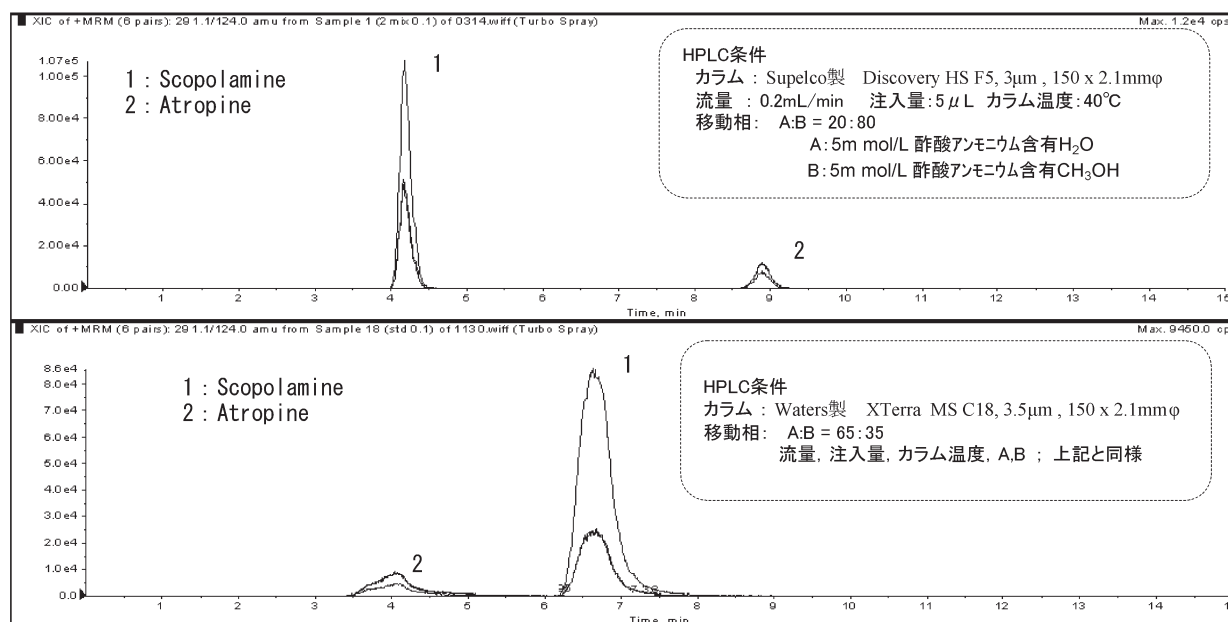


図3 混合標準液のクロマトグラム

3.3 固相カラムの検討

クリーンアップに使用する固相カラムの選定に当たって、まず対象の2物質は共にアルカロイドであり3.1 HPLC条件の検討にも記載したとおり、極性が高くC18カラム等ではほとんど保持されないことが予想されたので、陽イオン交換モード固相である、Oasis MCX固相を検討した。2mix標準液(0.2μg/mL) 2mLと0.1N HCl 8mLを混合したものを図2のとおりコンディショニングした固相に負荷し、洗浄、溶出したときの回収率を求めた。回収率は、アトロピン101.7%, スコポラミン101.1%で良好な値であったので、このカラムおよび条件で行う

こととした。

3.4 添加回収

生ゴボウおよびキンピラゴボウにアトロピンおよびスコポラミンを添加して添加回収実験を行ったところ、表3のとおりとなった。生ゴボウの場合アトロピン、スコポラミンの回収率が106.7%, 99.3%, 相対標準偏差(RSD)は1.2%, 1.1%と非常に良好であった。キンピラゴボウの場合は回収率が95.9%, 95.4%, RSDは2.1%, 1.1%と良好であったが、生ゴボウの場合と比較すると若干回収率が低下した。これは油分除去のためヘキサン分配を行ったがその影響と考えられた。

表3 添加回収率

	アトロピン		スコボラミン	
	平均回収率	RSD	平均回収率	RSD
生ゴボウ	106.7%	1.2%	99.3%	1.1%
キンピラゴボウ	95.9%	2.1%	95.4%	1.1%

(n = 5)

3.5 確認試験

検出された場合の確認はLC/MS/MSでプロダクトイオンのスキャン測定を行った。測定に当たっては、アトロピン、スコボラミンの分子量±1の質量数を親イオンに設定し、MS/MSスペクトルに大きな影響を与えるCE (Collision Energy) を3段階に変化させたものを同時に

