

ドクササコの毒性成分アクロメリン酸AおよびBのLC-MSを用いた分析法の検討

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
巻/号	585
掲載ページ	p. 241-245
発行年月	2017年10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



調査・資料

ドクササコの毒性成分アクロメリン酸Aおよび
BのLC-MSを用いた分析法の検討

(平成29年6月27日受理)

吉岡直樹^{1,*} 大内仁志² 菅 敏幸² 吉田昌史¹ 野村素行¹Rapid LC-MS Determination of Acromelic Acids A and B, Toxic Constituents
of the Mushroom *Paralepistopsis acromelalga*Naoki YOSHIOKA^{1,*}, Hitoshi OUCHI², Toshiyuki KAN², Masashi YOSHIDA¹ and Motoyuki NOMURA¹¹ Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences:
2-1-29 Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan;² School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka:
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan; *Corresponding author

A rapid LC-MS method was developed for determination of acromelic acids A and B, which are toxic constituents of *Paralepistopsis acromelalga* (= *Clitocybe acromelalga*), in mushroom samples. Acromelic acids were extracted twice with 50% methanol and the extract was passed through a syringe filter, and then analyzed by LC-MS. The LC separation was performed on a multi-mode ODS column. The recoveries of acromelic acids A and B spiked into blank mushroom samples at 2.5 µg/g were 93 and 74%, respectively. This method was applied to the remaining mushroom sample from a food poisoning case. Acromelic acids A and B were detected at 2.0 and 1.4 µg/g, respectively, in the remaining sample. Another toxic constituent, which appeared to be clitidine, was also detected in the sample.

(Received June 27, 2017)

Key words: ドクササコ *Paralepistopsis acromelalga*; アクロメリン酸 acromelic acid; 食中毒 food poisoning; 液体クロマトグラフィー-質量分析計 LC-MS

緒 言

ドクササコ (*Paralepistopsis acromelalga*) はキシメジ科 (*Tricholomataceae*) のキノコであり、傘の表面は淡橙黄色～茶褐色を呈し、主に本州の日本海側地域の雑木林に多く発生する¹⁾。これまでドクササコは *Clitocybe* 属とされていたが、同属の分類見直しにより、ドクササコやセイヨウドクササコ (*Clitocybe amoenolens*) などを独立させ、新属として *Paralepistopsis* 属が提唱された²⁾。本キノコを誤食した場合、中毒症状として、手足指先の痺れや疼痛、発赤を伴う肢端紅痛症を発症する³⁾。有毒成分としては、アクロメリン酸類 (アクロメリン酸A, B等)⁴⁾ やクリチジン⁵⁾ (Fig. 1) を含有することが知られているが、食中毒症状と原因物質との関係ははっきりしていない⁶⁾。登田らの調査によると、ドクササコを原因とする食中毒は、国内では平成元年～22年で50件 (患者数109名) の中毒事

例が報告されている⁷⁾。

キノコ試料からの毒成分の分析例としては、ツキヨタケのイルジンS⁸⁾、テングタケ類のイボテン酸およびムシモール⁹⁾、アマトキシシキ類およびファロトキシシキ類を含む一斉分析法¹⁰⁾ 等が報告されている。しかし、アクロメリン酸については、Bessardらがドクササコやセイヨウドクササコ (*Paralepistopsis amoenolens*) の乾燥品中のアクロメリン酸Aの分析法を報告¹¹⁾ しているのを除き、分析例はほとんどない。今回、ドクササコ中毒の疑いのある食中毒発生時において迅速な定量分析が可能で、アクロメリン酸A, BのLC-MSを用いた分析法を検討した。また、本法を用いて兵庫県内で発生したキノコによる食中毒事例において、喫食残品中のアクロメリン酸A, Bを分析した結果についても報告する。

実験方法

1. 試 料

分析条件の検討および添加回収試験には、小売店で購入したシイタケを用いた。中毒事例の分析においては、

* 連絡先 Naoki_Yoshioka@pref.hyogo.lg.jp

¹ 兵庫県立健康生活科学研究所: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29² 静岡県立大学薬学部: 〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1

