

LC/MS/MSによる α -ソラニン及び α -チャコニンの分析法の検討

保健科学部 食品分析グループ
藤原美智子 立野幸治

はじめに

ジャガイモの芽、皮等には吐き気、おう吐、下痢等を主症状とする食中毒の原因となる α -ソラニン、 α -チャコニンなどのポテトグリコアルカロイドが含まれていることは、よく知られており、調理する際には、芽、皮等の除去は通常行われていると考えられる。

しかし、厚生労働省食中毒事件録によれば平成21年7月、平成19年7月には奈良県で、平成18年12月には長野県で、平成17年7月には茨城県で、平成15年には東京都でいずれも小学校を原因施設とする大規模食中毒が発生している。化学物質による食中毒発生時の分析を担当する当センターにおいては、健康危機管理体制の確保の観点からこの分析手法を検討しておくことは、重要と考えられる。

現在、 α -ソラニン、 α -チャコニンの分析は、UV計を使用する高速液体クロマトグラフィーによる定性・定量法^{1)・2)}が一般的であるが、 α -ソラニン、 α -チャコニンは、紫外吸収極大を持たないため、検出波長として200~210nmをもちい、妨害物質の影響を受けやすいことから、高速液体クロマトグラフィー・質量分析計（以下、「LC/MS/MS」という。）による α -ソラニン、 α -チャコニンの分析法の検討を行ったところ、より高感度で分析できることが確認できたのでこの概要を報告する。

方法等

1. 分析法検討試料

山口県防府市産、青森県産のじゃがいもを購入し、二週間、日に当てたもの、日陰で保存したものを、通常摂取する方法で処理した皮質部と髄質部計8検体、当センターで栽培した約10gの小粒のジャガイモ4個の全量、産地・品種不明の芽が出たジャガイモの芽、皮質部及び市販ジャガイモ加工品2種類を試料とした。

また、食中毒事件発生時、調理品しか検査検体として入手できない可能性もあることから、市販のカレー(100g)を使用し、ジャガイモ(150g)、玉ねぎ(300g)、にんじん(100g)、牛肉(200g)及び水で、カレーを調製し2日間煮込んだものを試料とした。

2. 試薬等

α -ソラニン標準品：Sigma社製

α -チャコニン標準品：EXTRASYNTHESIS社製

標準原液： α -ソラニン、 α -チャコニン標準品10mgをメタノールで溶解し10mLとした。

検量線用標準溶液：標準原液をメタノールで適宜希釈して使用した。

C18固相カラム：Waters製Sep-Pak Plus(360mg)をあらかじめメタノール10mL、水10mLでコンディショニングしたものを用いた。

NH₂固相カラム：Waters製Sep-Pak Vac NH₂(500mg)をあらかじめメタノール10mL、アセトニトリル10mLでコンディショニングしたものを用いた。

水：和光純薬工業(株)製超純水

その他の試薬：すべて特級品あるいはLC/MS用を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製Agilent 1100シリーズ

質量分析装置：Applide Biosystems社製API2000

4. LC/MS/MSによる α -ソラニン、 α -チャコニン分析法

(1) 分析法検討試料からの試験溶液の調製

分析法検討試料からの試験溶液の調製は、食品衛生検査指針²⁾の方法に準じた。(図1：分析法検討試料からの試験溶液の調製フロー)