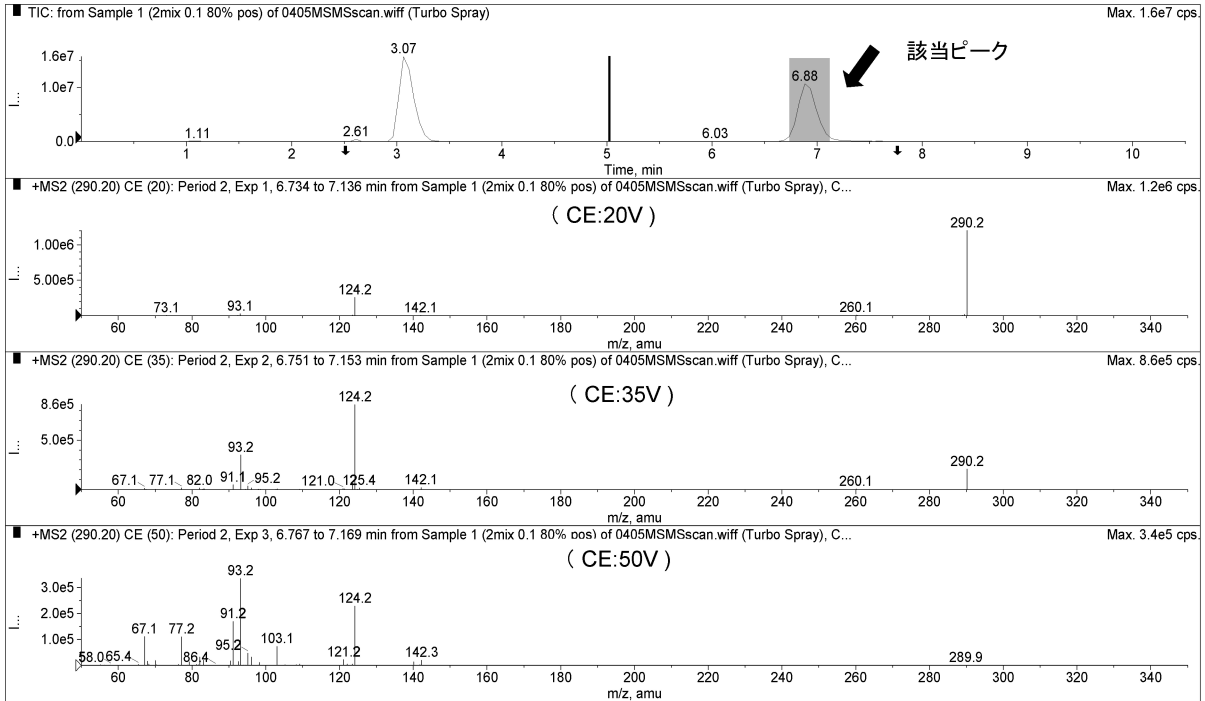


図4 アトロピン標準液のMS/MSスペクトル

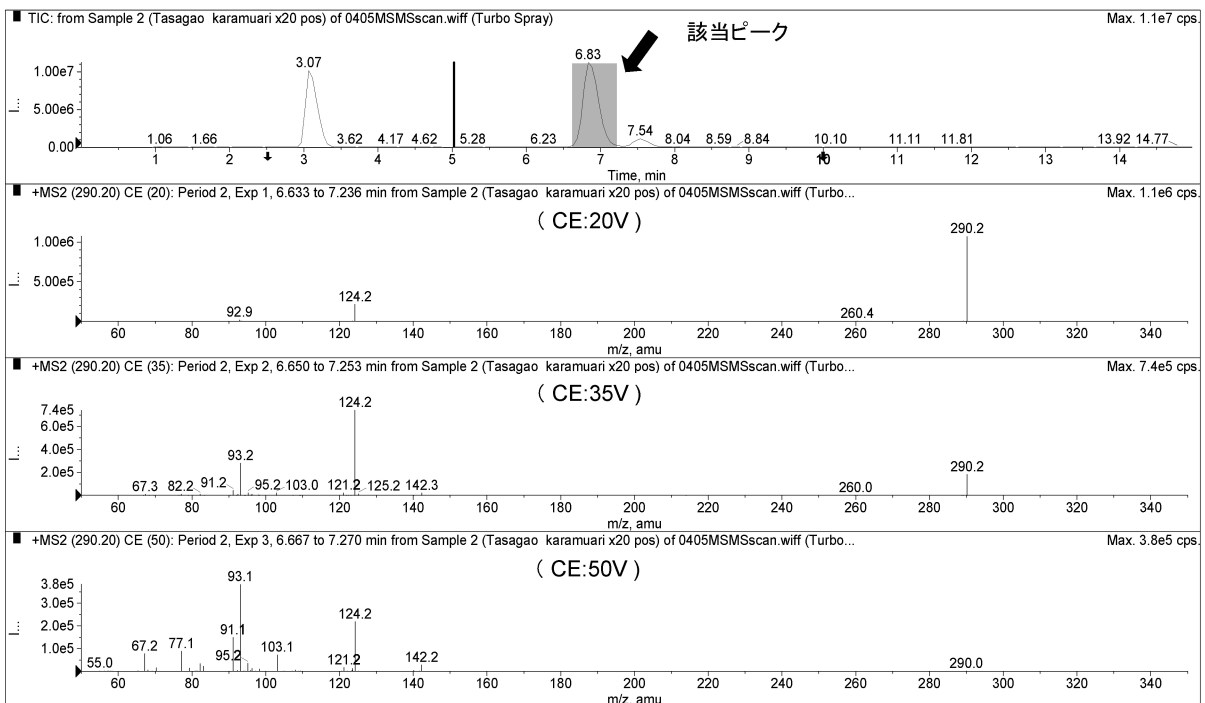


図5 チョウセンアサガオ抽出液のMS/MSスペクトル (アトロピン)

測定した。なお、ポジとネガは別々に測定した。

図4, 5に標準液およびチョウセンアサガオ抽出液のアトロピン相当部分のMS/MSスペクトル(ポジ)を示した。標準液, 抽出液共にCE:20 Vでは親イオンの290.2が卓越しているが, CE:35 Vでは124.2, 93.2の方が大きくなっている。CE:50 Vでは93.2, 124.2の大きさが逆転

