

食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技術の開発に関する研究  
ーウリ科植物に含まれる苦味成分ククルビタシン分析法の検討ー

吉岡敏行, 赤木正章, 北村雅美, 浅田幸男, 難波順子

【調査研究】

# 食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技術の開発に関する研究

## －ウリ科植物に含まれる苦味成分ククルビタシン分析法の検討－

Study on the development of analytical techniques of hazardous chemicals contained in food and pharmaceuticals, etc.

－ Study of the analysis method of bitter component cucurbitacin that is included in the cucurbits －

吉岡敏行, 赤木正章, 北村雅美, 浅田幸男, 難波順子(衛生化学科)

Toshiyuki Yoshioka, Masaaki Akaki, Masami Kitamura, Yukio Asada, Junko Namba  
(Food and Drug Chemical Research Section)

### 要 旨

ウリ科植物に含まれる苦み成分ククルビタシンの分析法について検討した。メタノール抽出, 酢酸エチル再抽出後, カートリッジカラムで精製し, 液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)で測定した。キュウリを用いた添加回収試験の結果, 82～105%の回収率が得られた。開発した分析法によりユウガオのツルの部分を分析したところ, ククルビタシンBが19mg/kg検出された。

[キーワード: ウリ科植物, 自然毒, ククルビタシン, 液体クロマトグラフ質量分析計]

[Key words: Cucurbit, Natural poison, Cucurbitacin, LC/MS]

### 1 はじめに

ウリ科植物には, キュウリ, ズッキーニ, カボチャ, メロン, ユウガオ(ヒョウタン)等があり, 世界中で食用や鑑賞用等に広く栽培されている。しかし, 特に, 観賞用ウリ科植物には苦味成分であるククルビタシンを多く含んでいる場合がある。ククルビタシンは四環式テルペノイドで, 約40種類のククルビタシンが知られている<sup>1)</sup>。この物質は, 誤って喫食した場合には, 嘔吐や下痢を伴う重篤な胃腸不全を引き起こす可能性があり, 日本では過去50年間にククルビタシン高含量のユウガオの喫食やヒョウタンとの誤食により, 8件の食中毒が発生し, 35人の患者が発生している<sup>2, 3)</sup>。岡山県でも平成26年7月に備前県民局管内でズッキーニに含まれるククルビタシンが原因と強く疑われた苦情が発生<sup>4)</sup>したことから, ククルビタシンの分析法を検討した。

ククルビタシンの分析は, 既存文献では溶媒抽出後, 薄層クロマトグラフィーで分離・精製し, HPLCやLC/MSで検出する方法が報告されている<sup>5~8)</sup>。しかし, 薄層クロマトグラフィーは定量性が乏しいことが推測されることから, 今回, カートリッジカラムによる精製方法

について検討し, 定量性のある分析方法が確立できたので報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 標準物質

分析法の検討に使用した4種類のククルビタシンはChroma Dex製で, その分子量と構造式を表1と図1に示す。これらの標準物質を用いて分析法の検討を行った。各ククルビタシン1mgを精秤し, メタノールで正確に10mLとし, 100 $\mu$ g/mLの標準原液を調製した。各標準原液1mLを分取し, メタノールで正確に10mLとし, 10 $\mu$ g/mLの混合標準溶液を調製した。混合標準溶液を

表1 標準物質

物質名	分子式	分子量
ククルビタシンB	C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	558.4
ククルビタシンD	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	516.3
ククルビタシンE	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	556.3
ククルビタシンI	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub>	514.3

