食中毒の原因物質となる植物性自然毒（リコリン、コンバラトキシン）の同時分析法

誌名	愛知県衛生研究所報
ISSN	05157803
著者名	後藤,智美 尾関,史晃 青山,文生 伊藤,裕子 上野,英二 猪飼,誉友
発行元	愛知県衛生研究所
巻/号	65号
巻号補足	
掲載ページ	p. 31-38
発行年月	2015年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

愛知衛所報　No.65, 31-38, 2015

調　査　研　究

食中毒の原因物質となる植物性自然毒（リコリン、コンバラトキシン）の同時分析法

後藤智美、尾関史晃、青山文生、伊藤裕子[1]、上野英二、猪飼誉友
[1]愛知県がんセンター中央病院

要　旨

ニラ様植物が原因の食中毒において、その原因物質となる有毒物質を検出する目的でスイセンに含有されるリコリン、スズランに含有されるコンバラトキシンの同時分析法を検討した。試料から水で抽出し、PLS-2 カートリッジにより精製した試験溶液を HPLC-UV で測定し、LC-MS/MS で確認するという方法を確立した。この方法を用いてスイセン及びスズランの分析に適用したところ、それぞれの有害物質は夾雑物の影響を受けることなく良好なピーク形状で分離・検出が可能であり、添加回収率 95.1～98.5％、標準偏差（RSD%）3.7％以下と良好な結果が得られた。ニラ、スイセン及びスズランを食材として、誤食の可能性のあるおひたし、味噌汁、卵とじを調理後、分析に供した。いずれの調理済み食品においても、分析の妨害となるピークは認められず、それぞれの有害物質を良好に定量・確認することが可能であった。

キーワード:リコリン、コンバラトキシン、スイセン、スズラン、食中毒、HPLC-UV、LC-MS/MS

はじめに

食中毒は全国で毎年 1,000 件以上発生しており、その原因物質は、カンピロバクターやサルモネラなど細菌、ノロウイルスなどウイルス及びアニサキスなど寄生虫が患者数全体の 9 割を占めている。この他に動物性及び植物性の自然毒、ヒスチジンから生成したヒスタミンによる化学性食中毒がある[1)]。このうち、フグによる食中毒の多くは自家調理によるものであり、致死率の高いことがよく知られている。また、植物性自然毒による食中毒の大半は、野草やきのこ等の有毒植物を食用可能なものと誤認して摂食することにより発生している。近年の健康志向及び登山ブームを反映して、誤食による食中毒事例の報告数は増加傾向にある。当所においても、ジャガイモ中のソラニン及びチャコニンによる中毒事例や、チョウセンニンジンをゴボウと誤認して喫食した中毒事例への対応を実施している。このため、今後、発生する可能性のある植物性自然毒による食中毒に備えて、迅速かつ簡便な分析法を開発しておく必要があると考えられる。

スイセンは有毒物質であるリコリン（Lycorine）[2)]を、スズランは同じくコンバラトキシン（Convallatoxin）[3)]を含有しており（図 1）、その若芽をニラ等と誤認