2016年11月に兵庫県内で発生した食中毒の喫食残品である「キノコの煮物」に含まれる具材(キノコ)を使用した。さらに、患者らの証言をもとに、同じ場所で類似したキノコを新たに採取し、試料とした。採取したキノコは外部形態に基づき、秋山弘之博士(兵庫県立人と自然の博物館)によってドクササコと同定され、傘の部分进行分析を使用した。なお、これらの試料は実験に供するまで -20°C で保管した。

2. 標準品および試薬等

アクロメリン酸A, Bは、ジクロロピリジンと2-ケトペンタン酸誘導体から合成し、NMRで純度を確認(98%以上)したもの^{12),13)}を標準品として使用した。各標準品をそれぞれ50% (v/v) メタノールに溶解し、アクロメリン酸Aは210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アクロメリン酸Bは120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準原液とした。また、各標準原液を混合・希釈し20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準溶液とし、50% (v/v) メタノールで適宜希釈して分析に用いた。L-グルタミン、L-トレオニン、L-グルタミン酸は協和発酵工業(株)製の標準品を用い、水に溶解して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準原液を調製し、適宜希釈して使用した。

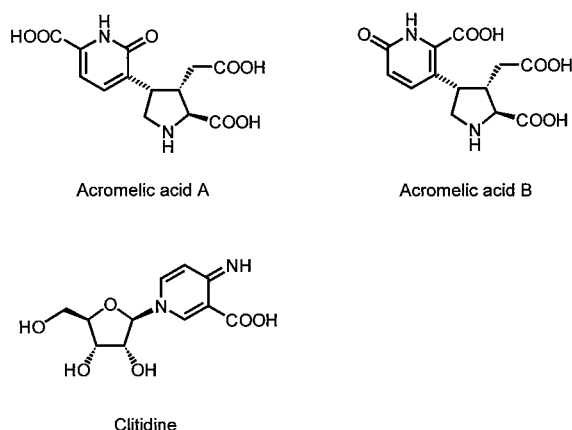


Fig. 1. Chemical structures of compounds examined in this study

メタノールおよびアセトニトリルは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用、ギ酸は和光純薬工業(株)製LC/MS用を用いた。シリンジフィルターはGEヘルスケア社製プラディスク(0.45 μm , PVDF, 13 mm)を使用した。

3. 装置

ホモジナイザーはIKA社製ULTRA-TURRAX T8を使用し、遠心機は日立工機社製CF6RNを使用した。LC-MSはAgilent社製1200 Series LCおよび6210 TOF-MSDを用いた。

4. 測定条件

LC-MSの測定条件をTable 1に示した。

5. 試験溶液の調製

細切均一化した試料0.2 gに50% (v/v) メタノール水溶液2 mLを加え、1分間ホモジナイズした。これを $720 \times g$ で5分間遠心分離し、上清を取った。残さに50% (v/v) メタノール水溶液2 mLを加え、同様に再度抽出を行った。抽出液を併せて50% (v/v) メタノール水溶液で5 mLに定容し、シリンジフィルターを通したものを試験溶液とした。

6. 添加回収試験

細切均一化したシイタケ試料0.2 gに、アクロメリン酸A, Bの20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準溶液を0.1 mL (10 $\mu\text{g}/\text{g}$ 相当)および5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合標準溶液0.1 mL (2.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 相当)添加し、「5. 試験溶液の調製」と同様の操作を行った。また、シイタケ試料に2.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 相当量添加した試験溶液のクロマトグラムを用い、ピーク高さ(S)およびノイズ(ベースラインのpeak-to-peakノイズ)高さ(N)を測定し、 $S/N = 10$ として定量限界を算出した。

7. アミノ酸の分析

L-グルタミン、L-トレオニン、L-グルタミン酸について、各1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準溶液を調製した。これらのアミノ酸標準溶液を、キノコ試料からの試験溶液とともにTable 1の条件を用いてLC-MSで分析し、保持時間およびマススペクトルの比較を行った。

