

毒キノコ及びチョウセンアサガオに含まれる有毒成分のLC-MS/MSを用いた 一斉分析法の検討

善光寺なおみ 長島典夫 今井浩一 大坂郁恵 石井里枝 高野真理子

Development of simultaneous analysis for poisons contained in poisonous mushrooms and datura by LC-MS/MS

Naomi Zenkoji, Norio Nagashima, Koichi Imai, Ikue Osaka, Rie Ishii, Mariko Takano

はじめに

毒キノコやチョウセンアサガオ等の有毒植物の誤食による食中毒は全国で毎年報告があり、稀に重篤な症状を伴い患者が死亡した例もあるため、厚生労働省や自治体等では注意喚起を行っている。

埼玉県内での誤食事例は他県に比べて少ないが、近隣県では多くの事例が報告されている。そのため、レジャー等で県民が誤食してしまう懸念があり、緊急時に備えた検査体制の整備が求められている。

キノコ毒等の成分を食品中から一斉に分析する方法はこれまで多数報告^{1)~3)}されているが、厚生労働省の統計⁵⁾において中毒件数の多い毒キノコのクサウラベニタケやツキヨタケ、死者数の多いドクツルタケに含まれる毒成分を一斉に検出する方法は報告されていない。

そこで今回、これらの危機管理上重要なキノコ毒成分を分析対象に含めて、LC-MS/MSによりキノコ毒及び植物性自然毒を一斉に検出する方法を検討したので報告する。

標準原液: propargylglycine は 50vol%メタノールで、その他の標準品はメタノールで標準原液を調製した。

標準原液の濃度: illudin S は 100µg/mL, α-amanitin, β-amanitin, phalloidin 及び phallacidin はそれぞれ 200µg/mL, propargylglycine は 500µg/mL, ibotenic acid, muscimol, muscarine, atropin 及び scopolamin はそれぞれ 1000µg/mL とした。

混合標準溶液: 標準原液を混合し、20vol%メタノールで 20µg/mL としたものを混合標準溶液とした。

精製用ミニカラム: (株)アイスティサイエンス製 Smart SPE C18 - 50 をメタノールと水でコンディショニングして使用した。

溶媒: 蒸留水及びメタノールは関東化学(株)製の液体クロマトグラフ用を使用した。

その他の試薬: ギ酸は和光純薬工業(株)製の LC/MS 用を、ギ酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製の特級品を使用した。

方法

1. 試料

食用キノコのシイタケ、チョウセンアサガオの誤食原因となりやすいゴボウ及びそれらを用いた調理済み食品としてシイタケとゴボウを入れたミソ汁を試料とした。

2. 分析対象成分

キノコ毒(9成分): muscarine, ibotenic acid, propargylglycine, α-amanitin, β-amanitin, phalloidin, phallacidin, illudinS, muscimol

チョウセンアサガオ毒(2成分): scopolamin, atropin

3. 試薬及び試液

標準品: β-amanitin from Amanita phalloides, phallacidin from Amanita phalloides, (+)muscarine chloride 及び DL-propargylglycine はシグマアルドリッチ社製を使用した。α-amanitin, phalloidin, ibotenic acid, muscimol, scopolamin 及び atropin は和光純薬工業(株)製を使用した。illudin S 標準品は、山形県衛生研究所 笠原義正博士より御供与頂いた。

4. 装置

高速液体クロマトグラフ: Waters 社製 ACQuity

質量分析装置: Waters 社製 Xevo TQ MS

5. HPLC条件

分析カラム: インタクト(株)製 Scherzo SS - C18(2.0×150mm, 粒子径 3.0µm)

カラム温度: 40℃

移動相: A液(20vol%メタノール), B液(10mM ギ酸アンモニウム・1vol%ギ酸含有 90vol%メタノール)

グラジエント条件(B液%): 0%(15分保持) - 100%(15 - 30分, リニアグラジエント) - 100%(5分保持)