し親イオンは殆ど見えなくなった。いずれのCE値でも両者のMS/MSスペクトルは酷似していることから抽出物はアトロピンと確認された。

図6, 7に標準液およびチョウセンアサガオ抽出液のスコポラミン相当部分のMS/MSスペクトル(ポジ)を示した。標準液, 抽出液共にCE:20 Vでは親イオンの

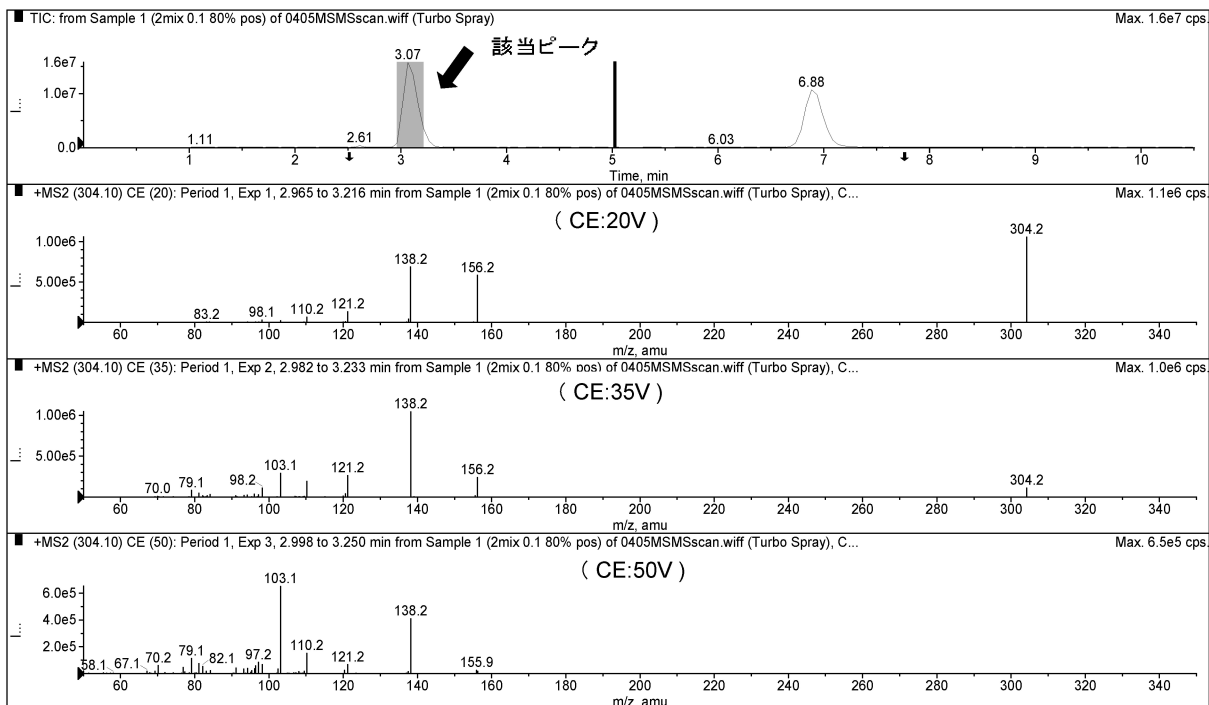


図6 スコポラミン標準液のMS/MSスペクトル

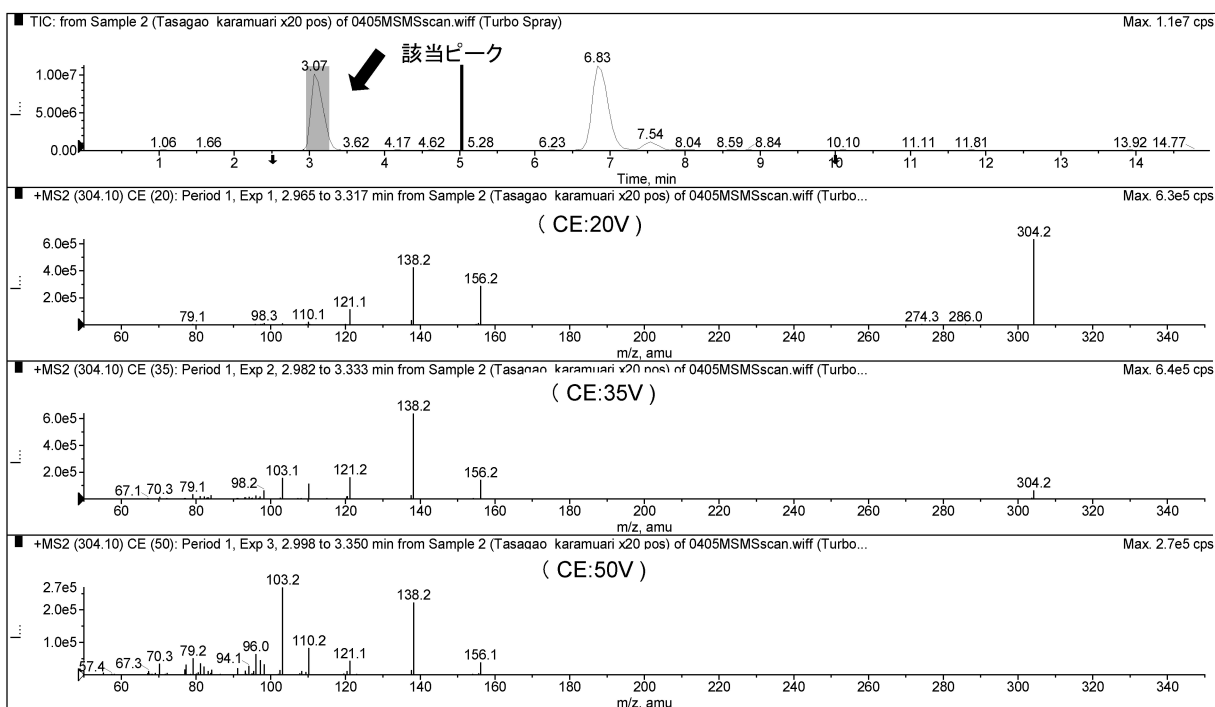


図7 チョウセンアサガオ抽出液のMS/MSスペクトル(スコポラミン)

304.22が最大ピークとなっているが、CE:35 Vでは138.2, が最大となり、CE:50 Vでは103.2, 138.2の順となり、親イオンは見えなくなった。両者のMS/MSスペクトルは酷似していることから抽出物はスコポラミンと確認された。

なお、アトロピン、スコポラミン共にネガではピークが認められなかった。

3.6 分析所要時間

前述のとおり衛生試験法による方法では抽出等の前処理に6～7時間（5検体）が必要であるが、今回検討した方法では約3時間（5検体）で完了し、1/2に短縮された。

4 まとめ

- 1) 対象2物質の分離はC18系よりもHilic系のDiscovery HS F5の方が良好であった。
- 2) 抽出溶媒はメタノール、アセトニトリルに大差なく良好であった。
- 3) クリーンアップ用固相カラムは強陽イオン交換型が適当であった。
- 4) 添加回収実験では生ゴボウ、キンピラゴボウ共に良好な回収率、RSDを示した。

- 5) 抽出等、前処理の所要時間が約1/2に短縮された。

文 献

- 1) 刈米達夫, 木村康一監修: 廣川薬用植物大事典, 221-222, 281-282, 324-325, 株式会社廣川書店, 東京, 1993
- 2) 平成17年食中毒発生事例: 厚生労働省食品安全部監視安全課
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/05hassei/xls/jirei.xls>
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解2005, 257-259, 金原出版株式会社, 東京, 2005
- 4) 石原島栄二: 植物毒による食中毒事例, 全国自然毒中毒講演会・研修会抄録集, 49-54, 2006
- 5) 宮本紫織, 井上 智, 小笠原光憲, 金本 昭, 大瀬戸光明ら: 親水性相互クロマトグラフィー (HILIC) によるアラントインの分析, 平成16年度愛媛衛環研年報, 38-41, 2004
- 6) Discovery HS F5のLC/MSでの優位性, http://www.sigma-aldrich.co.jp/supelco/LC/no_03/no_03_HS_F5.pdf