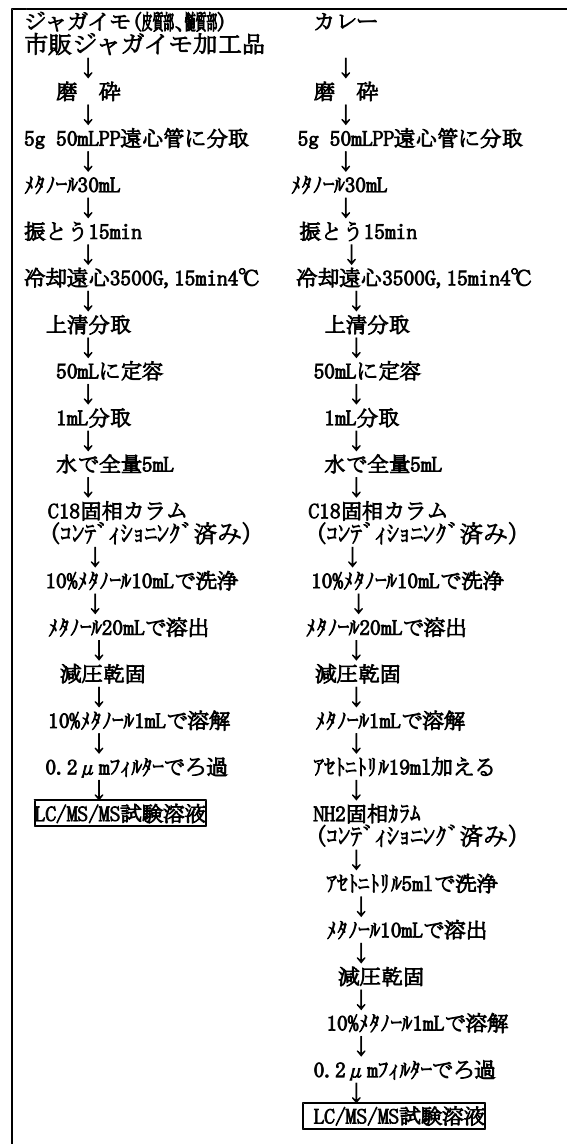


図1 分析法検討試料からの試験溶液の調製フロー

(2) LC/MS/MS測定条件

MS/MS条件については、 α -ソラニン、 α -チャコニン標準溶液1 μ g/mL及び0.1 μ g/mLを用いてインフュージョン及びFIA(フローインジェクションアナリシス)によりMRM測定の最適化を行った。

LC条件については、西川ら³⁾を参考にシララム及び移動相溶媒条件等を検討した。

この結果、MS/MS条件及びLC条件について当センター保有機器で良好なピーク形状が得られた表1の

測定条件とした。図2に α -ソラニン、 α -チャコニン混合標準1ng/mL溶液を上記条件で測定したMRMクロマトグラフを示した。図3に混合標準100ng/mL溶液のトータルイオンクロマトグラフを示した。

表 1 LC/MS/MS測定条件

質量分析装置	API2000	
ソフトウェア	Analyst 1.41	
イオン化法	ESI(+)	
イオンスプレー電圧	4,500V	
ターボガス温度	500°C	
α-ソラニン		
プレカーサーイオン	m/z 869.6	
プロダクトイオン		
m/z 98.2(定量)	(DP 121V CE 113eV)	
m/z 399.3(定性)	(DP 121V CE 93eV)	
α-チャコニン		
プレカーサーイオン	m/z 853.7	
プロダクトイオン		
m/z 98.2(定量)	(DP 151V CE 117eV)	
m/z 71.2(定性)	(DP 151V CE 129eV)	
高速液体クロマトグラフ	Agilent 1100シリーズ	
HPLCカラム	Intakt Unison UKC18 2.0mm×150mm	
カラム温度	40°C	
流速	0.2 mL/min	
注入量	5 μ L	
移動相	A液 0.02%酢酸水溶液 B液 メタノール	
グラジエント条件	A	B
0min	80	20
5min	30	70
15min	30	70

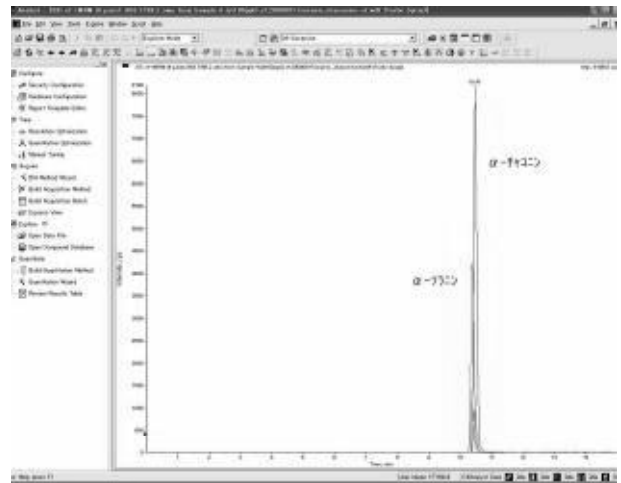


図3 α -ソラニン、 α -チャコニン混合標準100ng/mL溶液のトータルイオンクロマトグラフ

α -ソラニン、 α -チャコニンとも、1ng/mL~1000ng/mLの広範囲での検量線は、良好な直線性を示した。

(図4： α -ソラニン検量線、図5： α -チャコニン検量線)