メタノールで希釈して10～200ng/mLの検量線用標準液を調製した。

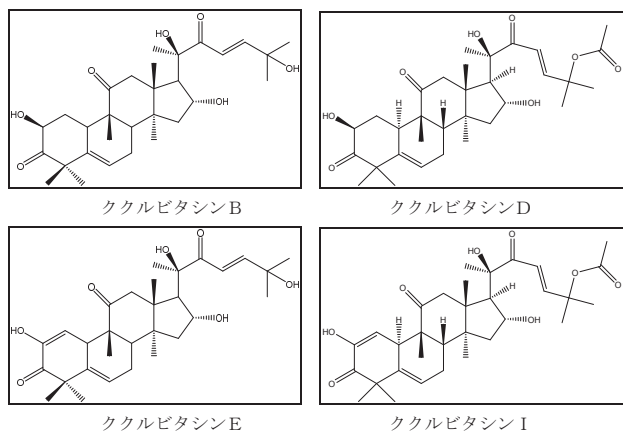


図1 構造式

## 2.2 装置及び測定条件

装置は、Applied Biosystems製 API3200 Qtrapを使用した。LC/MSの測定条件は表2のとおりである。

表2 LC/MSの測定条件

<p>HPLC:島津製 LC-20A 高圧グラジェントシステム          カラム: Waters社製 XTerra MS C18 3.5 m (2.1mmI.D.×15cm)          カラム温度: 40℃          移動相: アセトニトリル:水=1:1          移動相流量: 0.2mL/min          試料注入量: 5 L</p>	
<p>MS: Applied Biosystems製 API3200 QTrap          インターフェース: Turbo V source          測定法: Q1スキャンモード</p>	
○ 条件1	<p>イオン化モード: ESI positive mode          イオン源温度: 600℃          イオン化電圧: 5500V</p>
○ 条件2	<p>イオン化モード: ESI negative mode          イオン源温度: 600℃          イオン化電圧: -4500V</p>

## 2.3 前処理方法

検討した分析フローを図2に示す。精製方法は、薄層クロマトグラフィー(Merck製 TLC silica gel 60 F<sub>254</sub>:ガラスプレート)と3種類の市販カートリッジカラムSUPELCO製 Envicarb/LC-NH<sub>2</sub>, Agilent製 Mega Bond Elute-PSA (1g), Agilent製 Bond Elute C18 (1,000mg)について検討した。

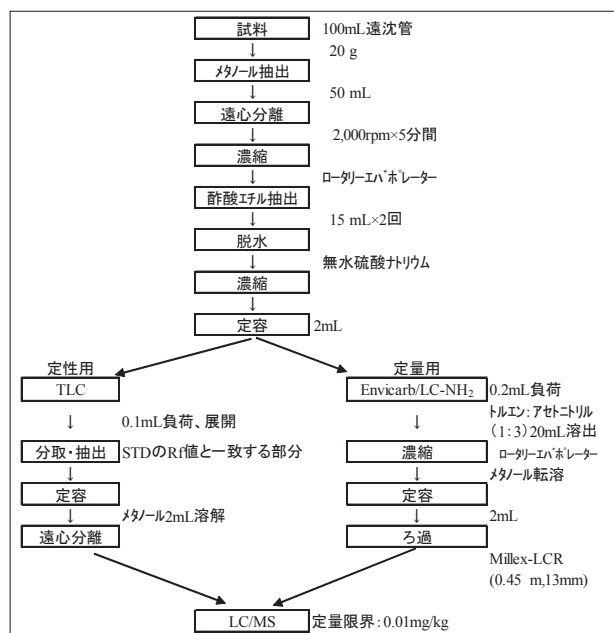


図2 分析フロー

## 3 検討結果及び考察

### 3.1 LC/MS測定について

ククルピタシンのイオン化法はESIを選択した。MS/MS法で測定を試みたが、最適化できなかったため、スキャン法により測定した。4種類のククルピタシン各100ng/mLを含む標準液を測定したポジティブモードとネガティブモードのクロマトグラムを図3に示す。ク

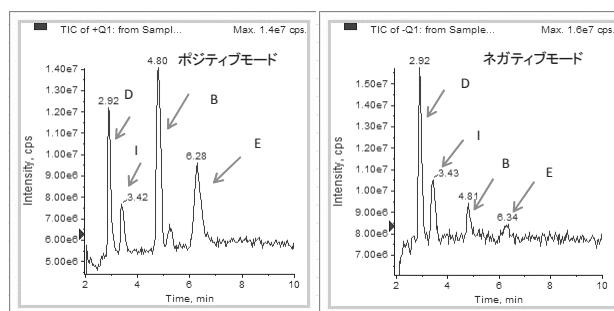


図3 ククルピタシンのクロマトグラム

ルピタシンD, ククルピタシンI, ククルピタシンB及びククルピタシンEの順にピークが確認できた。なお、ベースラインはポジティブモードのほうが小さかった。

図4にポジティブモードとネガティブモードのマスペクトルを示す。ネガティブモードでは、4種類のククルピタシンすべてで[M-H]<sup>-</sup>が観測された。

