

調理済み食品からのヒガンバナ科植物アルカロイドの分析手法の検討

山口県環境保健センター

仙代真知子 川崎加奈子 三浦 泉* 藤井千津子 立野 幸治

* 現 山口県健康福祉部薬務課

Methodological Examination for the Detection of Amaryllidaceae plant alkaloids from precooked food

Machiko SENDAI, Kanako KAWASAKI, Izumi MIURA, Chizuko FUJII, Kouji TACHINO
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

ヒガンバナ科植物であるスイセン、ヒガンバナには、リコリン及びガランタミン等の有毒アルカロイドが含まれる。アルカロイドは全草に含まれるが、特に鱗茎に多い。スイセンやヒガンバナの葉はニラと、鱗茎はタマネギやノビルと類似していることから、誤食に伴うヒガンバナ科植物アルカロイドによる食中毒事例が、厚生労働省食中毒統計によると、過去5年間で毎年発生している。

リコリンの毒性は、マウス経口 LD50 が、10,700 mg/kg、ガランタミンは臭化水素酸ガランタミンとしてのマウス経口 LD50 が、75 mg/kg である¹⁾。過去の事例を見ると重篤な事例はまれで、成人が鱗茎1個以下を摂取した場合、悪心、嘔吐、下痢などの消化器症状を呈する程度であるとされるが、健康危機管理上は重要な対象物質と考えられる。

スイセン及びヒガンバナの葉等からの分析方法の検討事例は報告されているが^{2), 3), 4)}、調理済み状態の食品について検討した事例はないことから、ギョウザ、卵とじにした調理済み食品中のリコリン及びガランタミンの同時分析手法の検討を行ったので報告する。

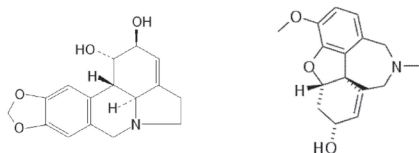


図1 リコリン(左)及びガランタミン(右)の分子構造

実験方法

1 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製1100シリーズ、質量分析装置：ABSCIEX社製API2000

2 試薬

リコリン標準品：リコリン塩酸塩（シグマアルドリッチ(株)製、M.W. 323.77)

ガランタミン標準品：ガランタミン臭化水素酸

塩（バイオサイエンス(株)製、M.W. 368.27)

水：和光純薬工業(株)製超純水

酢酸：和光純薬工業(株)製特級

メタノール：和光純薬工業(株)製LCMS用

アセトニトリル：和光純薬工業(株)製LCMS用

ギ酸アンモニウム：和光純薬工業(株)製特級

ギ酸：和光純薬工業(株)製HPLC用

HPLC用カラム：Waters XBridge C18 150×2.1 mm i.d. 3.5 μm, Imtakt Scherzo SM-C18 150×3 mm i.d. 3 μm, Waters Atlantis HILIC Silica 150×2.1 mm i.d. 5 μm

除粒子フィルター：ミリポア(株)製Millex-LG (0.2 μm)

3 標準溶液

リコリン標準原液（1,000 μg/mL）：リコリン標準品 11.3 mg をメタノールで溶解し 10 mL に定容した。

ガランタミン標準原液（1,000 μg/mL）：ガランタミン標準品 12.8 mg をメタノールで溶解し 10 mL に定容した。

混合標準溶液：リコリン及びガランタミン標準原液を 1 mL ずつ混合し、メタノールで溶解し 100 mL に定容した。これを 1~100 ng/mL の濃度系列となるようにメタノールで希釈した。

4 LC-MS/MS 測定条件

液体クロマトグラフのカラムについては、Waters XBridge C18（逆相系ODSカラム）、Waters Atlantis HILIC Silica（逆-逆相系カラム）及び Imtakt Scherzo SM-C18（マルチモードODSカラム）について検討した。

