

## LC/MS/MSによる尿中植物性自然毒一斉分析手法の検討

保健科学部 食品・医薬品分析グループ  
立野 幸治, 藤原 美智子, 三浦 泉

### Simultaneous Determination of phytotoxins in urine with LC/MS/MS Kouji Tachino, Michiko Fujiwara, Izumi Miura

#### はじめに

トリカブト、きのこなどに含まれる植物性自然毒による食中毒は、各種啓発活動が実施されているにもかかわらず全国で散発している。このため健康危機管理の観点から当グループでは、植物性自然毒の機器分析手法を検討している。

今回、摂食情報が得られない状況を考え、植物性自然毒成分のうち尿から検出された報告<sup>1)~3)</sup>のある植物性自然毒の一斉分析手法を、高速液体クロマトグラフ・質量分析計(LC/MS/MS)を使用して検討したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 分析対象物質

摂食後尿から検出される情報がある自然毒のうち、標準品が確保できた起源植物トリカブトのハイパコニチン(和光純薬工業(株)製)、メサコニチン(和光純薬工業(株)製)、アコニチン(和光純薬工業(株)製)、ジェサコニチン(三和生薬(株)製)、起源植物ドクツルタケの $\alpha$ -アマニチン(GALBIOCHEM製)、ファロイジン(和光純薬工業(株)製)、起源植物チョウセンアサガオのアトロピン(和光純薬工業(株)製)、スコポラミン(TOCRIS COOK SON inc製)、起源植物ジャガイモの $\alpha$ -ソラニン(和光純薬工業(株)製)、 $\alpha$ -チャコニン(和光純薬工業(株)製)、起源植物イヌサフランのコルヒチン(和光純薬工業(株)製)の11植物性自然毒を分析対象物質とした。

##### 2. 装置

高速液体クロマトグラフ: Agilent社製1100シリーズ,  
質量分析装置: Applied Biosystems社製API2000

ロータリーエバポレーター: 東京理化機械(株)製N1100シリーズ

##### 3. 試薬等

固相抽出用カートリッジカラム: Waters社製OasisHLB VAC RC(60mg)

水: 和光純薬工業(株)製超純水

メタノール: 和光純薬工業(株)製LCMS用メタノール

ギ酸アンモニウム: 和光純薬工業(株)製特級

HPLC用カラム: Cadenza CD-C18 3 mm i.d.  $\times$  150 mm 3  $\mu$ m(イタクト(株)製), Atlantis HILIC Silica 2.1 mm i.d.  $\times$  150 mm 3  $\mu$ m(Waters社製), Scherzo SM-C18 2.0 mm i.d.  $\times$  150 mm 3  $\mu$ m(イタクト(株)製)

除粒子フィルター: ADVATEC社製DISMIC-13HP(0.2  $\mu$ m)

##### 4. MS/MS条件

イオン化法は、ESI(Electron Spray thermo Ionization)を用い、MRM(Multiple Reaction Monitoring)測定法の条件を検討した。

##### 5. 精製法

尿1 mlを、メタノール5 ml、水5 mlでコンディショニングした固相抽出用カートリッジカラム(Oasis HLB V

AC RC(60 mg))に負荷し、15%メタノール5 mlで洗浄した後、メタノール5 mlで溶出した。これを、ロータリーエバポレーターで40°Cで減圧濃縮し、窒素気流で乾固した後、メタノール1 mlで溶解し、除粒子フィルターを通したものをLC/MS/MS測定溶液とした。

##### 6. 検量線の作成

各分析対象物質を秤量し、メタノールで溶解し、1000  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/mlの標準原液を調製した。これを混ぜ合わせ、適宜メタノールで希釈し、20 ng/ml~500 ng/mlの混合標準メタノール溶液を調製した。

尿成分によるイオン化抑制、促進の可能性が考えられることから、5. 精製法で処理した尿精製物に調製した200 ng/mlメタノール混合標準液を1 ml添加したもの(マトリックス添加200 ng/ml混合標準液)と、200 ng/mlメタノール混合標準液をLC/MS/MSで測定し比較検討した後、検量線を作成した。

##### 7. 添加回収試験

上記分析手法の妥当性を評価するため、健常者尿で添加回収試験を実施した。

##### 8. プロダクトスキャン

MRM測定法で最適化したイオンソース条件等を用い、プロダクトスキャン測定を行った。500 ng/ml混合標準溶液を用いCE20eV, 35eV, 50eVでMS/MSスペクトルを採取し、データベース化した後、マトリックス添加200 ng/ml混合標準液を用い一致率等を検討した。