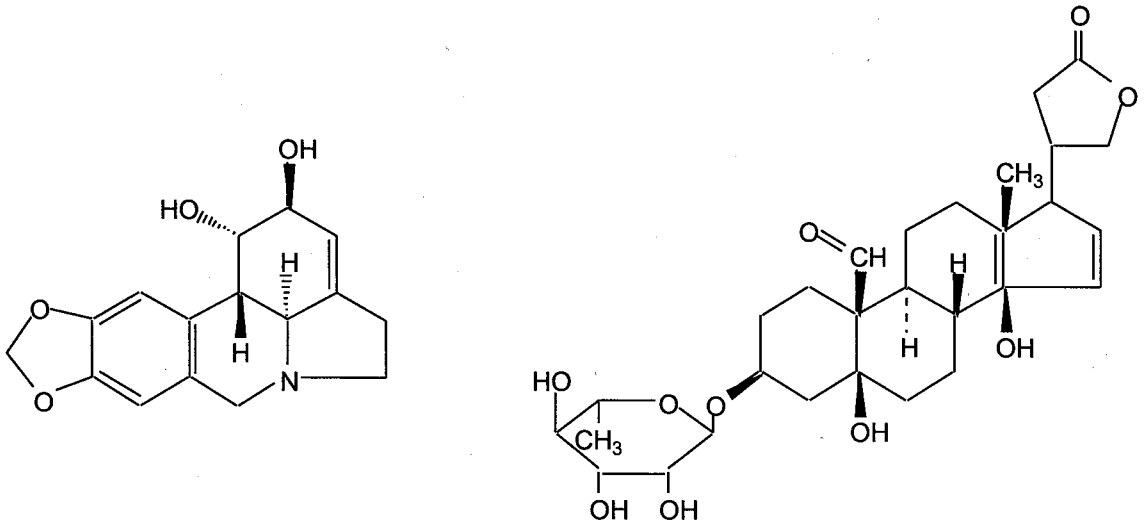


図1 リコリン及びコンバラトキシンの構造式

して喫食して食中毒を引き起こすことがあるため、今回、これらによる食中毒発生時に備えるための同時分析法を検討した。なお、食中毒が発生した場合、その原因食品は調理済みのものであることから、調理品によっては様々な食品成分による妨害が懸念される。そのため、このような妨害を回避できる HPLC-UV（High performance liquid chromatography / ultraviolet spectroscopy、高速液体クロマトグラフィー/紫外分光法）による定性・定量法、さらに、より精密な確認が可能な LC-MS/MS（Liquid chromatography /tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法）による同時分析法を検討の後、調理済み食品に応用し、その有用性を確認したので報告する。

方　法

1.試料

試料は、平成 22 年度に名古屋市内で観賞用として購入したスイセンとスズランの葉のみを細切したもの及び市内の小売店で購入したニラを使用した。

2.試薬及び標準品

アセトニトリルは液体クロマトグラフィー用（和光純薬工業(株)製）、ギ酸は LC/MS 用（和光純薬工業(株)製）、その他の試薬は試薬特級を用いた。

標準品はシグマ社製のリコリン塩酸塩及びコンバラトキシンを用いた。(図 1)

超純水はミリポア社製 Simpli Lab を用いて調製したものを用いた。

固相抽出カートリッジはジーエルサイエンス社製 GL-Pak PLS-2(500 mg)を用いた。

3.標準溶液

標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 10 mL としたものを標準原液とし、これを適宜希釈して用いた。

4.装置及び測定条件

(1)HPLC 条件

装置：(株)島津製作所製 SPD-10Avp 型多波長検出器付 LC-10Svp システム及びクロマトパック C-R6A。カラム：Waters 社製 XBridge Phenyl カラム（4.6×150 mm, 3.5 μm)。移動相:A 液;アセトニトリル、B 液；0.02 M リン酸緩衝液(pH 2.5)。グラジエント条件：分析開始から 6.5 分まで A 液 5 %を保持した後、8 分までリニアグラジエント溶出で A 液 30 %とし、16 分まで A 液 30 %を保持した後、16.1 分から 30 分まで A 液 70 %を保持した後、A 液 5 %に戻し 45 分まで保持した。カラム温度：40 ℃。流速：1.0 mL/min。測定波長：290 nm（リコリン）、230 nm（コンバラトキシン）。注入量：10 μL

表1　リコリン及びコンバラトキシンのESI MS/MS条件

	Lycorine	Convallatoxin
Ion Mode	ESI+	ESI-
Precursor ion(m/z)	288	549
Cone Voltage(V)	40	42
Product ion(m/z)	147	385
Collision energy(eV)	28	18

