

LC/MS/MSを用いた自然毒の迅速分析法の検討

(2) アトロピン, スコポラミン, アコニチン及びメサコニチンの同時分析

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

(2) アトロピン, スコポラミン, アコニチン及びメサコニチンの同時分析

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

(2) Simultaneous Analysis of Atropine, Scopolamine, Aconitine and Mesakonichin

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, アトロピン, スコポラミン, アコニチン, LC/MS/MS法]

[Key words: Natural Poisons, Atropine, Scopolamine, Aconitine, LC/MS/MS]

1 はじめに

チョウセンアサガオの根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、アトロピン、スコポラミン、アコニチン及びメサコニチンを分析対象項目として選定した。

アトロピン及び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、ベラドンナなどの有毒成分であり、チョウセンアサガオの根をゴボウと間違えて調理してしまうなどによる食中毒が当県でも過去に発生している。また、アコニチン及びメサコニチンはトリカブトの有毒成分で、トリカブトによる食中毒は当県での発生はないが、全国では過去に死亡事例もある。

2.2 試料

添加回収試験には、チョウセンアサガオの根をゴボウと間違えて調理する食中毒が起こっていることから、ゴボウ(市販品)に添加することとし、同時分析するトリカブト毒も同様にゴボウで添加回収試験することとした。

2.3 試薬

1) アコニチン標準品: SIGMA製 (自然毒共同研究²⁾で配布されたもの)

2) メサコニチン標準液 (500 µg/mL), アトロピン標準液 (2000 µg/mL) 及びスコポラミン標準液 (2000 µg/mL): 自然毒共同研究で配布されたものを使用

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 XTerra MS C18 3.5 µm (2.1 mmI.D.x15cm)

カラム温度: 40°C

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 min) →

50/50 (3 min) →5/95 (11-15min)

→85/15 (18-30min)

移動相流量: 0.2mL/min

試料注入量: 5 µL

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°C

イオン化電圧: 5500V

測定イオン (precursor ion>product ion) :

アトロピン: (定量) 290.2>124.1,
(確認) 290.2> 93.0,290.2>77.0

スコポラミン: (定量) 304.0>138.1,
(確認) 304.0>103.0,304.0>156.1

アコニチン: (定量) 646.4>105.0,
(確認) 646.4>77.2,646.4>586.3

メサコニチン: (定量) 632.3>105.2,
(確認) 632.3>76.9,632.3>572.2

2.5 前処理操作

自然毒共同研究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、GFPろ紙で減圧ろ過した。ろ紙上の残渣をポリプロピレン遠沈管に戻しメタノール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200μL分取し、メタノールを加えて50mLに定容し、そこから約2mLを分取し0.20μm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 アコニチン標準液の調製

アコニチン標準品5mgをメタノールで10mLにメスアップしたものを500μg/mL標準液とした。

2.7 検量線溶液の調製

2.3 2) の3標準液及び2.6のアコニチン標準液を等濃度となるよう混合し、混合標準液を調製した。混合標準液をメタノールで順次希釈し、0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10,

20, 50, 100, 200ng/mLの検量線溶液を調製した。

2.8 マトリックス効果の確認

添加していないゴボウの抽出溶液(試料5gを2.3.4に従い抽出操作し、100mLに定容したもの)を40μL分取し、2.7で調製した200ng/mL検量線溶液を400μL加え、メタノールを加えて10mLに定容し、そこから約2mLを分取し0.20μmメンブランフィルターでろ過したものをマトリックス標準液(8ng/mL)とした。溶媒標準液(8ng/mL)は、200ng/mL検量線溶液を400μL分取し、メタノールを加えて10mLに定容して調製した。

マトリックス標準液と溶媒標準液を交互に測定し、ピーク面積比からマトリックス効果を確認した。

3 結果及び考察

3.1 HPLC条件の検討とクロマトグラム

山辺らの報告^{3) 4)}でチョウセンアサガオ等の有毒成分(アトロピン及びスコポラミン)の分析に有効とされているHilic系のDiscovery HS F5カラムを試したところ、チョウセンアサガオ等の有毒成分及び別報で検討したりコリンでは、良好なクロマトグラムが得られたものの、トリカブト毒(アコニチン及びメサコニチン)のピークを確認することができなかった。

そこで、著者らが残留農薬や残留動物用医薬品の多成分同時分析に用いているC18系のLCカラムを用い、グラジエントを行うことにより、対象とした5物質全てでシャープなピークを得ることができた。(図1)

3.2 検量線

検量線を図2~5に示す。0.2~100ng/mL又は0.2~200ng/mLの範囲で $r^2=0.999$ の良好な直線が得られた。なお、スコポラミン及びメサコニチンでは200ng/mLは、直