#### 結果及び考察

##### 1. MS/MS条件

分析対象物質の1  $\mu$ g/mlのメタノール標準溶液をインフュージョン法により直接MS部に導入し、イオン化条件を検討した。全分析対象物質において、ポジティブモードで、プロトン付加分子  $[M+H]^+$  が観測されたため、これをプリカーサーイオンとし、最も感度が高いプロダクトイオンを定量用に、2番目に感度が高いプロダクトイオンを確認用にし、DP(Declustering Potential), CE(Collision Energy), FP(Focusing Potential)などを、最適化した。

次いで0.1  $\mu$ g/mlのメタノール標準溶液を用いFIA(フローインジェクションアナリシス)でCUR(Curtain GAS), CAD(Collision GAS), IS(Ion Transfer Voltage), TEM(Temperature), GS1(Ion Source Gas 1), GS2(Ion Source Gas 2)などのイオンソースの最適化を行った。この結果をTable 1に示す。

**Table 1.** MS conditions for detamination of 11 pyto toxins

Ionization	Electron Spray thermo ionization(ESI), Positive				
Analysis mode	Multiple Reaction Monitoring(MRM)				
Ion Transfer Voltage	4,500 V				
Turbo gas temperature	500				
Monitor ion	Mmono isotopic (Da)	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)	DP <sup>a)</sup> (V)	CE <sup>b)</sup> (eV)
Hypaconitine	615.32	616.30	77.20 <sup>d)</sup> 105.20 <sup>d)</sup>	76.00	77.00
Mesaconitine	631.31	632.30	105.30 <sup>c)</sup> 77.30 <sup>d)</sup>	66.00	81.00
Aconitine	645.32	646.40	105.20 <sup>c)</sup> 77.30 <sup>d)</sup>	76.00	129.00
Jesaconitine	675.34	676.40	135.20 <sup>c)</sup> 77.30 <sup>d)</sup>	71.00	81.00
α-Amanitin	918.97	920.30	86.30 <sup>c)</sup> 146.10 <sup>d)</sup>	96.00	113.00
Phalloidin	788.87	790.30	86.30 <sup>c)</sup> 157.10 <sup>d)</sup>	96.00	190.00
Atropine	289.37	290.10	124.20 <sup>c)</sup> 77.20 <sup>d)</sup>	51.00	77.00
Scopolamine	303.35	304.10	103.10 <sup>c)</sup> 77.30 <sup>d)</sup>	51.00	51.00
α-Solanine	868.06	869.60	98.20 <sup>c)</sup> 399.30 <sup>d)</sup>	121.00	113.00
α-Chaconine	852.06	853.70	98.20 <sup>c)</sup> 71.20 <sup>d)</sup>	151.00	117.00
Colchicine	399.44	400.10	152.20 <sup>c)</sup> 165.20 <sup>d)</sup>	46.00	117.00

a) DP:Declustering potential

b) CE:Collision energy

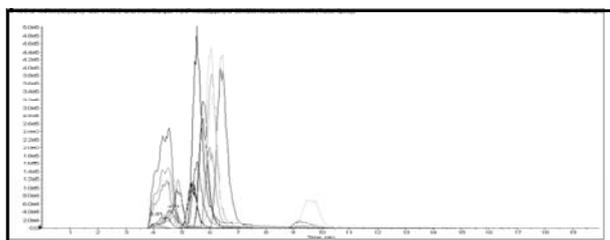
c) Used for confirmation

d) Used for quantitation

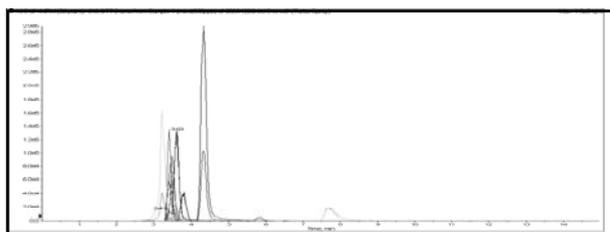
## 2. HPLC条件

HPLC条件の検討にあたっては、移動相を10mmolギ酸アンモニウム水溶液及びメタノール、カラム温度40℃とし、逆相系ODSカラムのCadenza CD-C18、逆-逆相系カラムのAtlantis HILIC Silica及びマルチモードODSカラム(アニオン交換+カチオン交換+順相+逆相)のScherzo SM-C18について、移動相条件を種々変化させ、感度、ピーク形状、分離等について比較検討した。