(2)LC-MS/MS 条件

装置：Hewlett Packard 社製 HP-1100 LC に、Micromass 社製 Z スプレー付き Quattro II MS/MS を接続して用いた。カラム:Waters 社製 XBridge Phenyl カラム (2.1×150 mm, 3.5 μm)。移動相：A 液；0.1 %ギ酸メタノール、B 液；0.1 %ギ酸水溶液。グラジエント条件：A 液 10 %から 5 分までのリニアグラジエント溶出で A 液 35 %とした後、9 分までのリニアグラジエント溶出で A 液 40 %とした後、A 液 10 %として 25 分まで保持した。カラム温度：30 ℃。流速：0.2 mL/min。注入量：1 μL。測定モード：MRM。イオン化モード：リコリン；ESI＋、コンバラトキシン；ESI－。イオン源温度：400 ℃。その他の条件は、表 1 に示した。

5．分析操作

試料 2 g を秤取し、超純水 50 mL を加えてホモジナイズ抽出した。毎分 3,100 回転で 10 分間遠心した後、上清をガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液を、あらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL でコンディショニングした PLS-2 (500 mg、5 mL) に負荷し、水 5 mL で洗浄後、30 %アセトニトリル 5 mL で溶出した。溶出液を適宜希釈して試験溶液とした。

6．添加回収試験

スイセン及びスズランに、リコリン及びコンバラトキシンがそれぞれ 50 ppm となるよう標準溶液を添加した後、本法にしたがって分析した。スイセンのリコリン定量値は、試験溶液より得られた値から、ブランク溶液より得られた値を差し引いて求めた。同様に、スズランのコンバラトキシン定量値を求めた。

7．調理品の添加回収試験

スイセン、スズラン及びニラを用いて、以下の調理品を調製した。

(1)おひたし

ビーカーに水 200 mL を加えガスバーナーで加熱して沸騰させた後、各試料 25 g を加えて 2 分間加熱し、引き揚げて水を絞り、かつおぶし 5 g と醤油 5 mL を加えた。

(2)味噌汁

ビーカーに水 200 mL を加え、ガスバーナーで加熱して沸騰させた後、各試料 25 g と油揚げ 5 g を加えて 2 分間加熱し、だし入り味噌を加え放冷した。

(3)卵とじ

ビーカーに水 50 mL と市販の顆粒出汁を加え、ガスバーナーで加熱して沸騰させた後、各試料 25 g と醤油 2 mL を加えて 2 分間加熱し、溶き卵 20 mL を加え放冷した。

(1) ～ (3) の固形部分を細切した後、リコリン及びコンバラトキシンがそれぞれ 50 ppm となるよう標準溶液を添加した後、本法に従って分析した。

結果および考察

1．HPLC 条件の検討

リコリン及びコンバラトキシンの紫外吸収スペクトルを測定し、その結果より HPLC-UV における測定波長をそれぞれ 290 nm、230 nm とした。移動相に用いる溶媒については、コンバラトキシンの測定波長が 230 nm と比較的低波長であるため、低波長側に吸収を持たない溶媒を選択する必要があり、アセトニトリルを選択した。

分析カラムについては、当初、ODS を検討したが、移動相に 20 %アセトニトリルを用いて測定した結果、リコリンとコンバラトキシンいずれも 3 分以内に溶出したが、

