

資料

ヒガンバナ科植物のリコリン及びガラタミン分析

下堂 蘭 栄 子 岩 屋 あまね 榎 元 清 美
 福司山 郁 恵 吉 村 浩 三

1 はじめに

ヒガンバナ科植物は、リコリンやガラタミン等の有毒成分であるアルカロイドを含有しているが、その外観などからニラやノビル等と誤食されることが多く、国内でも毎年食中毒事例が報告されている。

2009年8月に、鹿児島県内でヒガンバナ科植物のキルタンサスをハナニラと誤ってみそ汁に入れ、喫食した2名が、吐き気、嘔吐、倦怠感等の症状を呈する食中毒が発生した。

リコリンやガラタミンの試験法は、公定法では示されていないが、薄層クロマトグラフィーによる定性試験法¹⁾が報告されており、2009年の中毒事例では、この薄層クロマトグラフィーによる定性試験を実施した。

今回2010年から2年間の調査研究として、上田らの報告²⁾を参考に、LC/MS/MSによるリコリン及びガラタミン分析法を検討し、併せて妥当性評価ガイドライン³⁾を参考にして妥当性の確認を行った。また実際に採取したヒガンバナ科植物のリコリン、ガラタミンの含有量を調査したので併せて報告する。

2 調査方法

2.1 試料

2009年に発生した食中毒事例の残品であるキルタンサスの鱗茎、鑑賞用のキルタンサス（鱗茎と葉）及び鹿児島市内で採取したヒガンバナの鱗茎を試料として用いた。

2.2 試薬及び試液

2.2.1 標準品

リコリンは、SIGMA-ALDRICH社製を、ガラタミンはTOCRIS bioscience社製を使用した。各標準品をメタノールで溶かし、1000 μ g/mLに調製し、適宜メタノールで希釈し混合標準液とした。

2.2.2 その他試薬

試料の抽出には和光純薬工業(株)製のメタノール(HPLC用)を、LC/MS/MS測定には関東化学(株)製のメタノール(LC/MS用)及び和光純薬工業(株)製の1M酢酸アンモニウム溶液(HPLC用)を用いた。

2.3 装置

高速液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製 Prominence LCシリーズを使用した。質量分析装置は、エービー・サイエックス社製4000QTRAPを使用した。

2.4 測定条件

LC/MS/MSの測定条件を、表1に示す。

表1 LC/MS/MS条件

LC条件			
分析カラム	Inertsil Sustain C18 (内径2.1mm, 長さ150mm, 粒径3 μ m)		
流速	0.2mL/min		
注入量	5 μ L		
カラム温度	40 $^{\circ}$ C		
移動相	A : 5mM酢酸アンモニウム溶液 B : 5mM酢酸アンモニウム含有メタノール A : B (40 : 60)		
MS/MS条件			
イオン化モード	ESI・ポジティブモード		
イオンスプレー電圧	5.5kV		
イオンソース温度	500 $^{\circ}$ C		
測定モード	MRM		
測定対象物質			
リコリン	定量イオン	確認イオン	
Q1/Q3	288/147	288/119	288/91
DP	51V	51V	51V
CE	41V	55V	77V
ガラタミン	定量イオン	確認イオン	
Q1/Q3	288/213	288/198	288/115
DP	71V	71V	71V
CE	33V	47V	103V