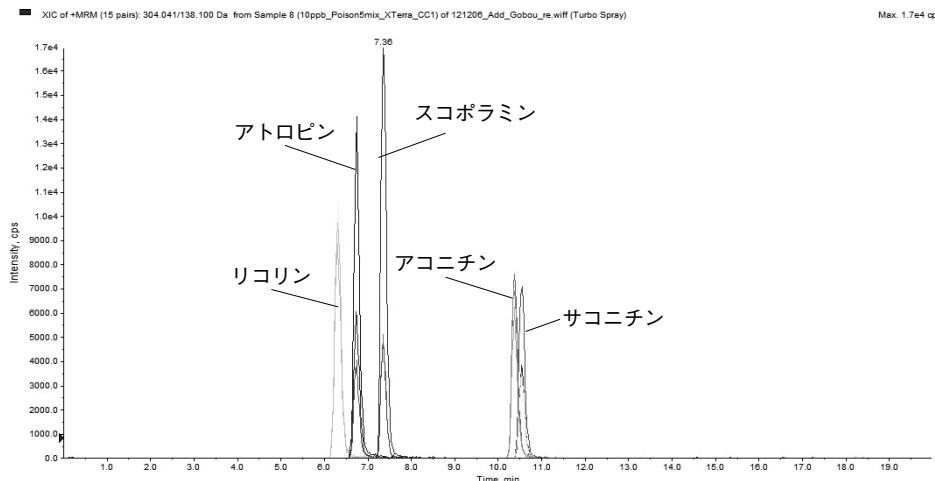


図1 5物質のLC/MS/MSクロマトグラム

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。

3.3 添加回収試験結果

結果を表1に示す。アトロピンの4 $\mu\text{g/g}$ 添加の回収率を除き、妥当性評価ガイドライン⁹⁾で目標値とされる回収率(真度)70~120%及び相対標準偏差(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。

なお、別報で検討したリコリンについては、改めての添

加回収試験は行っていないが、ほぼ同一の前処理法であり、チョウセンアサガオ等の有毒成分及びトリカブト毒と同時分析可能であると考えられた。

3.4 マトリックス効果の確認結果

結果を表2に示す。アトロピンでは、マトリックス効果によりピーク面積値が大きくなることが確認され、添加回収試験で同物質の4 $\mu\text{g/g}$ 添加の回収率が123%となったのはマトリックス効果が大きな原因であると考えられた。

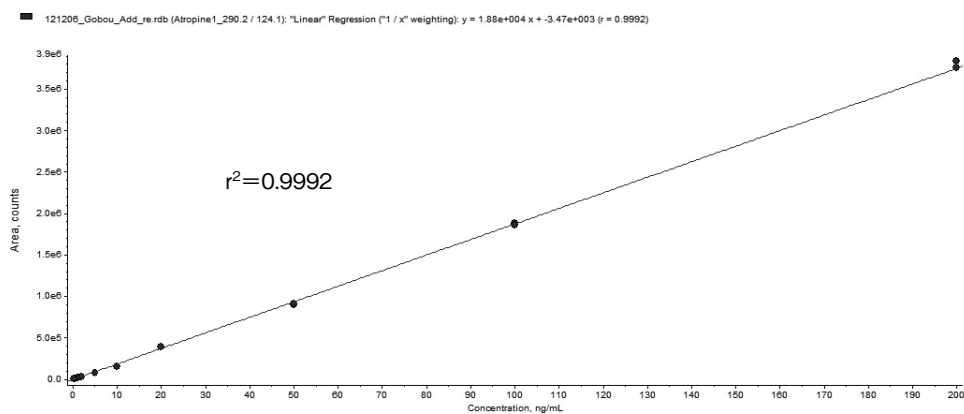


図2 アトロピンの検量線 (0.2~200ng/mL)

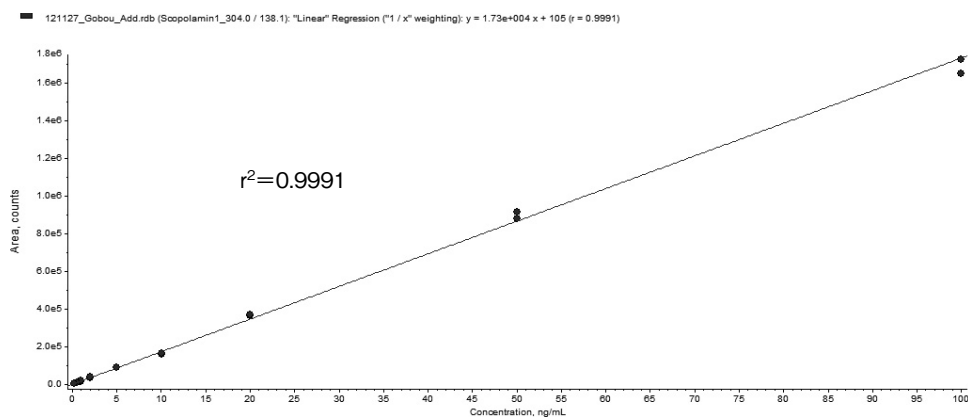


図3 スコポラミンの検量線 (0.2~100ng/mL)