表3にモニターイオンを示す。定量は、ポジティブモードで測定を行い、それぞれのベースピークを定量イオンとした。定性イオンは、各ククルピタシンの[M+Na]<sup>+</sup>

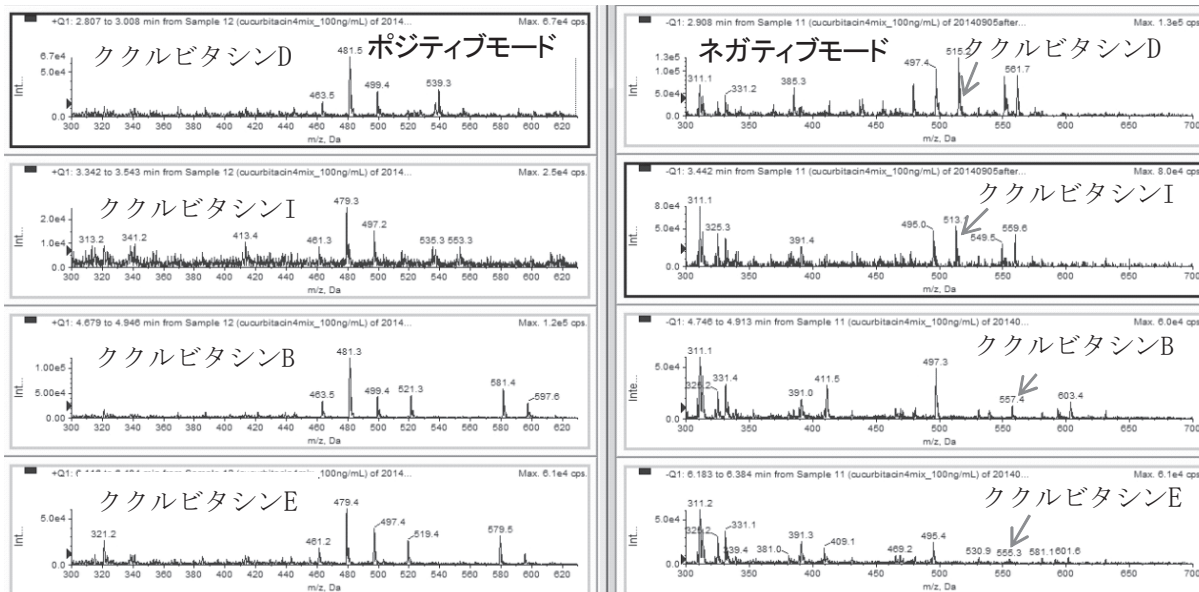


図4 ククルビタシンのマススペクトル

表3 モニターイオン

物質名	定量イオン(m/z)	定性イオン(m/z)
ククルビタシンD	481	539
ククルビタシンI	479	497
ククルビタシンB	481	521, 581, 597
ククルビタシンE	479	519, 579

等の特有のイオンとした。ただし、ククルビタシンIでは特有の定性イオンが観測されなかったため、ククルビタシンEでも観測される m/z 497 を定性イオンとした。

### 3.2 検量線

ククルビタシンの検量線を図5に示す。10～200ng/mLの濃度範囲で直線性 ( $r^2 > 0.9985$ ) が確認され、定量下限は 0.01mg/kg とした。