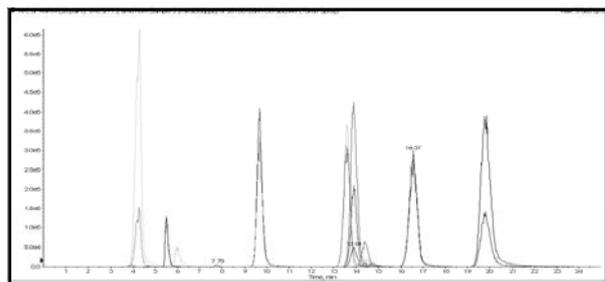
Cadenza CD-C18では、ピークがブロードとなり(Fig. 1), Atlantis HILIC Silicaでは、ピーク形状はシャープであったが、溶出時間が3分から9分と短く(Fig. 2), Scherzo SM-C18では比較的分離がよくシャープな形状のピークが得られたため、これを使用することとし、HPLC条件をTable 2に示したものとした。



**Fig.1** TIC 11 Pyto toxins with Cadenza CD-C18



**Fig.2** TIC 11 pyto toxins with Atlantis HILIC Silica



**Fig.3** TIC 11 pyto toxins with Scherzo SM-C18

**Table 2.** HPLC conditions for Determination of 11 pyto toxins

Column	Scherzo SM-C18 2.0mm i.d. x 150mm 3 μm
Column temp.	40
Flow rate	0.2 mL/min
Mobile phase	Solvent A:10 mmmol Ammonium Formate Aqueous Solution Solvent B:Methanol
Isocratic	A:B=1:9
Injection volume	10 μL

## 3. 検量線の作成

マトリックス添加200 ng/ml混合標準液と、200 ng/mlメタノール混合標準液を上記HPLC、MS/MS条件で測定した各植物性自然毒のピークのリテンションタイム、面積、高さをTable 3に示した。

尿生成物の添加によりリテンションタイムが変動しなかったのは -アマニチン、ファロイジン、コルヒチンで、他はリテンションタイムが早くなった。また、α-アマニチン、ファロイジン、コルヒチンでは、尿生成物の添加により面積、高さがやや減少し、ヒパコニチンなど他の自然毒はピークがよりシャープになり面積が減少し、高さが増加した。この典型的な例であるヒパコニチンの

MRMクロマトグラフをFig. 4に示した。

このことから、イオン化阻害、促進傾向があると考え  
検量線は、マトリックス添加検量線を使用することした。

検量線は、全物質において20 ng/ml～500 ng/mlの範囲  
でほぼ良好な直線性を示した。リテンションタイムの変  
動が大きかったアトロピンの検量線をFig. 5に示した。

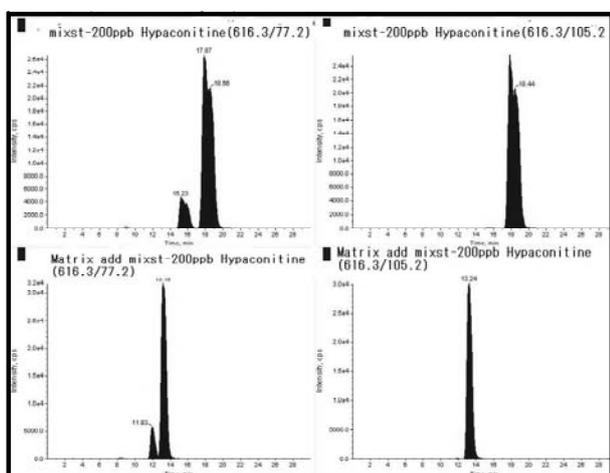
#### 4. 添加回収結果

上記分析手法の妥当性を評価するため、健常者尿で添  
加回収試験を実施した。この結果をTable 3に示した。

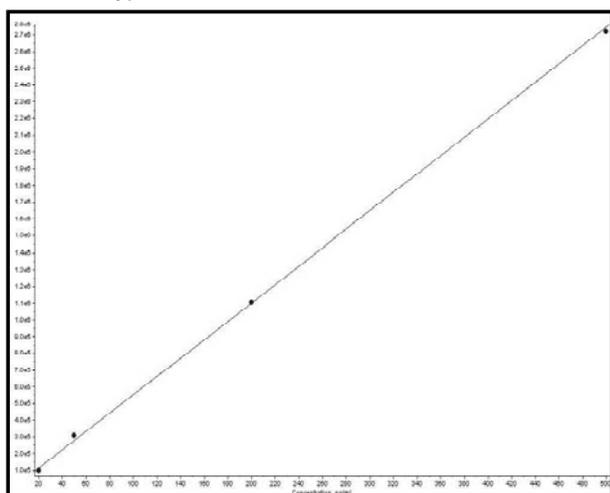
回収率100%を超えたものが多く、尿生成物によるイオ  
ン化促進等の影響を、マトリックス検量線だけでは排除  
できなかった可能性が考えられた。