2. 5 試料液の調製

試料液の調製は、上田らの報告²⁾を参考に図1のとおり実施した。

抽出溶液は、メタノールで適宜希釈し、0.45 μ mメンブランフィルターでろ過し、LC/MS/MSへ5 μ L注入した。

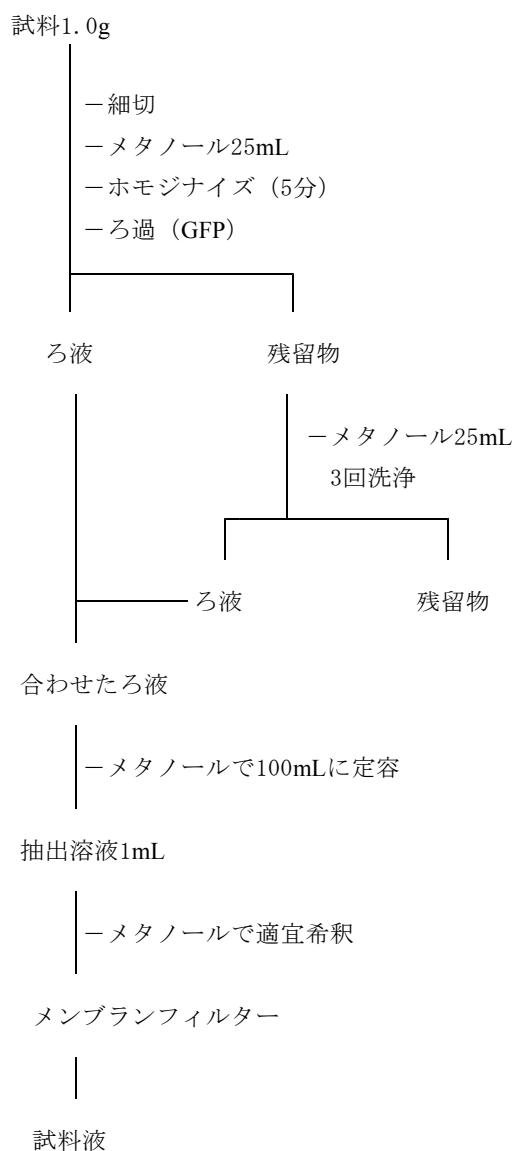


図1 試験フロー

2. 6 添加回収試験

添加回収試験を行う試料にはニラを用い、添加量は、試料中濃度が10 μ g/g及び100 μ g/gの2濃度とした。リコリンは、1日5併行試験を2日間実施、ガラタミンは、添加量10 μ g/gを1日2併行試験で2日間、添加量100 μ g/gを1日2併行試験で3日間実施した。

3 結果及び考察

3. 1 MS/MSの条件

イオン化モードはエレクトロスプレーイオン化法とし、測定は選択性の高いMRMモードとした。

リコリン、ガラタミンについて、インフュージョン法による最適化を行ったところ、それぞれの分子にプロトンが付加したm/z288が感度よくみられた。

m/z288[M+H]⁺をプレカーサーイオンとし、プロダクトイオンは、強度の高い3つをモニターし、一番強度が高かったものを定量イオン、そのほかの2つを確認イオンとした。

次にフローインジェクションを用いて、イオンソースの最適化を行い、イオンスプレー電圧、イオンソース温度等の条件を設定した。詳細は表1のとおり。

3. 2 LCの条件

分析カラムについては、ODS系カラムの関東化学㈱製のMightysil RP-18 GP Aquaとジーエルサイエンス㈱製のInertsil ODS-4とInertsil Sustainについて検討した。

ピーク形状は3つとも良好であったが、S/N比が高かったのはInertsil Sustainであった。また、保持能力については、リコリン及びガラタミンは高極性物質のためODS系カラムには保持されにくい、その中で一番保持が強かったのは、Inertsil Sustainであった。以上のことから分析カラムはInertsil Sustainを用いた。

移動相の条件等詳細は表1のとおりとした。妨害ピークもなく(図2)、MRMモードにおいて、検量線0.0005~0.05 μ g/mLの範囲で相関係数0.9999以上の良好な直線性が得られた。

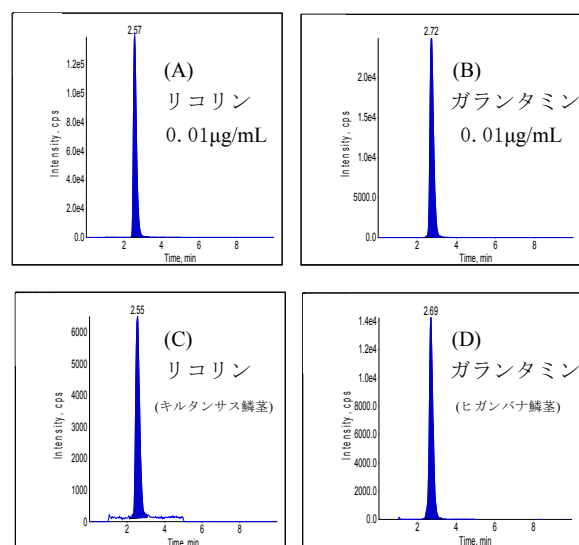


図2 MRMクロマトグラム

3. 3 分析法の評価

3. 3. 1 選択性

ブランク試料を図1試験フローに従って試験し、定量を妨害するピークがないことを確認した。

3. 3. 2 真度と精度

添加回収試験の結果から、妥当性評価ガイドライン³⁾を参考にして、真度と精度を求めたところ、表2のとおり、いずれも妥当性評価ガイドライン³⁾の目標値を満足する良好な結果であった。

表2 真度及び精度

測定対象物質	添加量(μg/g)	真度(回収率)(%)	精度(併行精度)(RSD%)	精度(室内精度)(RSD%)
リコリン	10	95.4	5.9	7.8
ガラタミン				
リコリン	100	100.0	2.0	4.8
ガラタミン				
目標値*		70~120%	10% >	15% >

* 妥当性評価ガイドラインによる。

3. 3. 3 定量限界

標準液のクロマトグラフからS/N=10となる濃度を定量限界として求めたところ、試料中濃度換算で、リコリンが0.4μg/g、ガラタミンで0.7μg/gであり、今回分析した食中毒事例の残品を検査するのに十分な感度であった。