Table 1. LC-MS operating conditions

LC parameters	Column	Intakt Scherzo SS-C18 (3.0 mm \times 150 mm, 3 μm)
	Mobile phase	A: 0.5% formic acid B: acetonitrile containing 0.5% formic acid
	Gradient elution	A : B = 100 : 0 (0 min) \rightarrow 100 : 0 (2 min) \rightarrow 70 : 30 (12 min) \rightarrow 70 : 30 (25 min) \rightarrow 100 : 0 (25.01 min) \rightarrow 100 : 0 (35 min)
	Flow rate	0.3 mL/min
	Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$
	Injection volume	2 μL
MS conditions	Ionization mode	ESI (Positive)
	Capillary voltage	4,000 V
	Nebulizer pressure	60 psi
	Drying gas	13 L/min (350 $^{\circ}\text{C}$)
	Fragmentor voltage	150 V
	Scan range	m/z 50–1,100
	Quantitation ion	m/z 311.0874 [M+H] ⁺
	Extracted ion range	m/z 311.0874 \pm 0.01
	Reference mass	m/z 121.0509 (purine) and m/z 922.0098 (hexakis(1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine)

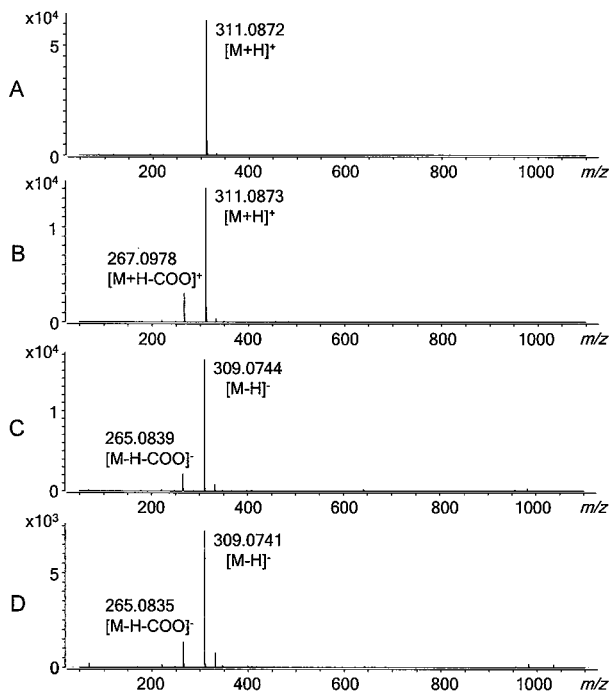


Fig. 2. Mass spectra of acromelic acids A (A) and B (B) in positive ion mode, and acromelic acids A (C) and B (D) in negative ion mode at a fragmentor voltage of 150 V

結果および考察

1. 分析条件の検討

アクロメリン酸A, Bは極性が高いため、予備実験においては、通常のODSカラム等の逆相カラムでは保持が弱く分析が困難であった。Bessardらは平面構造を持つ化合物の保持に優れたグラファイトカーボン充填剤のカラムを用いアクロメリン酸Aの分析を行っている¹¹⁾。今回、より汎用性が高く、多成分一斉分析に使用されるイオン交換能を有するマルチモードODSカラムの使用を検討したところ、0.5%ギ酸水溶液-0.5%ギ酸含有アセトニトリル系のグラジエント溶出の移動相条件を用いることにより、アクロメリン酸A, Bを分離することが可能であった。

また、MSのイオン化について、フラグメンター電圧200 V以下において、ポジティブモードではアクロメリン酸Aは [M+H]⁺のみが、アクロメリン酸Bは [M+H]⁺および [M+H-COO]⁺が観測されたが、ネガティブモードでは両化合物とも [M-H]⁻および [M-H-COO]⁻が観測された (Fig. 2)。アクロメリン酸標準溶液の感度はポジティブモードのほうがネガティブモードの約4倍高かったため、ポジティブモードで分析を行った。

本条件で分析したときのアクロメリン酸A, Bの検量線は、両化合物とも0.025~5 μg/mL (試料中濃度0.625~125 μg/g相当)の範囲で直線性が認められた (r=0.999)。

2. 抽出条件の検討

アクロメリン酸A, Bの標準品はメタノールには難溶であったが、50%メタノールには容易に溶解したことから、およびBessardらも乾燥キノコからの抽出に50%メタノールを用いていることから、抽出溶媒として本溶液を用いた。