**Table 3. 11 pytooxins using LC/MS/MS with or without urine extract**

No.	pytooxins	11 pytooxins mix200ng/ml methanol sol Retention Time (min)	Area (counts)	Height (cps)	11 pytooxins mix200ng/ml methanol sol add urea extract Retention Time (min)	Area (counts)	Height (cps)
1	Hypaconitine	17.9	2.33E+06	2.67E+04	13.2	1.52E+06	3.17E+04
2	Mesaconitine	10.9	1.90E+06	4.54E+06	9.6	1.63E+06	5.77E+04
3	Aconitine	15.0	2.11E+06	3.48E+04	11.8	1.54E+06	4.59E+04
4	Jesaconitine	15.3	2.55E+06	4.06E+04	12.0	1.74E+06	4.61E+04
5	α-Amanitin	4.5	1.35E+04	6.46E+02	4.4	1.13E+04	5.69E+02
6	Phalloidin	4.5	1.35E+04	6.11E+02	4.5	1.24E+02	4.40E+02
7	Atropine	21.2	4.16E+06	4.99E+04	15.9	2.76E+06	5.74E+04
8	Scopolamine	6.4	3.65E+05	1.70E+04	6.3	1.30E+05	6.66E+03
9	α-Solanine	16.3	8.72E+04	1.32E+03	12.3	6.53E+04	2.07E+03
10	α-Chaconine	15.9	3.23E+05	5.11E+03	12.3	2.73E+05	8.30E+03
11	Colchicine	5.2	2.19E+05	8.88E+03	5.1	8.56E+04	3.84E+03



**Fig.4** MRM chromatograms of 200 ng/ml Hypaconitine methanol sol. and matrix add 200 ng/ml Hypaconitine methanol sol.



**Fig.5** Standard curve of Atropine

**Table 3. Recoveries of 11 pytooxins**

pytooxins	Recovery (%) <sup>a)</sup>
Hypaconitine	118.7 ± 3.4
Mesaconitine	92.2 ± 7.6
Aconitine	107.7 ± 2.1
Jesaconitine	108.7 ± 3.8
α-Amanitin	104.0 ± 2.0
Phalloidin	83.7 ± 10.3
Atropine	122.7 ± 9.5
Scopolamine	110.7 ± 2.9
α-Solanine	109.3 ± 1.5
α-Chaconine	116.3 ± 1.5
Colchicine	102.8 ± 6.3

Sample were spiked at 100ng/g of 11 pytooxin in urine

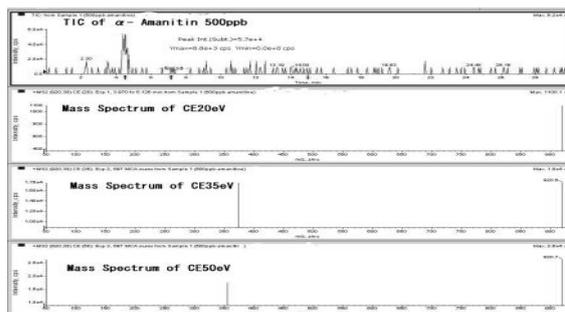
a) Values are the mean ± S.D. (n=3)

#### 5. プロダクトスキャン

500 ng/mlの混合標準液を使用しLC/MS/MSのマスペク  
トル採取で一般的に行われているコリジョンエネルギー  
(CE)20eV, 35eV, 50eVでのマスペクトルをプロダクトス  
キャン法で採取し、得られたマスペクトルをソフトウ  
ェア付属のデータベース機能でデータベース化した。