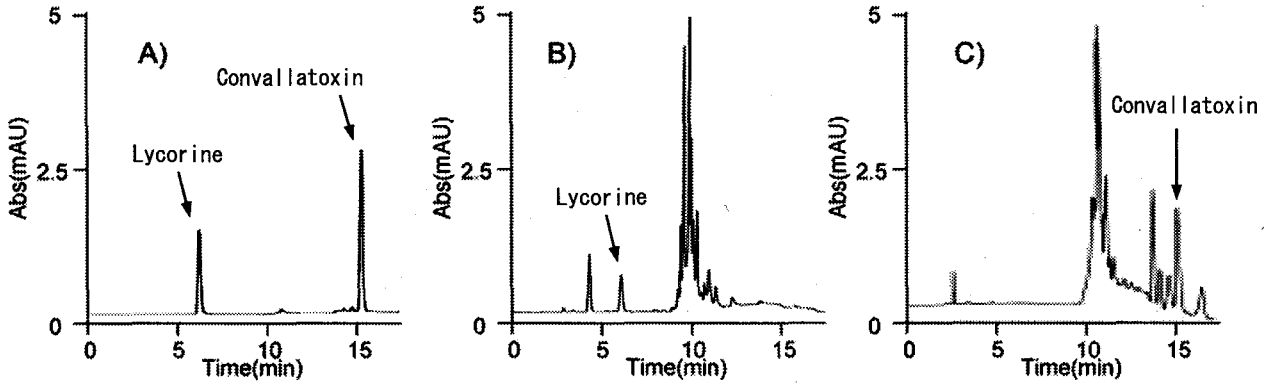


図2　HPLC-UVにより得られたクロマトグラム：A）リコリン及びコンバラトキシンの標準溶液（10 ppm），B）スイセンの試験溶液，C）スズランの試験溶液

著しくテーリングしたピークとなった。次いで順相カラムである Cosmosil 5NH_2 を検討したが、リコリン及びコンバラトキシンのピークが分離せず、良好な結果を得ることができなかった。一方、XBridge Phenyl を用いたところ、0.1 %ギ酸メタノール-0.1 %ギ酸水溶液を用いたグラジエント溶出条件で、ある程度良好な分離及びピーク形状が得られた。LC-MS/MS は、必ずしも夾雑物との分離や良好なピーク形状を必要としないことから、上記条件を当該装置の分離条件として採用した。上記条件は、コンバラトキシンの保持が比較的強く、夾雑物の影響を回避するのに都合が良いと考えられた反面、リコリンについては保持が弱く夾雑物の影響を受けやすいことや、ピーク形状等に若干の問題があることなどから、HPLC-UV 分析には不十分であった。そこで、上述のカラムを用いて HPLC-UV に適用可能な分離条件をより詳細に検討した結果、アセトニトリル-0.02 M リン酸緩衝液（pH 2.5）を用いたグラジエント溶出条件下で良好な結果を得た。

方法の項に示した HPLC-UV 条件下で、図 2（A）に示したようにリコリンは 5.5 分に、コンバラトキシンは 15.2 分に良好に分離した。この条件におけるリコリン及びコンバラトキシンの検量線は、それぞれ 1～50 μg/mL の濃度範囲で、$r^2 \geqq 0.999$ の良好な直線性を示した。

2．精製法の検討

食中毒発生時には、調理された残品を検査する必要があり、夾雑物の影響が大きくなることが考えられたため、固相抽出法による精製を検討した。すなわち、それぞれの標準品水溶液 10 mL を各カートリッジカラムに通液し、通過液中の各濃度を測定して保持能力を、通液後のカートリッジを 30 %アセトニトリル 10 mL で溶出して溶出能力をそれぞれ評価した。その結果、表 2 に示したように GL-Pak PLS-2 が最も良好な結果を示したため、これを用いることとした。

3．抽出法の検討

これまで報告されている自然毒分析法[4)-6)]の多くが、メタノールによる抽出を行い、その抽出液を希釈して試験溶液とし、妨害ピークとの分離を必ずしも必要としない LC-MS/MS を用いて測定を行っている。しかし、メタノールは、水と比較して多くの夾雑物も抽出するため、妨害ピークが出現しやすい HPLC-UV に適用するためには、煩雑な精製操作が必要となる。リコリン及びコンバラトキシンはともに水溶性であり、リコリンを含有したヒガンバナは水にさらすことで喫食が可能となる飢饉食[7)]であったこと、スズランを差したコップの水を飲用して死亡した報告[8)]があることから、超純水による抽出法を検討した。試料に細切したスイセンとスズランを用い、試料量として 2 g を、抽出液量として 50 mL をそれぞれ選択し、一回抽出と二回抽出における定量値を比較した。その結果、両者間には 2～3 %の差しか認められなかった