Table 2. Recoveries of acromelic acids spiked into shiitake mushroom

Compound	Spiked level (μg/g)	Recovery (%)	RSD (%)
Acromelic acid A	2.5	93.2	6.6
	10	102	3.1
Acromelic acid B	2.5	74.1	8.9
	10	77.7	6.6

(n=5)

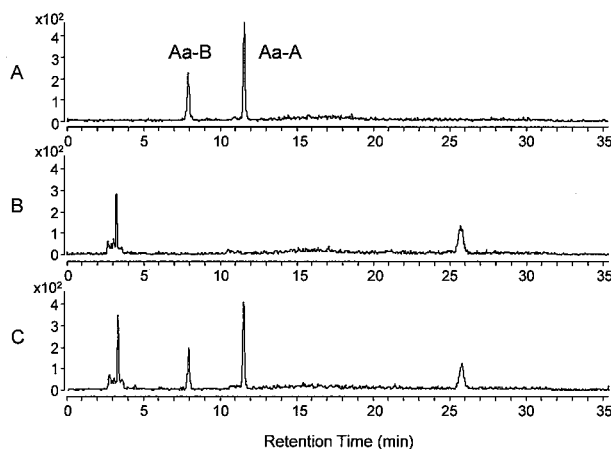


Fig. 3. Typical extracted ion chromatograms at m/z 311.0874±0.01 obtained from 0.1 μg/mL standard solution of acromelic acids (A), blank shiitake mushroom (B) and shiitake mushroom spiked with acromelic acids at 2.5 μg/g (C)

Aa-A: acromelic acid A, Aa-B: acromelic acid B

るを用いていることから、抽出溶媒として本溶液を用いた。

3. 添加回収試験

シイタケにアクロメリン酸A, Bを2.5および10 μg/g相当量添加し回収試験 (5試行)を行った。結果をTable 2に示し、代表的なクロマトグラムをFig. 3に示した。アクロメリン酸Aは90%以上、アクロメリン酸Bは70%以上の回収率であり、クロマトグラム上に定量の障害となる妨害ピークも見られず、良好な結果が得られた。シイタケに2.5 μg/g相当量添加した試験溶液のクロマトグラムから算出した定量限界 (S/N=10)は、アクロメリン酸Aで0.56 μg/g、アクロメリン酸Bで0.98 μg/gと算出された。

4. 食中毒事例における喫食残品中の分析

2016年11月に兵庫県内において、竹やぶに生えていたキノコを採取し、自宅で煮物に調理し、2名が喫食後に、四肢末端の発赤、腫脹、しびれ、痛みといった食中毒症状を呈した食中毒事例が発生した。本分析法を用いて喫食残品である「キノコの煮物」に含まれるキノコを分析した結果、アクロメリン酸A, Bをそれぞれ2.0, 1.4 μg/g検出した (Fig. 4, Table 3)。また、新たに採取したドクササコからも、それぞれ19, 9.6 μg/g検出した (Fig. 4, Table 3)。アクロメリン酸類はParalepistopsis属特有の成分であるこ

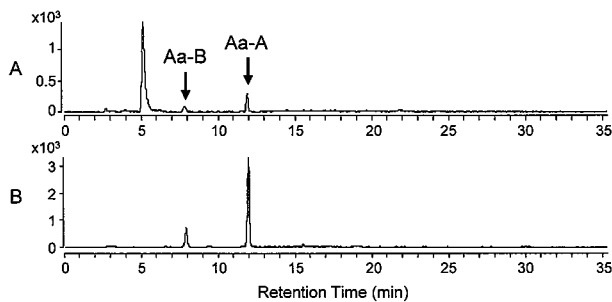


Fig. 4. Extracted ion chromatograms at m/z 311.0874 \pm 0.01 obtained from the remaining food sample (A) and from newly collected *Paralepistopsis acromelalga* (B)