イオン化条件はインフュージョン法及びFIAにより検討した。

5 試料

(1) 調理済み食品①（ギョウザ）

スイセン又はヒガンバナの葉、牛挽肉、キャベツ及び塩を混ぜ合わせてギョウザの皮で包

み、87℃5分間蒸し焼きにし試料とした。

(2) 調理済み食品②（卵とじ）

卵を溶きほぐし、5 cm 幅に切ったスイセン
又はヒガンバナの葉及び塩を加え、67℃3分間
加熱し試料とした。

6 試験溶液の調製

試料を細切、磨砕後、5 g をホモカップに分取
しメタノール 20 mL を加えホモジナイズした
(7,500 rpm, 3分間)後、桐山ロートで減圧ろ過
した。残渣をさらに同様にホモジナイズ減圧ろ過
し、ろ液を合わせメタノールで 100 mL に定容し
た。

この液を 2 mL 分取しメタノールで 100 mL に定
容し、MillexLG フィルター (PTFE) でろ過し試験
溶液とした。

結果及び考察

1 LC-MS/MS測定条件

リコリン及びガランタミンメタノール標準溶液
をインフージョン法により直接MS部に導入し、イ
オン化条件を検討した。いずれの標準溶液も、プ
ロトン付加分子がポジティブモードで確認された。
プロトン付加分子をブリカーサーイオンとし、プ
ロダクトイオンを観測した。プロダクトイオンの
うち最も感度が高いイオンを定量に、2番目、3
番目に感度が高いイオンを定性に選択した。

さらにFIAでイオンソースの最適化を行った。

カラム、移動相条件等を種々変化させ感度、ピ
ーク形状、分離について検討した。3種類のカラ
ムで良好なピークが得られた条件を表1～3に示
す。また、それぞれの条件下での100ppbのMRMク
ロマトグラムを図2に示す。

HPLC条件①の場合、リコリンは、塩基性の高極
性物質であるため、ODSカラムに保持されにくく、
残存シラノール基と相互作用し、テーリングを呈
した。テーリングを抑制するため、高極性物質を
保持するHILICモードとしてHPLC条件②の検討を
行った。②の場合、ピークはシャープになったが、
リコリンとガランタミンの溶出時間が近接してい
た。HPLC条件③の場合、逆相・イオン交換・順相
モードに適用できるマルチモードカラムを使用し
た。マルチモードカラムには、ODSカラムにアニ
オンリガンド及びカチオンリガンドが導入されて
いる。移動相を高有機溶媒濃度に保つことにより、
イオン交換基による順相分離を行った。順相モー
ドでは高極性物質の保持が可能となるため、ピー
ク形状が比較的シャープであり、リコリンとガラ
ンタミンの分離が良好であった。よって、測定条
件は表4のとおりとした。

| | |
|--------------|--|
| カラム | Waters XBridge C18 150×2.1 mm i.d. 3.5 μm |
| カラム温度(°C) | 40 |
| 移動相 | A 5 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B 5 mmol/L ギ酸アンモニウムメタノール溶液 |
| 濃度勾配 B%(min) | 15%(-10-0)→85%(10-20)→15%(20.1-35.1) |
| 流速(mL/min) | 0.2 |
| 注入量(μL) | 5 |

| | |
|------------|---|
| カラム | Waters Atlantis HILIC Silica 150×2.1 mm i.d. 5 μm |
| カラム温度(°C) | 40 |
| 移動相 | A 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B メタノール A:B 3:7 |
| 流速(mL/min) | 0.2 |
| 注入量(μL) | 5 |

| | |
|------------|---|
| カラム | Imtakt Scherzo SM-C18 150×3 mm i.d. 3 μm |
| カラム温度(°C) | 40 |
| 移動相 | A 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B メタノール A:B 3:7 |
| 流速(mL/min) | 0.2 |
| 注入量(μL) | 5 |