流速: 0.2mL/min

注入量: 10µL

6. MS条件

イオン化モード: ESI, ポジティブモード

分析モード: MRMモード

キャピラリー電圧: 2.5kV

分析対象成分及び測定条件: 表1のとおり

7. 検出限界

混合標準溶液を装置に注入し、得られたクロマトグラムのノイズ幅(N)とシグナル値(S)から、 $S/N \geq 10$ となる濃度を検出限界値とし、表1に示した。ノイズの最大値と最小値の幅の2/5をノイズ幅(N)とし、最小値からノイズ幅の1/2をベースラインとしてピークトップまでをシグナル値(S)として算出した。

8. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法を図1に示した。

抽出方法：抽出法は吉岡らの方法¹⁾に準拠し、以下のとおり実施した。15mLポリプロピレンチューブに細切した試料0.2gを採り、0.5vol%ギ酸含有メタノール2.5mLを加えてホモジナイズし、3500rpmで10分間遠心分離し上清を分取した。残渣に水2.5mLを加え、同様の抽出操作を行い、上清を合わせて50vol%メタノールで5mLに定容したものを抽出液とした。

精製方法：抽出液1mLをSmart SPE C18-50ミニカラムに通液させ、50vol%メタノール1mLで溶出させた。流出液と溶出液を合わせたものを水で4mLに定容し、試験溶液とした。更に、試験溶液を20vol%メタノールで100倍希釈させた(以下、100倍希釈液)。

9. 定量

試験溶液及び100倍希釈液をそれぞれ装置に注入し、得られたクロマトグラムのピークの面積から絶対検量線法により定量した。検量線濃度範囲は、試験溶液で定量する成分では10, 50, 100, 150, 200, 250ng/mLとし、100倍希釈液で定量する成分では0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5ng/mLとした。

10. 添加回収試験

シイタケ、ゴボウ及びミソ汁を試料とし、各成分の添加濃度を20 μ g/gとして添加回収試験を行った。

11. 実サンプルへの応用

図鑑等を参考に各地より採取した毒キノコと思われる野生キノコ22検体(-20 $^{\circ}$ C以下で冷凍保存)と、近隣の登山道で採取した野生キノコ10検体(風乾保存)を用いて毒成分の分析を行った。

冷凍保存した検体は自然解凍した後0.2gを採取し、風乾保存した検体は4倍量の水で1時間以上戻した後0.2gを採取して分析に供した。

結果及び考察

1. MS/MS条件の検討

各標準原液を1vol%ギ酸含有50vol%メタノールで1ppmに希釈し、流速20 μ L/minで検出器にそれぞれ直接注入して、装置の自動メソッド開発機能(Intelli StartTM)を用いてESIにおける測定条件を検討した。その結果、全ての成

分でESIポジティブモード条件下での測定イオンが検出された。更に、検出された測定イオンが実際のLCカラム分離時においても高感度に検出されることを確認した。各対象成分の測定イオン及び測定条件を表1に示した。

2. LCカラムの選択

今回、測定対象とした有毒成分には、イオン性のmuscarineや、アミノ酸構造を持つpropargylglycine及びibotenic acid、環状ペプチド構造を持つamanitin、phalloidin及びphalloidin等があり、化学的性質が多様であったため、ODSカラムによる一斉分析は困難であると予想された。そこで、ODSカラムとイオン交換能の異なる2種のマルチモードカラムを用いて検討を行った。

(1) ODSカラム

カラムにWaters社製Atlantis dC18(2.1 \times 150mm, 粒子径3.0 μ m)を、移動相にA液(0.1vol%酢酸水溶液)及びB液(0.2vol%酢酸含有アセトニトリル)を用いてグラジエント溶出を行ったところ、propargylglycine, ibotenic acid, muscimol及びmuscarineの保持時間がいずれも2分以内であった。

これらの4成分はODSカラムへの保持が極めて弱いことが考えられ、夾雑成分による分析の阻害が懸念されたことから、本カラムは採用しなかった。

(2) 弱アニオン交換+弱カチオン交換+ODSマルチモードカラム

カラムにインタクト(株)製Scherzo SM-C18(2.0 \times 150mm, 粒子径3.0 μ m)を、移動相にA液(2.5mMギ酸アンモニウム含有0.1vol%ギ酸水溶液)及びB液(5mMギ酸アンモニウム \cdot 0.1vol%ギ酸含有50vol%メタノール)を用いてグラジエント溶出を行った。