3. 4 ヒガンバナ科植物のリコリン及びガラタミン含有量

試料として用いた全てのキルタンサス鱗茎からリコリンが1.1~8.1μg/gの範囲で検出されたが、キルタンサスの葉からは検出されなかった。

また、試料として用いた全てのヒガンバナ鱗茎からは、リコリンを49.2~462.0μg/gの範囲で検出し、ガラタミンを12.0~70.6μg/gの範囲で検出した。詳細は表3のとおりで、種による違い、個体差がみられた。

また、鑑賞用のキルタンサス鱗茎からは、リテンションタイムがリコリンより少し早いところに、別のピークが検出された。このピークについて、CE値を20, 35, 50と変えてマスペクトルをとったところ、リコリンのプレカーサーイオンであるm/z288, プロダクトイオンであるm/z147, 119, 91を確認し、リコリン類縁物質ではないかと推察された(図3)。

他のヒガンバナ科植物からリコリン類縁物質等を検出したという同様の報告⁴⁾があり、リコリン、ガラタミンだけでなく、それらの類縁物質も食中毒の原因となる可能性が考えられた。

表3 試料の分析結果

(単位: μg/g)

試料名	リコリン	ガラタミン	
キルタンサス(残品)鱗茎	1	2.1	ND
	2	7.7	ND
キルタンサス(鑑賞用)鱗茎	1	6.2	ND
	2	4.4	ND
キルタンサス(鑑賞用)葉	3	7.7	ND
	4	1.1	ND
	5	8.1	ND
ヒガンバナ 鱗茎	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND
	1	83.6	16.4
	2	49.2	17.2
	3	59.7	18.8
	4	318.0	12.0
	5	316.0	54.1
	6	374.0	52.3
	7	321.1	59.7
	8	283.0	42.9
	9	382.0	52.2
10	462.0	70.6	
11	329.0	68.6	
12	356.0	53.3	
13	214.0	54.9	

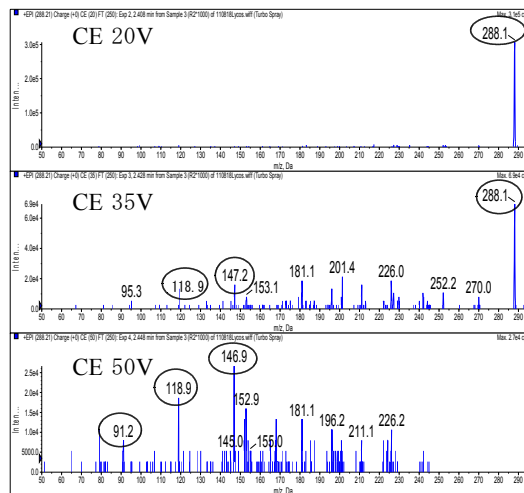


図3 キルタンサスのマスペクトル

4 まとめ

- 1) LC/MS/MSによるリコリン及びガランタミン分析法を検討したところ、同時分析が可能であり、決定した測定条件においては、妨害ピークもなく、検量線0.0005～0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で相関係数0.9999以上の良好な直線性が得られた。
- 2) 妥当性評価ガイドライン³⁾を参考にして選択性、真度及び精度を確認したところ、いずれも妥当性評価ガイドライン³⁾を満足する良好な結果であった。また、定量限界についても、今回分析した食中毒事例の残品を検査するのに十分な感度であった。
- 3) 試料として用いたすべてのキルタンサス鱗茎からリコリンが検出されたが、キルタンサス葉からは検出されなかった。また、試料として用いたすべてのヒガンバナの鱗茎からは、リコリン及びガランタミンを検出した。種による違い、個体差がみられた。
- 4) 鑑賞用のキルタンサス鱗茎からは、未知のピークが検出され、マススペクトルからリコリン類縁物質ではないかと推察された。ヒガンバナ科植物による食中毒は、リコリン、ガランタミンだけでなく、それらの類縁物質も食中毒の原因となる可能性が考えられた。

以上のことから、今回検討したLC/MS/MSによるリコリン及びガランタミン分析法は、薄層クロマトグラフィーによる定性試験よりも迅速かつ高感度な分析法であり、妥当性評価ガイドライン³⁾を参考にした分析法の評価も良好であった。そのため、今後健康危機管理事象発生の際には十分適用できると思われる。

参考文献

- 1) 観公子；自然毒の化学分析による検査方法（有毒植物の検査法について），第2回全国自然毒中毒研究会抄録集，61～65（2008）
- 2) 上田泰人；スイセン等のリコリン分析，第46回全国衛生化学技術協議会年会，172～173（2009）
- 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（食安発1224第1号），2010年12月24日
- 4) 内山亜喜子；LC/MS/MSによる植物性自然毒リコリン，ガランタミンおよびその類縁物質の分析，第47回全国衛生化学技術協議会年会，194～195（2010）