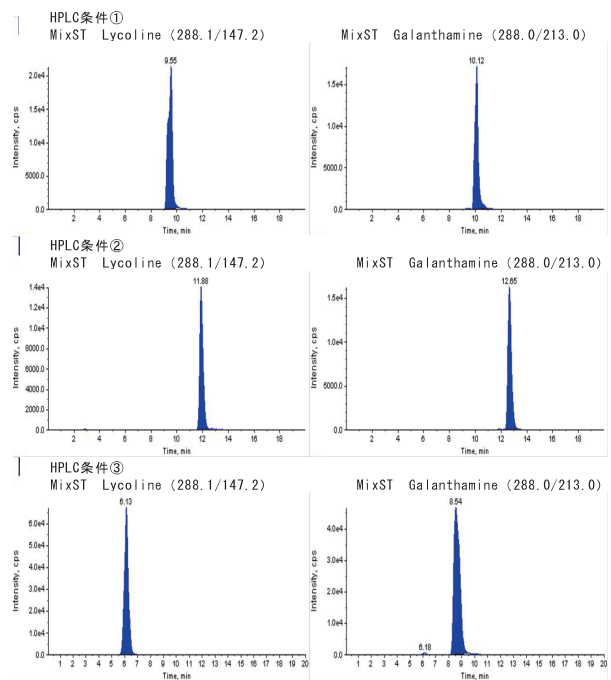


図 2 MRMクロマトグラム

| | | | |
|-------------|--|------|-----------|
| カラム | Imtakt Scherzo SM-C18 150×3 mm i.d. 3 μm | | |
| カラム温度(°C) | 40 | | |
| 移動相 | A 10mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 B メタノール A:B 3:7 | | |
| 流速(mL/min) | 0.2 | | |
| 注入量(μL) | 5 | | |
| イオン化モード | ESI, Positive Mode | | |
| イオンスプレイ電圧 | 5,500V | | |
| ターボガス温度 | 500°C | | |
| Q1/Q3 (m/z) | DP | CE | |
| 288.0/213.0 | 21.0 | 31.0 | (ガランタミン1) |
| 288.0/231.0 | 21.0 | 23.0 | (ガランタミン2) |
| 288.0/198.0 | 31.0 | 41.0 | (ガランタミン3) |
| 288.1/147.2 | 46.0 | 41.0 | (リコリン1) |
| 288.1/91.2 | 46.0 | 73.0 | (リコリン2) |
| 288.1/119.1 | 46.0 | 51.0 | (リコリン3) |

2 検量線

いずれの標準溶液も図3のとおり 1～100
ng/mL において相関係数 0.999 の良好な直線性が
得られた。

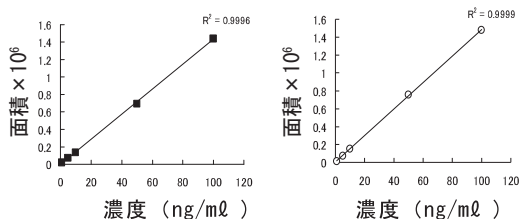


図3 リコリン（左）、ガラタミン（右）の検量線

マトリックス効果確認のため、5及び50 ng/mLの混合標準溶液にニラのマトリックスを添加したマトリックス標準と、マトリックスを添加しない標準のピーク面積、ピーク高さを比較したところ差はほとんどなく、マトリックス効果はないと考えられた。

最小検出量(S/N=3)は、リコリンが 0.97 pg、ガラタミンが 1.39 pgであった。

3 添加回収試験

ニラにリコリン及びガラタミンを 20 µg/gとなるよう添加し、試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。リコリンの平均回収率は100.8%(STDVE 0.44 Cv 0.44)、ガラタミンの平均回収率は109.0%(STDVE 0.58 Cv 0.53)であり、良好な結果を示した。

4 調理済み食品への適応試験

原料に用いたスイセン、ヒガンバナのリコリン、ガラタミンの含有量を測定したところ、表5のとおりであった。それぞれの葉を用いて調理したギョウザ、卵とじについて測定を行ったところ、表6、表7のとおりであった。