その結果、上述(1)でODSカラムへの保持が弱いと考えられた4成分の保持時間はmuscarineが2.5分程度、その他の3成分は2分以内であり、保持の改善は確認されなかった。更にphalloidinのピーク形状が極めてブロードとなり十分な感度が得られなかったことから、カラムに吸着したことが示唆された。これらのことから、本カラムは採用しなかった。

(3) 強アニオン交換+強カチオン交換+ODSマルチモードカラム

カラムにインタクト(株)製Scherzo SS-C18(2.0 \times 150mm, 粒子径3.0 μ m)を用いて、(2)と同じ移動相及びグラジエント条件で検討を行った。

その結果、(1)と(2)では保持が弱かった4成分の保持時間は、ibotenic acidは2分程度であり改善が認められなかったが、propargylglycineは5分程度、muscimol及びmuscarineは18分程度となり、保持時間の延長が認められた。

上述の4成分は、その構造上の特徴やODSへの保持が弱かったことから高極性であることが示唆された。更に、強イオン交換基をもつカラムにより保持が改善したことから、

強イオン交換基との相互作用により保持が改善したことが示唆された。

一方 phallacidin については(2)と同様のピーク形状が確認され、カラムへの吸着が示唆されたが、その他の成分は良好に保持・分離していたことから、本カラムを採用し、移動相及びグラジエント条件により、全成分を分離する方法を検討することとした。

3. LC 移動相の検討

(1)移動相初期条件

移動相初期条件を水 100%としたところ、ibotenic acid の保持時間が 3 分程度まで延長した。また、初期条件を 20vol%メタノールにしたところ更に保持が強まり、15 分以上に延長したが、グラジエント溶出により移動相に酸及び塩が加わると直ちに溶出したため、移動相初期条件は 20vol%メタノールとし、酸や塩は添加しないこととした。

(2)移動相グラジエント溶出条件

酢酸と酢酸アンモニウムによるグラジエント条件では、酸濃度及び塩濃度のいずれを増加させても phallacidin のピーク形状は極めてブロードであり、カラムへの吸着が示唆された。そこで、ギ酸とギ酸アンモニウムによるグラジエント条件を検討し、B 液のギ酸濃度を 0.1vol%から 1vol%まで上げたところ、phallacidin のピーク形状がシャープになり、カラムから適切に溶出したことが示唆された。このことから、B 液のギ酸濃度を 1vol%とした。

各成分のクロマトグラフを図 2 に示した。

4. 精製方法の検討

中毒事故発生時には迅速な原因究明が重要であることから、緊急時に対応するため、簡便で迅速な精製方法を検討した。抽出液を C₁₈ ミニカラムで精製することにより、propargylglycine 以外の成分でマトリックスによるイオン化抑制、夾雑ピーク等の影響を軽減することができた。propargylglycine は C₁₈ ミニカラムでの精製ではマトリックスによるイオン化抑制の影響を軽減できなかったが、希釈により回収率が改善し、十分な検出感度が保たれたため、100 倍希釈液で定量することとした。

5. 添加回収試験

本分析法の定量性を確認するため添加回収試験を行った。試料とした食品はシイタケ、チョウセンアサガオの誤食原因となりやすいゴボウ及びそれらの具が入ったミソ汁とした。それぞれの試料に各成分 20μg/g を添加し、本分析法に従って測定した。propargylglycine については 100 倍希釈液で定量し、その他の成分については希釈せずに試験溶液で定量した。その結果、平均回収率 ($n=3$) は phalloidin では 121~155%とやや高めであったが、その他の成分では 74~120%の範囲内であり良好な結果が得られた。変動係数 (%)はすべての成分において 10%以内であった。検量線の相関係数 (r)はすべての成分において 0.98 以上で

あった。各成分の検量線相関係数 (r)、平均回収率 (%)及び変動係数 (%)を表 2 に示した。

6. 検出限界

過去の中毒事例^{1),4),6)}で報告されている原因食品中の毒成分の含有量は、phallacidin のデータは得られなかったが、その他の成分では 1.9~983μg/g であった。本法の検出下限値(表 1)とこれら含有量を比較したところ、中毒原因食品中の毒成分の検出は十分可能であることが示唆された。