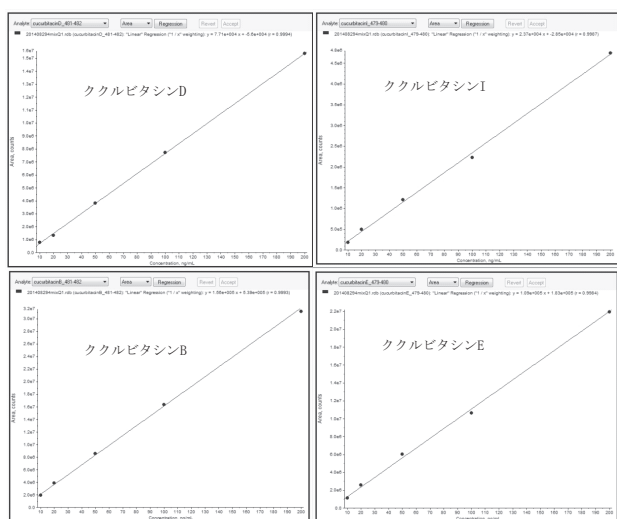


図5 検量線

### 3.3 カートリッジカラムの検討

3種類の市販カートリッジカラム (PSA, C18, Envicarb/LC-NH<sub>2</sub>) は、厚生労働省の残留農薬の通知試験法に採用されているもので、PSAは糖や脂肪酸、有機酸等の除去に、C18は無極性物質の除去に、Envicarb/LC-NH<sub>2</sub>は色素等の除去を目的に使用されている。各カラムにククルビタシンBを100ng添加し、溶出溶媒20mLで溶出し、溶出液を濃縮し、メタノールに置換し1mLに定容した後、LC/MSで測定した。溶出溶媒は、PSAはアセトン：ヘキサン(1：1)、C18とEnvicarb/LC-NH<sub>2</sub>はトルエン：アセトニトリル(1：3)を使用した。添加回収率を図6に示す。いずれのカートリッジカラムも標準物質の添加回収率が60%程度であったが、今回は試料の精製効果がもっとも期待できるEnvicarb/LC-NH<sub>2</sub>を採用した。

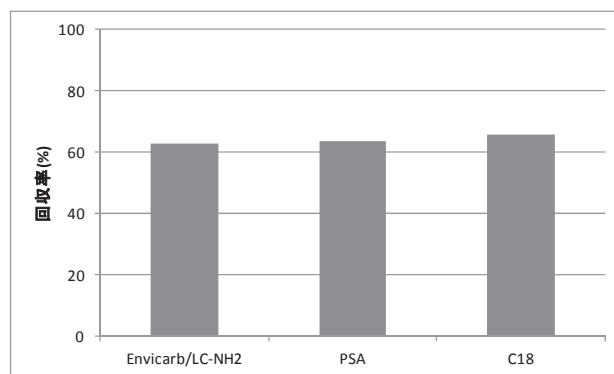


図6 カートリッジカラムの回収率

### 3.4 薄層クロマトグラフィー (TLC) の検討

各クルビタシン標準物質 30  $\mu$ g を TLC プレートにスポットし、クロロホルム：酢酸エチル = 1：1 で展開した。標準物質を展開した TLC を図 7 に示す。

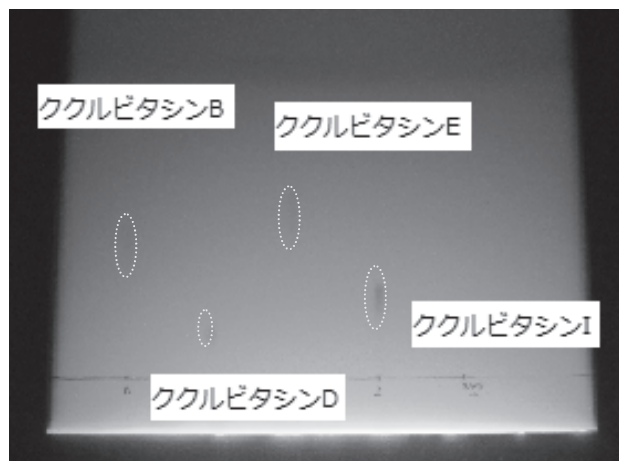


図 7 標準物質の展開 TLC

紫外線 (254nm) を照射し、蛍光が消失した部分がクルビタシンの展開位置を示している。Rf 値はクルビタシン D が 0.10, クルビタシン I が 0.19, クルビタシン B が 0.33, クルビタシン E が 0.41 であった。蛍光が消失した部分を掻き取り、メタノールに再溶解し、LC/MS で測定したところ、回収率は 20 ~ 40% 程度であった。したがって、TLC は定量的な検査には問題があるため、定性用の確認検査法として位置づけた。