表2　各種カートリッジカラムからのリコリン及びコンバラトキシンの溶出率（%）

Cartridge column	Effluent		Eluate	
	Lycorine	Convallatoxin	Lycorine	Convallatoxin
Bond - Elut C18 (500 mg)	6	N.D.	90	99
Mega Bond - Elut C18 (1 g)	2	N.D.	95	99
Bond - Elut SCX (500 mg)	25	92	N.D.	N.D.
Bond - Elut PRS (500 mg)	88	N.D.	10	4
Sep - Pak Plus Silica (690 mg)	46	52	12	41
GL - Pak PLS - 2 (500 mg)	N.D.	N.D.	101	98

表3　食中毒原因物質（リコリン、コンバラトキシン）のスイセン及びスズランからの回収率

	Lycorine		Convallatoxin	
	Recovery(%)	RSD(RSD%)	Recovery(%)	RSD(RSD%)
スイセン	98.5	3.7	96.1	1.4
スズラン	95.1	1.8	97.9	3.1

n＝5, RSD : Relative standard deviation

ため、迅速性を考慮して一回抽出を選択した。なお、本分析法の要する時間は、3検体あたり5時間以内であった。

この分析法を用いて得られたスイセン及びスズランのHPLC-UVクロマトグラムを図2（B，C）に示した。スイセンからはリコリンのピークのみを検出し、コンバラトキシンと保持時間が重なるピークは検出されなかった。同様に、スズランからはコンバラトキシンのピークのみを検出し、リコリンと保持時間が重なるピークは検出されなかった。方法の項に従って、リコリン及びコンバラトキシンがそれぞれ50 ppmとなるよう添加して回収率を求めた。表3に示すように、回収率 95.1～98.5 %、標準偏差（RSD%）3.7 %以下の良好な結果を得ることができた。

4．LC-MS/MS測定条件の検討

MS/MS条件の検討を目的に、それぞれの濃度が2 ppmとなるようにメタノールで調製した標準溶液を、フローインジェクションでLC-MS/MSに導入し、それぞれのマススペクトルを得た。リコリンについてはm/z288にプロトン化分子$[M+H]^+$が、コンバラトキシンについてはm/z549に脱プロトン分子$[M-H]^-$が確認されたため、それらをプリカーサーイオンに用いて、MS/MS条件を最適化し、結果を表1に示した。

得られたLC-MS/MS条件を用いて標準溶液を測定した結果、図3（A－1，A－2）に示したようにリコリンは3.9分に、コンバラトキシンは6.6分に良好に分離した。また、スイセン及びスズランの試験溶液を測定した結果、妨害となるピークは検出されず、保持時間8分以内に良好なMRMクロマトグラムを得ることができた。この条件下における検出下限（S/N≧3）はリコリンは0.005 ppm、コンバラトキシンは0.02 ppmであった。

5．添加回収試験

方法の項7．調理品の添加回収試験に従って調製した各々調理品について、超純水で抽出しPLS-2カートリッジを用いて精製し、得られた試験溶液をHPLC-UV及びLC-MS/MS分析に供した。HPLC-UV及びLC-MS/MSいずれの測定条件においても、ニラを用いた調理品からはリコリン及びコンバラトキシンを妨害するピークは検出されなかった。同様に、スイセンを用いた調理品からも、リコリンのみを検出しコンバラトキシンを妨害するピークは検出されず、スズランを用いた調理品からも、コンバラ