7. 実試料への応用

検討した方法で野生キノコを分析したところ、毒キノコ様キノコを選んで採取した野生キノコ 22 検体中 10 検体(A~J)から 6 種類の毒成分を検出した(表 3)。

一方、登山道で採取した野生キノコ 10 検体からは、測定対象成分は検出されなかった。

これにより本法は、野生キノコ中の毒成分を一斉に検出することが可能であることが確認された。

本法は、試料の抽出から試験溶液の作成までが、数検体で約 30~40 分という極めて簡便な前処理法と、高感度な分析機器である LC-MS/MS を組み合わせた分析法である。

また本法の分析対象成分は、中毒件数の多いクサウラベニタケ(毒成分:muscarin 等)、ツキヨタケ(毒成分:illudins 等)及び死亡件数の多いドクツルタケ(毒成分:α-amanitin, β-amanitin, phalloidin, phallacidin 等)の成分を含めたキノコ毒 9 成分と、チョウセンアサガオ毒 2 成分であり、野生キノコから毒成分を検出することが可能であることが確認された。

以上のことから本法は、中毒発生等の緊急時に十分応用できる有用な検査法であると考えられた。

まとめ

LC-MS/MS を用いたキノコ毒及びチョウセンアサガオ毒の簡便な分析法を検討した。

1. LC カラム：インタクト(株)製 Scherzo SS-C18(強アニオン交換+強カチオン交換+ODS マルチモードカラム)により、今回測定対象とした 11 成分が分離可能であることがわかった。
2. 移動相：初期条件は 20vol%メタノールで、溶出グラジエントには 10mM ギ酸アンモニウム・1vol%ギ酸含有 90vol%メタノールを用いた。
3. 前処理：ギ酸含有メタノールと水で抽出後、C₁₈ ミニカラムで精製した。
4. 添加回収試験：シイタケ、ゴボウ及びミソ汁を試料とし

て、20 μ g/gの添加濃度で添加回収試験を実施した結果、各試料の平均回収率(n=3)は phalloidin では121~155%、その他の成分においては74~120%であった。

5. 実試料への応用：検討した方法により野生キノコ32検体を分析したところ、10検体から6種類の毒成分を検出した。

謝辞

本研究に illudin S 標準品を御供与頂きました山形県衛生研究所 笠原義正博士に深謝いたします。

文献

- 1) 吉岡直樹, 赤松成基, 三橋隆夫, 他: LC/TOF-MS を用いた数種キノコ毒のスクリーニング分析法の検討. 平成24年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部自然毒部会研究発表会 講演要旨集, 2012
- 2) 久野恵子, 高井靖智, 橋爪崇, 他: 健康危機管理に対応した自然毒一斉分析法の検討—有毒植物および毒きのこ19成分—. 第48回全国衛生化学技術協議会年会 講演要旨集, 2011
- 3) 立野幸治, 藤原美智子, 三浦泉: LC/MS/MSによる尿中植物性自然毒一斉分析手法の検討. 山口県環境保健センター所報, 52, 54 - 58, 2009
- 4) 岡山明子, 田原俊一郎, 氏家英司, 他: キノコ中毒におけるムスカリンの分析について. 奈良県衛生研究所年報, 30, 71 - 74, 1995
- 5) 厚生労働省: 毒キノコによる食中毒等の発生状況, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/syohisya/101022-2.html>
- 6) 厚生労働省: 自然毒リスクプロファイル, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/>