Aa-A: acromelic acid A, Aa-B: acromelic acid B

Table 3. Contents of acromelic acids in sample from the food poisoning case

Sample	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	
	Acromelic acid A	Acromelic acid B
Remaining food sample	2.0	1.4
<i>Paralepistopsis acromelalga</i> newly collected	19	9.6

とから、喫食残品に含まれるキノコがドクササコであることが確認された。

次に、新たに採取したドクササコのトータルイオンクロマトグラム (TIC) 上に見られるアクロメリン酸以外のピークの検討を行った。Fig. 5のクロマトグラム (A) に示すTIC上に見られるピークa~dのうち、保持時間6~7分付近のa~cのピークは、精密質量から、それぞれアミノ酸であるa: グルタミン、b: トレオニン、c: グルタミン酸と推定されたため、これらの標準溶液を調製し、保持時間およびマススペクトルの比較により同定した。

また約18分に観測されるピークdについては、Fig. 6に示すマススペクトルにより精密質量が m/z 271.0932であり、ドクササコの毒性成分の1つであるクリチジン ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$) の $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 271.0925) と近似していたことから (質量誤差2.6 ppm)、クリチジンと推定された。また、クリチジンのピリジンカルボン酸部分 ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$; m/z 139.0502) と予想されるフラグメントイオン (m/z 139.0504) もスペクトル上で確認できた。

そして、新たに採取したドクササコおよび喫食残品中のキノコの試験溶液のクロマトグラムの再解析を行うと、Fig. 5の (B) (C) に示すように同ピークが観測されたことから、喫食残品中にクリチジンの含有も示唆された。

まとめ

ドクササコの毒性成分であるアクロメリン酸A, BのLC-MSによる迅速な分析法を検討した。キノコ試料から50%メタノール水溶液を用いて2回抽出を行い、LC-MS

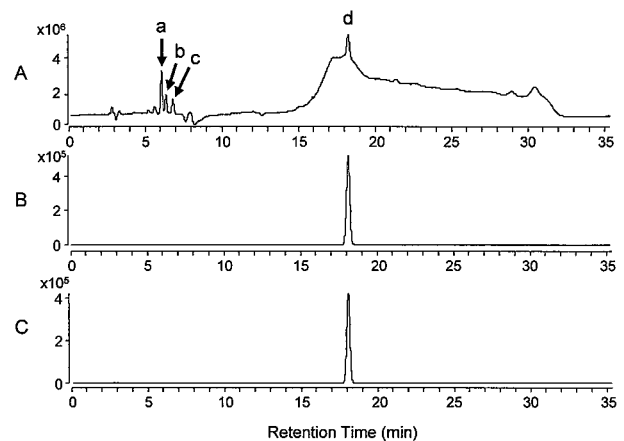


Fig. 5. Total ion chromatogram (A) and extracted ion chromatogram at m/z 271.0925 \pm 0.01 (B) obtained from newly collected *Paralepistopsis acromelalga* and extracted ion chromatogram at m/z 271.0925 \pm 0.01 obtained from the remaining food sample (C)

a: glutamine, b: threonine, c: glutamic acid, d: clitidine

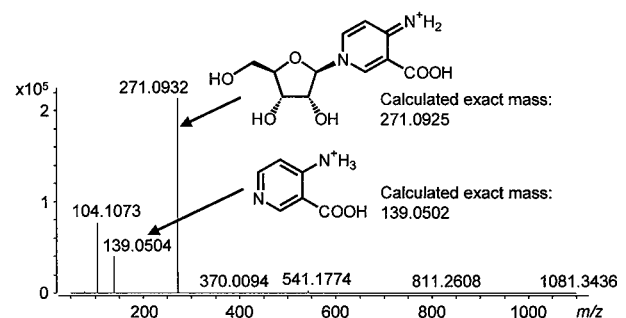


Fig. 6. Mass spectrum of peak d in the chromatogram obtained from newly collected *Paralepistopsis acromelalga* (Fig. 5A)

により分析を行った。シイタケにアクロメリン酸A, Bを2.5 $\mu\text{g/g}$ 相当添加したときの回収率はそれぞれ93%, 74%であった。本法を用いて兵庫県内で発生した中毒事例の喫食残品を分析した結果、アクロメリン酸A, Bを検出し、食中毒事例における迅速分析法として有用な方法であることが確認できた。