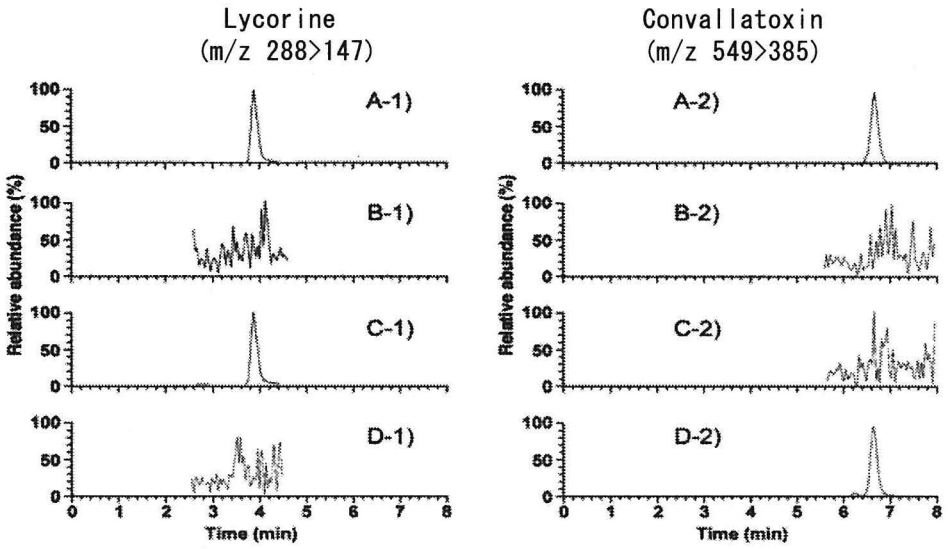


図3　LC-MS/MSにより得られた卵とじの試験溶液のMRMクロマトグラム：A）リコリン、コンバラトキシンの混合標準溶液（1 ppm），B）ニラを用いた調理品の試験溶液，C）スイセンを用いた調理品の試験溶液，D）スズランを用いた調理品の試験溶液

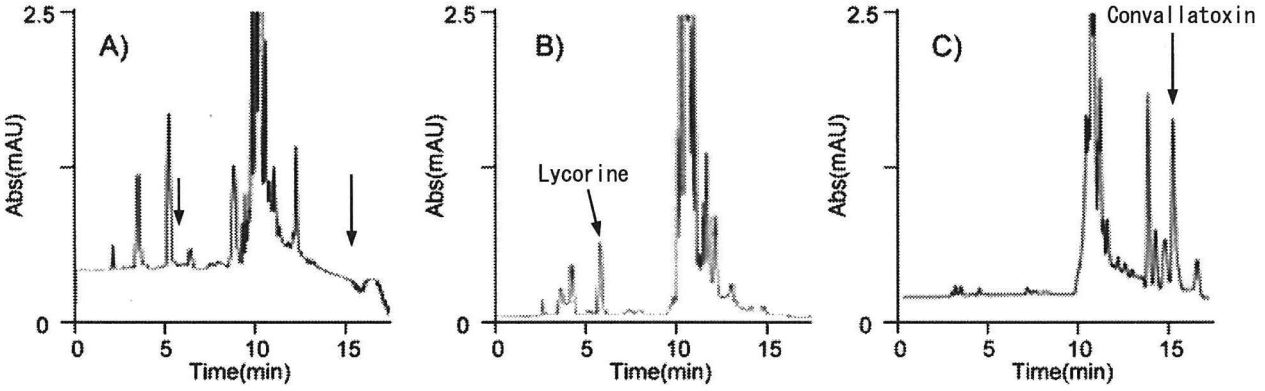


図4　HPLC-UVにより得られた卵とじの試験溶液のクロマトグラム：A）ニラを用いた調理品の試験溶液，B）スイセンを用いた調理品の試験溶液，C）スズランを用いた調理品の試験溶液

トキシンのみを検出しリコリンを妨害するピークは検出されなかった（図 3、4）。さらに、これら調理品からの添加回収試験を実施した。その結果、表 4 に示すように、すべての試料から 92.3～103.5 %の回収率が得られただけでなく、RSD %も 4 %以下と良好であった。