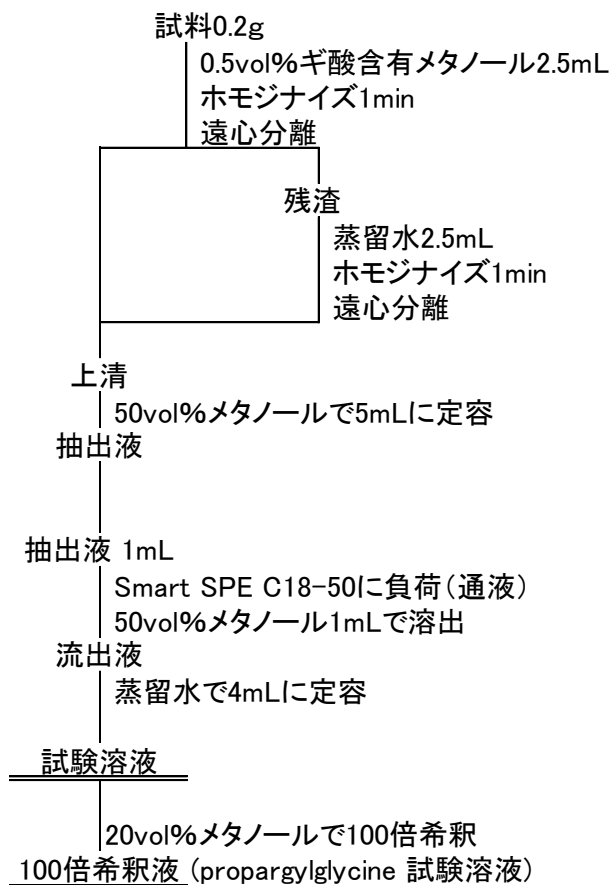


図1 試験溶液の調製方法

表1 分析対象成分の保持時間, 検出限界値, 測定イオン

化合物名	保持時間 (min)	検出限界値 (ng/mL)	定量イオン (Da)	定性イオン (Da)	Cone (V)	Collision (定量) (eV)	Collision (定性) (eV)
propargylglycine	3.9	0.1	114 > 74	114 > 68	16	10	10
α -amanitin	7.8	5	919 > 86	919 > 259	40	64	50
illudin S	7.9	5	265 > 247	265 > 95	14	6	10
ibotenic acid	18.7	10	159 > 114	159 > 113	20	20	10
phalloidin	22.6	10	789 > 86	789 > 157	32	80	52
β -amanitin	23.0	5	920 > 86	920 > 259	46	56	46
phalloacidin	24.2	10	847 > 86	847 > 157	38	74	58
muscarine	27.5	0.5	174 > 57	174 > 60	34	18	18
muscimol	28.3	10	115 > 98	115 > 68	20	12	18
scopolamin*	30.1	0.1	304 > 138	304 > 156	28	24	15
atropin*	30.8	0.1	290 > 124	290 > 93	40	22	28