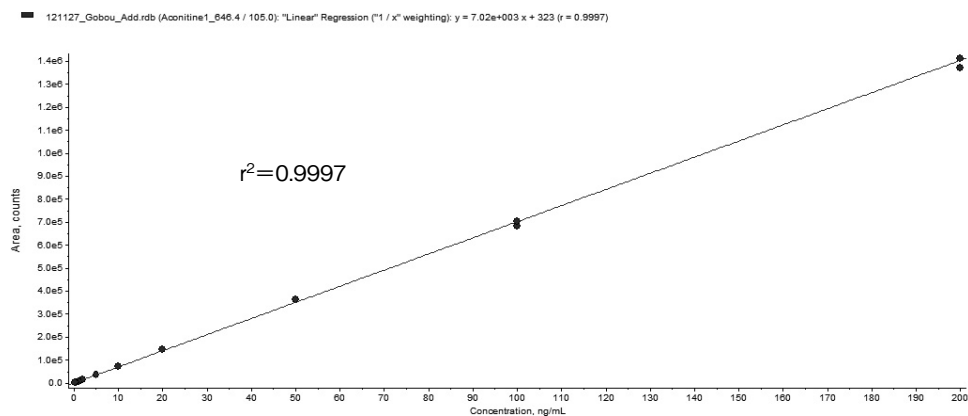


図4 アコニチンの検量線 (0.2~200ng/mL)

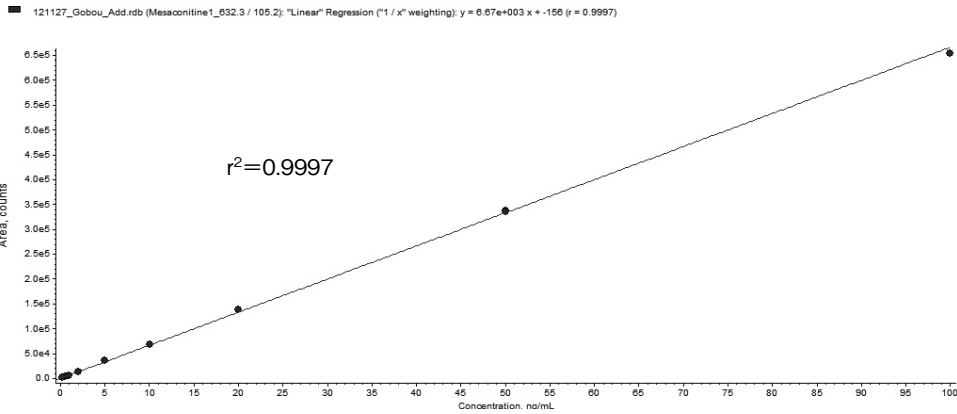


図5 メサコニチンの検量線 (0.2~100ng/mL)

表1 チョウセンアサガオ毒及びトリカブト毒の添加回収試験結果

	40 μ g/g添加(n=5)		4 μ g/g添加(n=2)	
	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)
アトロピン	102	3.3	123	1.6
スコポラミン	99.4	1.2	101	0.87
アコニチン	95.5	3.7	101	8.9
メサコニチン	97.6	2.2	98.8	1.4

表2 マトリックス効果

	ピーク面積比 (マトリックス標準 /溶媒標準)(%)
アトロピン	118
スコポラミン	100
アコニチン	96
メサコニチン	101

4 まとめ

アトロピン、スコポラミン、アコニチン及びメサコニチンについて、LC/MS/MSを用いた多成分同時かつ迅速分析法を検討し、次のことがわかった。

- 1) C18系のLCカラムを用いグラジエントを行うことにより、4物質ともにシャープなピークを得ることができた。
- 2) 添加回収試験では、アトロピンが高めの回収率になりマトリックス効果が原因であると推定されたが、ほかの3物質は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。

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。

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24年度総括・分担研究報告書, 25-42, 2013

- 3) 山辺真一, 肥塚加奈江, 田邊英子, 北村雅美, 今中雅章: 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, 岡山県環境保健センター年報, 31, 127-132, 2007
- 4) 山辺真一, 肥塚加奈江, 山本 淳, 石井 学, 今中雅章: LC/MS/MSによる尿中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報, 32, 141-143, 2008
- 5) 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