まとめ

有害物質を含有するスイセン及びスズランの誤食が疑われる食中毒発生に備えて、リコリン及びコンバラトキシンの同時分析法を検討した。観賞用として栽培されたスイセン、スズラン及びそれらを食材として用いた調理品を、超純水で抽出し PLS-2 カートリッジを用いて精製して試験溶液を調製した。アセトニトリル－0.02 M リン酸緩衝液(pH 2.5)混液によるグラジエント条件下、リコリン 290 nm、コンバラトキシン 230 nm の波長で HPLC-UV により測定したところ、いずれの試験溶液においても両有害物質は 20 分以内に良好な分離及びピーク形状を示した。この分析法における添加回収率は 92.3～103.5 %、RSD%は 4 %以下であった。また、上記試験溶液を用い、0.1 %ギ酸メタノール－0.1 %ギ酸水溶液混液のグラジエン

表4　食中毒原因物質（リコリン、コンバラトキシン）のおひたし、味噌汁、卵とじからの回収率

		Lycorine		Convallatoxin	
		Recovery(%)	RSD(RSD%)	Recovery(%)	RSD(RSD%)
おひたし	ニラ	96.5	3.7	94.6	2.1
	スイセン	101.8	1.8	97.1	1.1
	スズラン	96.2	1.1	98.2	2.9
味噌汁	ニラ	92.3	1.8	94.1	1.9
	スイセン	99.8	3.7	95.1	2.2
	スズラン	97.8	2.3	100.9	3.9
卵とじ	ニラ	98.1	2.0	93.7	1.6
	スイセン	103.5	3.9	94.9	1.4
	スズラン	96.2	1.8	99.9	3.8

n=5, RSD : Relative standard deviation

ト条件下で LC-MS/MS による確認法を検討した結果、いずれも両有害物質を８分以内に良好に検出し確認することが可能であった。加えて、前処理から確認・定量までに要する時間は３検体あたり５時間程度であった。以上の結果より、本法は、迅速かつ簡便であることから、ニラ様植物の誤食による食中毒発生時の原因物質の定量・確認法として有用であることが示唆された。

文　献

1) 厚生労働省：食中毒事件一覧速報（2012年12月11日現在）；http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html

2) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル(2012年12月11日現在);http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/higher_det_09.html

3) 岡田稔監修:新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑，p.622，2002，北隆館，東京.

4) 上田泰人，伊藤光男：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，60-61，2008.

5) 藤原美智子，立野幸治：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，山口県環境保健センター所報，58-61，2008.

6) 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，福岡市保健環境研究所，89-92，2009.

7) 樋口清之:梅干と日本刀.140-152,2000,祥伝社，東京.

8) 朝日新聞社編:薬草毒草300.94,1986,朝日新聞社，東京.

The simultaneous analysis of vegetable natural poison (lycorine and convallatoxin) that causes food poisoning

Tomomi Goto, Fumiaki Ozeki, Fumio Aoyama, Yuko Ito[1], Eiji Ueno, Yoshitomo Ikai

[1] Aichi Cancer Center Hospital

We developed a new multi analysis method for two vegetable natural poisons, lycorine and convallatoxin contained narcissus and lily of the valley that have sometimes be eaten by mistake with edible plant such as leek. The two compounds are extracted from sample by ultra-pure water. The extract was cleaned-up by PLS-2 cartridge column, and the resulting solution was applied to HPLC-UV and/or LC-MS/MS for the determination and/or the confirmation of the two compounds. To evaluate the performance of present method, three popular dishes of Japan were prepared using narcissus, lily of the valley and leek as foodstuffs, and were applied to analysis. Lycorine and convallatoxin were successfully identified on the chromatograms of each dish used narcissus and lily of the valley, respectively, and any interfering peaks were not observed on those of all test samples. The recoveries were up to 90 % with satisfactory RSD value of < 4.0 % for both compounds at poisoning level, suggesting that the present method are usable to solve the food-poisoning accident related narcissus and lily of the valley.

Key words: lycorine, convallatoxin, narcissus, lily of the valley, food poisoning, HPLC- UV, LC-MS/MS