※チョウセンアサガオ毒,その他はキノコ毒

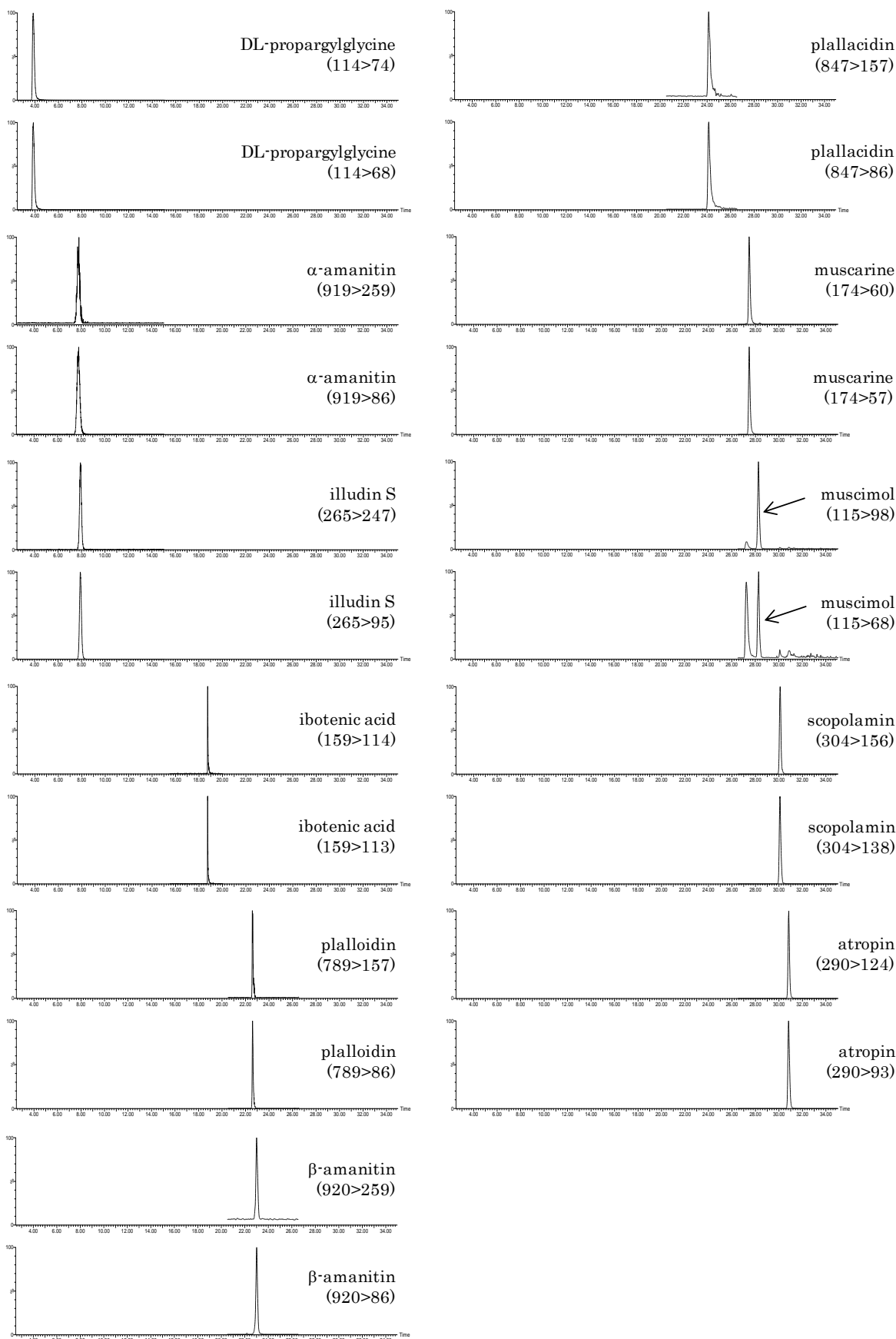


図2 各成分のクロマトグラフ(混合標準溶液150ng/mL)

表2 添加回収試験における各成分の検量線相関係数, 平均回収率と変動係数 (n=3)

成分名	検量線 相関係数(r)	シイタケ		ゴボウ		ミソ汁	
		平均回収率 (%)	変動係数 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
propargylglycine	0.995	110.5	4.9	114.3	1.9	114.2	3.8
α-amanitin	0.987	92.3	1.9	89.3	3.0	114.0	5.9
illudin S	0.994	85.3	1.7	87.9	0.5	93.8	6.2
ibotenic acid	0.998	74.4	5.2	80.5	9.9	92.1	2.0
phalloidin	0.994	130.8	3.6	155.0	4.6	121.1	6.1
β-amanitin	0.997	117.7	4.5	120.1	5.9	109.1	8.9
phallacidin	0.999	115.2	1.9	102.5	2.7	117.2	6.9
muscarine	0.991	89.7	0.9	92.5	1.5	79.9	4.1
muscimol	0.995	105.3	2.7	88.4	1.0	98.9	3.5
scopolamin	0.994	91.5	0.7	83.4	2.7	95.8	3.8
atropin	0.995	89.8	0.7	92.0	2.4	100.1	4.5

表3 野生キノコから検出された毒成分とその濃度

検体	α-amanitin	β-amanitin	phalloidin	phallacidin	ibotenic acid	muscimol
A	1762.6	0.7	1625.0	943.0	ND	ND
B	876.5	0.6	862.5	245.7	ND	ND
C	414.4	0.7	580.9	158.0	ND	ND
D	700.5	0.7	882.6	495.6	ND	ND
E	ND	ND	ND	2.3	ND	ND
F	ND	ND	1.7	ND	ND	ND
G	ND	ND	1.2	ND	ND	ND
H	ND	ND	ND	ND	118.8	69.4
I	ND	ND	ND	ND	175.2	57.3
J	ND	ND	ND	ND	16.8	3.6

ND: not detected.

(μg/g)