ジャガイモ、カレーサンプルのトータルイオンクロマトグラフを図6、図7に示した。妨害なくシャープなトータルイオンクロマトグラフが得られた。

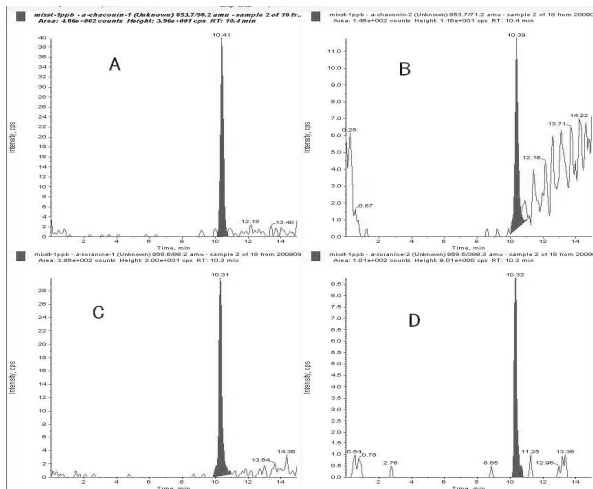


図2 α -ソラニン、 α -チャコニンのMRMクロマトグラフ

- A: α -チャコニン標準1ng/mL (m/z853.7/m/z98.2)
- B: α -チャコニン標準1ng/mL (m/z853.7/m/z71.2)
- C: α -ソラニン標準1ng/mL (m/z869.6/m/z98.2)
- D: α -ソラニン標準1ng/mL (m/z869.6/m/z399.3)

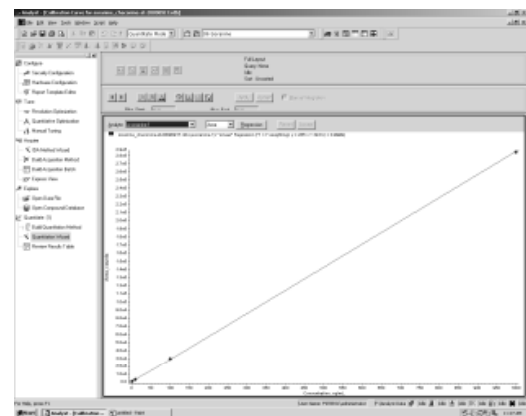


図4： α -ソラニン検量線

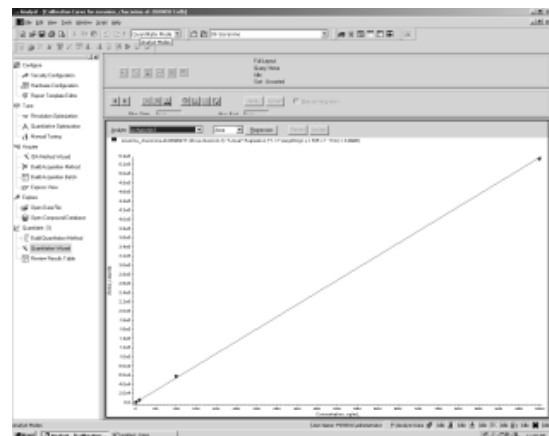


図5： α -チャコニン検量線

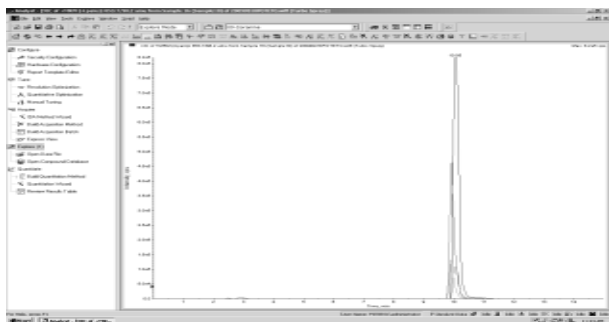


図6：ジャガイモサンプルTIC

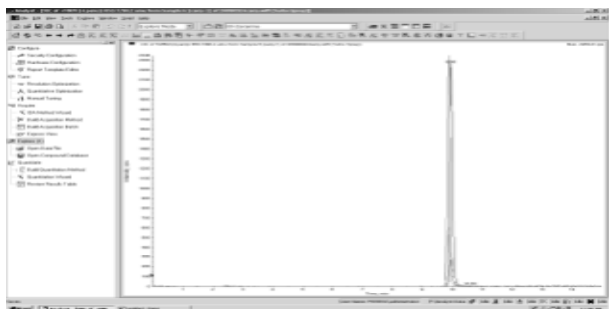


図7：カレーサンプルTIC

また、 α -ソラニン、 α -チャコニンの $1\mu\text{g/mL}$ メタノール溶液を使用し、Q1スキャンを行ったところ α -ソラニン、 α -チャコニンともにプロトン $[\text{H}^+]$ が付加したいわゆる $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオンが観察されたことから(α -ソラニン： m/z 869.6、 α -チャコニン： m/z 853.7)、これらをプレカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを実施した結果を、図4及び図5に示した。

ガラクトースやラムノースが脱離したイオン(m/z :706.5)、ソラニジンにプロトン $[\text{H}^+]$ が付加したイオン(m/z :398.5)、ソラニジン骨格の窒素を含んだフラグメントイオン(m/z :98.2)が観察され、MS/MSスペクトルデータベースに登録した。

