

Ⅲ 調査研究

トリカブト由来アルカロイド類の LC/MS/MS 分析法

武原弘和 坂口美鈴 緒方美治 稲田裕司 小山信 近藤芳樹

1 はじめに

日本三大有毒植物の1つであるトリカブトには、アコニチン・メサコニチン・ヒパコニチン・ジェサコニチン等のアコニチン系アルカロイド類が含まれる。これらは強い毒性を持ち摂取すれば呼吸不全から死に至ることもある化合物である。

今回、誤食の観点からハチミツ中のアコニチン系アルカロイドの LC/MS/MS による分析法の検討を行った。

2 検査方法

(1) 試料

ハチミツ (百花蜜)

(2) 試薬及び器具

アコニチン (和光純薬製)、メサコニチン (和光純薬製)、ヒパコニチン (和光純薬製 : ハイパコニチン)、メタノール (LC/MS 用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、1mol/L 酢酸アンモニウム (HPLC 用)、ギ酸 (LCMS 用)、固相抽出用 C18 カラム (GL サイエンス社製)

(3) 分析装置及び分析条件

液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS) : LCMS-8050 (島津製作所)

LC 条件

条件 1 (植物毒多成分分析用)

カラム : Waters 製 CORTECS T3 150×2.1mm 2.7 μm、カラム温度 40℃、流速 0.25mL/min、注入量 5 μL、移動相 : A;1mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、B;メタノール、グラジエント : B 濃度 10%→4.5 分→45%→5.5 分→50%→1 分→80%(7 分)→0.5 分→100%(5 分)→0.5 分→0%(3 分)→0.1 分→10%

条件 2 (アコニチン系アルカロイド分析用)

カラム : Waters 製 CORTECS T3 150×2.1mm 2.7 μm、カラム温度 40℃、流速 0.25mL/min、注入量 3 μL、移動相 : A;0.01%ギ酸水溶液、B;メタノール、A 液 : B 液 = 51 : 49

MS 条件

検出器 : ESI(+)、ネブライザーガス : 3L/min、ヒーティングガス : 10L/min、ドラインガス : 10L/min、インターフェイス温度 300℃、DL 温度 250℃、ヒートブロック温度 400℃、インターフェイス電圧 4.0kV

表1 MRM条件

	アコニチン	メサコニチン	ヒパコニチン
定量イオン	646.20/586.30	632.20/572.25	616.20/556.20
確認イオン1	646.20/105.10	632.20/105.15	616.20/524.20
確認イオン2	646.20/368.20	632.20/354.15	616.20/105.10
確認イオン3	646.20/526.25	632.20/540.20	616.20/338.25
確認イオン4	646.20/554.25	632.20/512.20	616.20/496.25

(4) 試験溶液の調製

a) 抽出

均質化した試料 5.00g を計り取り、水 10mL、アセトニトリル 10mL を加え、振とう後、塩化ナトリウム 1.0g、無水硫酸マグネシウム 4.0g 添加し 1 分間振とう。

遠心分離し上澄みを抽出溶液とした。

b) 精製

アコニチン系アルカロイドが低濃度の場合や、検体が調理されたもので共雑物が多い状態でも検査できるように抽出液の精製法について検討した。

抽出液 1mL に水 5mL 加えて混和、メタノール 4mL、水 4mL でコンディショニングした C18 (1000mg) 固相カラムに注入。水 2mL で洗浄、0.4%ギ酸メタノール 4mL で溶出させる。溶出液を正確に 4mL とし、試験溶液とした。

(5) 添加回収試験

I : ハチミツにアコニチン・メサコニチン濃度各 10mg/kg となるように添加した。

II : ハチミツにアコニチン 10mg/kg、メサコニチン 5mg/kg、ヒパコニチン 0.05mg/kg となるように添加した

3 結果

LC/MS/MS での測定において、検量線については絶対検量線法を用いた。検量線は 0.05 μ g/mL ~ 50 μ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。

添加回収試験 I

ハチミツ中アコニチン、メサコニチンの添加回収試験を C18 カラム精製なしに LC 条件 I で実施した。

表2 アコニチン・メサコニチン各 10mg/kg 添加 (1000 倍希釈液を測定)

	測定濃度(μ g/L)	試料濃度(mg/kg)	回収率
アコニチン	10.08	10.08	100.8%
メサコニチン	10.39	10.39	103.9%

添加回収試験 II

ハチミツ中アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチンの添加回収試験を C18 カラム精製後 LC 条件 II で実施した。

表 3 アコニチン 10mg/kg、メサコニチン 5mg/kg、ヒパコニチン 0.05mg/kg 添加

	測定濃度(μ g/L)	試料濃度(mg/kg)	回収率
アコニチン(800 倍希釈)	12.29	9.83	98.3%
メサコニチン(800 倍希釈)	5.96	4.77	95.4%
ヒパコニチン(40 倍希釈)	1.32	0.0528	105.6%

結果は添加回収試験 I・II とともに良好な添加回収率が得ることができた。

添加回収試験 II において LC 条件 I ではアコニチンとヒパコニチンのピークが重なる。このため定量精度の向上を目指し LC 条件 II を採用した。

4 まとめ

今回、LC/MS/MS によるハチミツ中のアコニチン系アルカロイド測定法を検討したところ、良好な結果が得られた。

本検査法は、ハチミツによるアコニチン系アルカロイド中毒の定性検査が迅速に行え、C18 カラムによる精製で微量なアコニチン系アルカロイドの定量も行えることが判明し、有用であることが確認された。

今後、現在測定条件の検証が不十分なジェサコニチンの検査条件の確立、ハチミツ以外の食品中のアコニチン系アルカロイド検査への適用、中毒患者の血清・尿中のアコニチン系アルカロイド測定の検討が必要と考える。

参考文献

食品衛生雑学誌. Vol. 35, No. 1 (1994) , p46 「はちみつによる食中毒の病因物質について」

食品衛生雑学誌. Vol. 49, No. 2 (2008) , p76 「LC/MS/MS によるトリカブトおよび食中毒原因食品中のアコニチン系アルカロイドの一斉分析」

食品衛生検査指針 理化学編 2015 p905

第 37 回農薬残留分析研究会(2014) 「STQ 法におけるハチミツ中ネオニコチノイド分析への応用」