α-アマニチン、ファロイジン、スコポラミンでは十分  
な感度が得られず、得られたピークのS/N比が10以下で  
十分なマスペクトルが得られなかった。

典型的な例としてFig. 6に、α-アマニチンのTIC及び  
マスペクトルを、Fig. 7にメサコニチンのTIC及びマス  
スペクトルを示した。



**Fig.6** TIC and mass spectrums of α-Amanitin

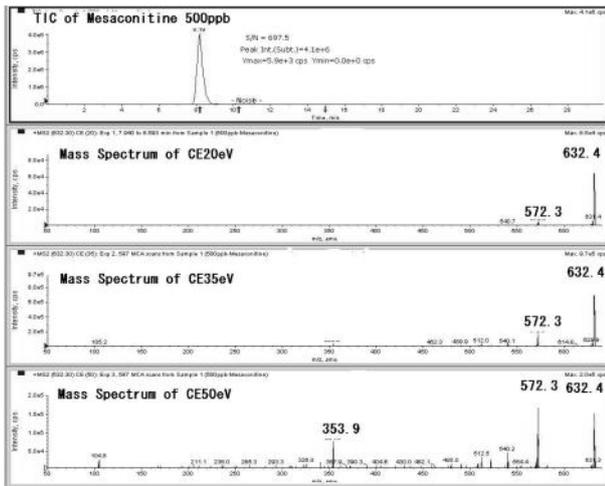


Fig.7 TIC and mass spectrums of Mesaconitine

データベース作成後、マトリックス添加200 ng/ml混合標準液を用いプロダクトスキャンを行い、得られたマススペクトルがデータベースと一致するか検証した。

各自然毒のデータベースとの一致率をTable 4に示した。各自然毒とも良好な一致率であった。

Table 4. Agreement rate with data base of pytoxtins

name	CE20eV	CE35eV	CE50eV
Hypaconitine	0.999	0.993	0.713
Mesaconitine	0.999	0.991	0.999
Aconitine	0.500	0.997	0.891
Jesaconitine	1.000	0.996	0.953
α-Amanitin	1.000	1.000	—
Phalloidin	0.986	0.986	0.631
Atropine	0.998	0.712	—
Scopolamine	0.997	—	—
α-Solanine	0.993	0.998	0.633
α-Chaconine	0.998	0.999	0.999
Colchicine	0.999	0.990	0.936

— : No matched

## まとめ

原因不明食中毒様事案発生時の原因追及の一環として摂食情報が得られない状況を想定し、尿中の植物性自然毒の一斉分析手法を検討した。

- 11自然毒のLC/MS/MSによるMRM測定において3種類のHPLC用分析カラムを比較検討したところ、マルチモードODSカラム（アニオン交換+カチオン交換+順相+逆相）を使用することにより、物性の異なる11種類の自然毒を分離よく、妨害ピークも少なく、低濃度域から高濃度域（20 ng/ml～500 ng/ml）の範囲で分析可能であることが確認できた。
- 今回検討した精製法による回収率は、83.7～122.7%を示し、1検体を精製するのに要する時間は約30分であった。
- MRM測定法で最適化したMS条件で、定性を目的としたプロダクトイオンスキャン測定を行い、得られた11種

類の自然毒のマススペクトルをデータベース化した。

これを用い200 ng/mlの11自然毒を添加した尿で得られたマススペクトルを用いデータベース検索したところ良好な一致率を示した。尿には、様々な医薬品等の化学物質が存在することが考えられ、MRM測定法と併用することでより確実な定性ができると考えられた。

4. トリカブト、ドクツルタケなど致死性の高い有害植物がもつ自然毒は、尿中に比較的高濃度かつ持続的に排泄され、トリカブト関連自然毒は20.7 ng/ml～1,070 ng/ml検出され<sup>1)</sup>、α-アマニチンは、8 ng/ml～190 ng/ml検出されている<sup>4)</sup>。

α-アマニチン、ファロイジンの感度が他の自然毒と比べ悪く20 ng/ml～500ng/mlの検量線としたが、検出事例から見て残品等が得られず、また聞き取り情報が得られない事例に有効な一斉分析手法と考えられる。

また、1mlの尿により今回検討した11自然毒については、約3時間程度で分析可能であることが確認できたことから、当センターにおける健康危機管理体制の強化を図ることができたと考えられる。

## 参考文献

- 1) 鈴木修，屋敷幹雄編：薬物分析実践ハンドブック—クロマトグラフィーを中心として—。東京，株式会社じほう，387-409，1993
- 2) 山辺真一，肥塚加奈江，山本淳，石井学，今中雅章：LC/MS/MSによる尿中のアトロピン，スコポラミンの迅速定量，岡山県環境保健センター年報，54，141-143，2008
- 3) 宅間範雄，荒尾真砂，古田和美，麻岡文代，川田常人，福永和俊：グロリオサによる食中毒事例—LC/MS/MSによるコルヒチンの分析—，高知県衛生研究所所報，54，41-45.2008
- 4) Jaeger A, Jehl F, Flesch F, et al.: Kinetics of amatoxins in human poisoning therapeutic implications. *J Toxicol Clin Toxicol*, 31, 63-80, 1993