謝 辞

試料採取、情報収集していただきました兵庫県豊岡健康福祉事務所および兵庫県生活衛生課の関係者の方々、ならびにキノコ試料を同定していただきました兵庫県立人と自然の博物館の秋山弘之博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 今関六也, 大谷吉雄, 本郷次雄. 日本のきのこ. 東京, 山と溪谷社, 1999, 68 p. (ISBN 4-635-09020-5)
- 2) Vizzini, A., Ercole, E. *Paralepistopsis* gen. nov. and *Paralepista* (Basidiomycota, Agaricales). Mycotaxon,

- 120, 253–267 (2012).
- 3) Seki, T., Fukushima, H., Okuchi, K. A case of poisoning with *Clitocybe acromelalga* Ichimura treated by direct hemoperfusion. *Jpn. J. Clin. Toxicol.*, **28**, 247–248 (2015).
 - 4) Konno, K., Shirahama, H., Matsumoto, T. Isolation and structure of acromelic acid A and B. New kainoids of *Clitocybe acromelalga*. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 939–942 (1983).
 - 5) Konno, K., Hayano, K., Shirahama, H., Saito, H., Matsumoto, T. Structure and synthesis of clitidine, a new pyridine nucleoside from *Clitocybe acromelalga*. *Tetrahedron Lett.*, **18**, 481–482. (1977).
 - 6) Fukuwatari, T., Sugimoto, E., Yokoyama, K., Shibata, K. Establishment of animal model for elucidating the mechanism of intoxication by the poisonous mushroom *Clitocybe acromelalga*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **42**, 185–189 (2001).
 - 7) Toda, M., Uneyama, C., Toyofuku, H., Morikawa, K. Trends of food poisonings caused by natural toxins in Japan, 1989–2011. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **53**, 105–120 (2012).
 - 8) Kasahara, Y., Itou, T. Determination of illudin S in *Omphalotus guepiniformis* and foods that caused food poisoning by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **50**, 167–172 (2009).
 - 9) Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y., Inoue, H., Yoshida, T., Kishi, T. Determination of muscimol and ibotenic acid in Amanita mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **852**, 430–435 (2007).
 - 10) Yoshioka, N., Akamatsu, S., Mitsunashi, T., Todo, C., Asano, M., Ueno, Y. A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **32**, 89–96 (2014).
 - 11) Bessard, J., Saviuc, P., Chane-Yene, Y., Monnet, S., Bessard, G. Mass spectrometric determination of acromelic acid A from a new poisonous mushroom: *Clitocybe amoenolens*. *J. Chromatogr. A*, **1055**, 99–107 (2004).
 - 12) Ouchi, H., Asahina, A., Asakawa, T., Inai, M., Hamashima, Y., Kan, T. Practical total syntheses of acromelic acids A and B. *Org. Lett.*, **16**, 1980–1983 (2014).
 - 13) Inai, M., Ouchi, H., Asahina, A., Asakawa, T., Hamashima, Y., Kan, T. Practical total syntheses of acromelic acids A and B. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 723–732 (2016).

ドクササコの毒性成分アクロメリン酸AおよびBの
LC-MSを用いた分析法の検討（調査・資料）

吉岡直樹* 大内仁志 菅 敏幸 吉田昌史 野村素行
食衛誌 58(5), 241~245(2017)

ドクササコの毒性成分であるアクロメリン酸A, BのLC-MSによる迅速な分析法を検討した。キノコ試料から50% (v/v) メタノール水溶液を用いて2回抽出を行い定容後、シリンジフィルターでろ過したものを、マルチモードODSカラムを用いLC-MSで測定した。シイタケにアクロメリン酸A, Bを2.5 µg/g相当添加したときの回収率はそれぞれ93%, 74%であった。本法を用いて兵庫県内で発生した中毒事例の喫食残品中のキノコを分析した結果、アクロメリン酸A, Bをそれぞれ2.0 µg/g, 1.4 µg/g検出したほか、クリチジンと推定される物質も確認できた。

* 兵庫県立健康生活科学研究所