### 3.5 添加回収試験

添加回収試験は、キュウリとカレーを用いて実施した。細切したキュウリ 20g (カレーの場合は 10g) に各クルビタシンを 2  $\mu$ g 添加し、分析フローに従い検査した。添加回収試験結果を図 8 に、クロマトグラムを図 9 に示す。キュウリの回収率は、82 ~ 105% と非常に良好な結果であった。一方、加工食品のカレーの回収率は、26 ~ 67% であり、特に、クルビタシン E の回収率は非常に悪かった。この原因は、カレーには油脂等の様々なマトリックスが含まれており、Envicarb/LC-NH<sub>2</sub> 処理だけでは除去しきれない妨害成分が残存し、LC/MS 測定の際にイオン化抑制が生じ、見かけ上回収率が低くなったものと推測された。回収率を向上させるためには、試料量を少なくしたり、精製工程を追加したり、マトリックス検量線の採用等が考えられる。

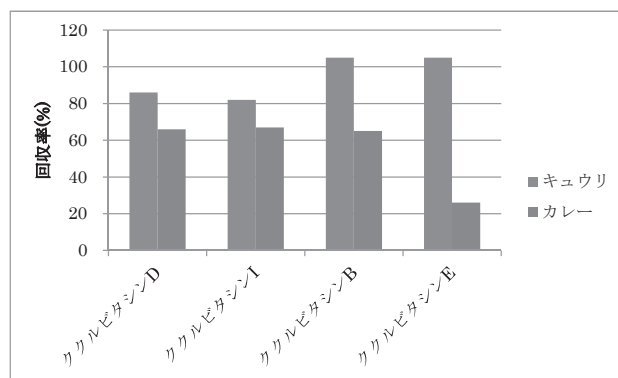


図 8 添加回収試験結果

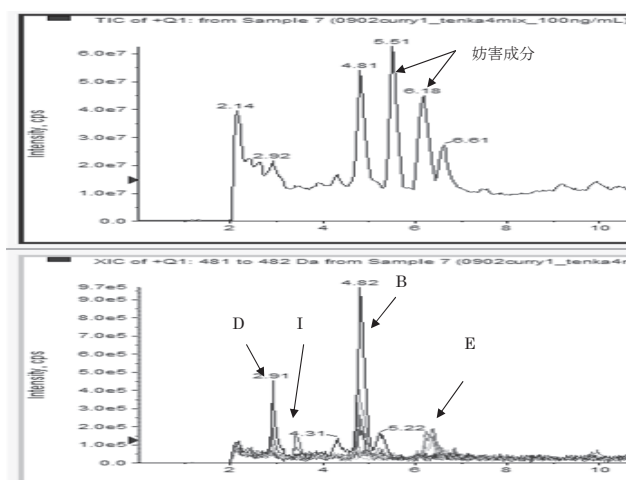


図 9 カレーのクロマトグラム  
(上段：TIC, 下段：m/z 479,481)

### 3.6 ユウガオの検査

かんぴょうに加工されるユウガオは、同一種のヒョウタンからクルビタシンの少ない品種を選別した変種である<sup>3)</sup>。近所で栽培されたユウガオを入手して官能検査を行ったところ、実の部分は全く苦みを感じなかったが、ヘタからツルの部分はしびれるような苦みがあった。したがって、実の部分とツルの部分に分けてクルビタシンを検査した。その結果、実の部分からはクルビタシンはいずれも検出されなかったが、ツルの部分からは図 10 に示すようにクルビタシン B が 19mg/kg 検出された。

ユウガオのツルの部分の抽出液を薄層クロマトで展開した TLC を図 11 に示す。クルビタシン B と一致する Rf 値に蛍光が消失することが確認できた。TLC で展開した部分を LC/MS で定量したところ、カートリッジカラムの定量値の約 17% の値であった。