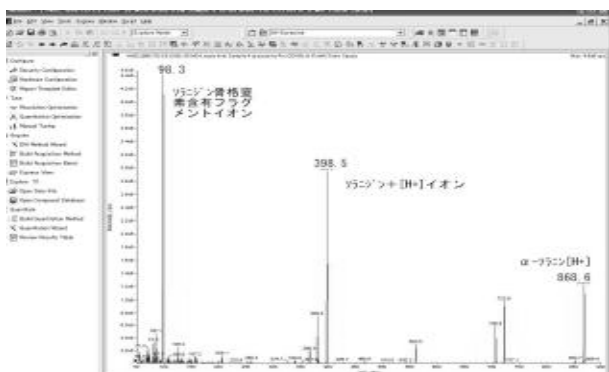


図4： α -ソラニン $1\mu\text{g/mL}$ メタノール溶液のプロダクトイオンスキャンスペクトル

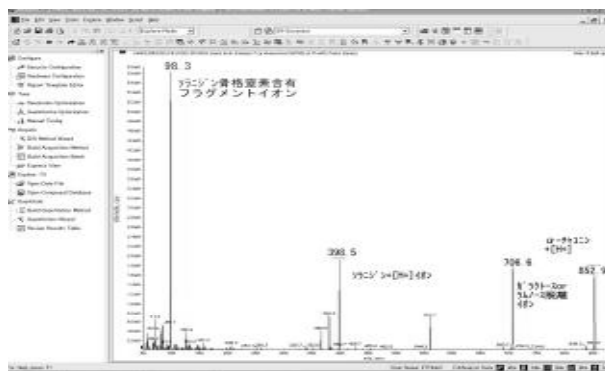


図5： α -チャコニン $1\mu\text{g/mL}$ メタノール溶液のプロダクトイオンスキャンスペクトル

結果及び考察

表2に分析法検討試料のLC/MS/MSによる α -ソラニン、 α -チャコニン分析法による検査結果一覧を示した。

ソラニン、チャコニンは、一般にポテトグリコアルカロイド（以下、「PGA」という。）と呼ばれており、 α -、 β -、 γ -ソラニン、 α -、 β -、 γ -チャコニン、 α -、 β -ソラマリン等が知られているが、その約95%は α -ソラニンおよび α -チャコニンであるとされている。

PGAの暫定推定値を、 α -ソラニン、 α -チャコニンの和とした。

各種文献によれば、PGAは成長点である芽、皮質部に多く、また緑化したもの、小粒の未成熟のジャガイモにも多いとされており、調理の際の、除芽、剥皮により、全体の約70%が除去されるといわれている。

この通説を裏付ける結果であった。

現在、広く実施されている高速液体クロマトグラフィーによる定性・定量法の定量限界が当センター保有高速液体クロマトグラフでは $20\mu\text{g/g}$ であることに比べ、LC/MS/MSによる分析法では、 $0.01\mu\text{g/g}$ での分析が可能であることが確認され、ジャガイモ加工品、カレー等妨害物質が多い検査試料でも妨害なくより高感度で正確な分析法であることが確認でき、危機管理対策上有用な方法を確認できたと考える。

参考文献

- 1) 衛生試験法・注解 2005 日本薬学会編“金原出版株式会社, p. 256-257, 2005
- 2) 厚生労働省監修“食品衛生検査指針・理化学編”日本食品衛生協会, p. 735-737, 2005
- 3) 西川徹ほか, 長崎県衛生公害研究所報52 (2006) p. 134-135,

表2 LC/MS/MSによる α -ソラニン， α -チャコニン分析法による検査結果一覧

検体名	重量(g)	α -ソラニン(μ g/g)	α -チャコニン(μ g/g)	PGAとして(mg/100g)	備考
青森産ジャガイモ (暗所保存・皮質部)	22.18	37.1	57.6	2.0	皮質部には芽を含む
青森産ジャガイモ (暗所保存・髓質部)	84.73	0.4	0.4		
青森産ジャガイモ (日光照射・皮質部)	29.72	22.9	37.5	2.2	
青森産ジャガイモ (日光照射・髓質部)	55.81	0.5	0.5		やや緑化
防府産ジャガイモ (暗所保存・皮質部)	21.56	50.2	59.5	3.1	皮質部には芽を含む
防府産ジャガイモ (暗所保存・髓質部)	58.95	1.5	0.9		
防府産ジャガイモ (日光照射・皮質部)	28.58	44.3	59.5	3.0	緑化
防府産ジャガイモ (日光照射・髓質部)	75.49	1.5	1.0		
センター産ジャガイモ (日光照射・全量(4個))	54.30	33.6	40.1	7.4	小粒，緑化
芽付き皮質部	45.26	205.0	223.0	42.8	約1cm程度の芽
市販ジャガイモ加工品A	68.00	0.7	0.7	0.1	
市販ジャガイモ加工品P	60.00	0.8	1.3	0.2	
カレー	210.00	0.6	0.3	0.1	