ギョウザについては、検体からも理論値とほぼ同様な量のリコリン、ガラタミンを検出した。若干、理論値よりも高い値を示したものもあったが、理論値に用いたヒガンバナ科植物と調理済み食品に用いたヒガンバナ科植物の個体差が疑われた。

卵とじについては、同一の検体にもかかわらず含有量差が認められたものもあった。食品の細切、磨砕不足により試料が不均一であったため、葉の多く含まれた部分を分析したことが原因と推察された。なお、ギョウザは均一であったため影響を受けなかったと考えられる。正確な測定値を得るためには、試料の均質化に留意する必要がある。

表5 調理に用いたヒガンバナ科植物のリコリン等含有量

| 試行回数 | リコリン | | ガラタミン | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 含有量(µg/g) | 平均値(µg/g) | 含有量(µg/g) | 平均値(µg/g) |
| スイセン | 1 | 20.29 | 18.66 | 8.91 |
| | 2 | 17.03 | | 8.02 |
| ヒガンバナ | 1 | 258.00 | 260.50 | 39.80 |
| | 2 | 260.50 | | 33.20 |

表6 調理済み食品①（ギョウザ）

| 試行回数 | リコリン | | ガラタミン | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 理論値(µg/g) | 含有量(µg/g) | 理論値(µg/g) | 含有量(µg/g) |
| スイセン | 0.95 | 1.02 | 0.43 | 0.58 |
| | | 0.98 | | 0.54 |
| ヒガンバナ | 12.43 | 12.40 | 1.74 | 2.28 |
| | | 13.00 | | 2.26 |

表7 調理済み食品②（卵とじ）

| 試行回数 | リコリン | | ガラタミン | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 理論値(µg/g) | 含有量(µg/g) | 理論値(µg/g) | 含有量(µg/g) |
| スイセン | 1.69 | 11.00 | 0.77 | 1.29 |
| | | 4.58 | | 0.76 |
| ヒガンバナ | 23.60 | 25.40 | 3.31 | 2.81 |
| | | 32.00 | | 3.40 |

まとめ

LC-MS/MSによる調理済み食品中のヒガンバナ科植物アルカロイドの分析手法を検討した。

マルチモードカラムを使用することにより、塩基性高極性物質であるリコリンとガラタミンの同時分析が可能であることが確認できた。

ニラを用いた添加回収試験において、リコリン及びガラタミンの回収率は良好であった。

調理済み食品からの分析では、理論値とほぼ同様な量のリコリン、ガラタミンを検出した。

今回検討した方法は約2時間で実施でき、従前のTLC法と比べ迅速・高感度な検査法である。当センターの食中毒発生時の対応の拡充、検査体制の強化が図られたと考えられる。

謝辞

この研究の一部は、厚生労働科学研究「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」（H22-健危-一般-004）により行われた。

参考文献

- 1) 中毒情報データベース（一般向け）家庭用品，自然毒「ヒガンバナ科植物」，公益財団法人日本中毒情報センター：[http://www.j-poison-ic.or.jp/tebiki.nsf/SchHyodai/62DA45BBA39F5A5C492567DE002B89C6/\\$FILE/M70211.pdf](http://www.j-poison-ic.or.jp/tebiki.nsf/SchHyodai/62DA45BBA39F5A5C492567DE002B89C6/$FILE/M70211.pdf)
- 2) 上田康人，伊藤光男，田中敏嗣：スイセンのLC/MS/MS分析について，神戸市環境保健研究所報，36巻，2008，p.60-61.
- 3) 坂本智徳，赤木浩一：HILIC-MS/MSによるヒガンバナ科植物中のリコリンおよびガラタミンの分析，福岡市保健環境研究所報，35号，2009，p.89-91.
- 4) 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修会抄録集，2008，p.61-65.