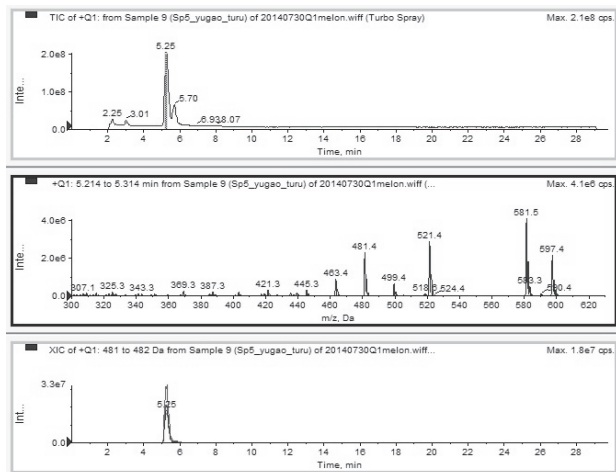


図 10 ユウガオ(ツル) (上段：TIC，中段：マススペクトル：下段：m/z 481,521,581,597)

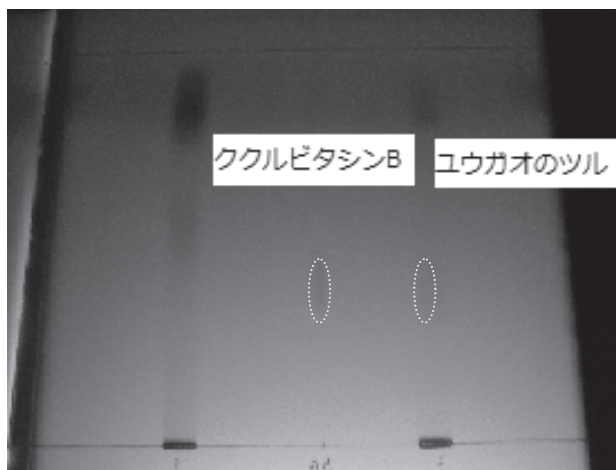


図 11 ユウガオ(ツル)の TLC 展開

#### 4 まとめ

ウリ科植物に含まれる苦味成分クルビタシンについて、カートリッジカラムを用いた精製方法による LC/MS 測定法を検討し、定量性のある分析法を確立した。

- ① LC/MS の ESI ポジティブモードにより 4 種類のクルビタシンが分離，測定可能で，検量線は，10～200ng/mL の濃度範囲で直線性が確認できた。
- ② 薄層クロマトグラフィーを使用した場合，添加回収率は 40% 未満で定量性が乏しかった。
- ③ カートリッジカラムを使用した場合，添加回収率は 82～105% と良好な結果であった。
- ④ ユウガオのツルの部分からクルビタシン B が 19mg/kg 検出された。

## 謝 辞

本調査の実施に際して，標準物質クルビタシン B の分与にご協力いただきました大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部食品化学課阿久津和彦氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 食品安全関係情報：オーストリア保健・食品安全局 <http://www.ages.at/ages./ernaehrungessicherheit/pflanzliche-lebensmittel/zierkuerbis/>
- 2) 登田美桜，畝山智香子，春日文子：過去 50 年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向，食品衛生学雑誌，55(1)，55-63，2014
- 3) 厚生労働書ホームページ：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：ユウガオ [http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/higher\\_det\\_20.html](http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/higher_det_20.html)
- 4) 備前県民局健康福祉部ホームページ：クルビタシンが原因と強く疑われた事例について <http://www.pref.okayama.jp/page/398879.html>
- 5) 大城直雅，佐久川さつき：沖縄県における化学物質と自然毒による食中毒および苦情事例，沖縄県衛生環境研究所報，43，181-184，2009
- 6) 玉那覇康二，大城善昇，山城興博，城間博正，玉城宏幸：ユウガオの苦味物質クルビタシンの同定，沖縄県衛生環境研究所報，30，53-56，1996
- 7) 牛山博文，観 公子，新藤哲也，安田和男：化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第 17 報），東京衛研年報，51，166-169，2000
- 8) 山口瑞香，野村千枝，清田恭平，梶村計志：ヒョウタンによる食中毒事例について，大阪府公衛研所報，52，41-43，2014

