

(2) 調査・事例

- 1) LC-MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討 39
- 2) 公共用水域に係る全有機炭素（TOC）の調査 43

LC-MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討

御手洗 広子*¹、森 智貴、鷺野 美希、武田 亮、荒金 真理子*²

Examination of rapid simultaneous analysis of plant toxins by LC-MS/MS

Hiroko Mitarai, Tomoki mori, Miki Washino, Ryo Takeda, Mariko Arakane

Key word : 植物性自然毒 plant toxin、*a*-ソラニン *a*-Solanine、アコニチン Aconitine、メサコニチン Mesaconitine、アトロピン Atropine、スコポラミン Scopolamine、コルヒチン Colchicine、リコリン Lycorine

要 旨

高速液体クロマトグラフ質量分析装置を用いた植物性自然毒の多成分一斉法（LC-MS/MS法）について、前処理と装置の測定条件を検討し、検査体制を確立した。有毒植物実検体での前処理及び複数の自然毒標準品を用いた添加回収試験を実施し、検査方法の実用性ととも、原因植物が絞られていない段階のスクリーニング検査で役立つライブラリー検索機能の有用性を確認することができた。

はじめに

有毒植物の誤食による食中毒は、全国的に毎年多数発生しており、イヌサフランやトリカブト等、植物によっては死に至るなど重篤な症状を呈する。また、食用植物と間違えやすい植物は20種類以上にわたり、どの植物の食中毒がいつ発生するかは予想できない。よって、多成分の植物性自然毒を一斉にかつ迅速に定性分析及び定量分析できる体制を整備しておく必要があると考え、本研究に取り組んだ。

方 法

1 有毒植物を用いた前処理方法検討

誤食されやすい有毒植物のうち、単年で栽培が可能であったグロリオサ（根塊をヤマイモと誤食：測定対象成分コルヒチン）及びチョウセンアサガオ（つぼみをオクラと誤食等：測定対象成分スコポラミン）を栽培し、成長した植物を用いて、実際に植物から有毒成分を抽出し、装置の測定条件を検討した。操作はn=3で実施した。（チョウセンアサガオのつぼみは、少量しか採取できなかったためn=1）

1.1 検体

- (1) グロリオサ：平成29年度地方衛生研究所九州ブロック模擬訓練の結果検討会で熊本市から提供（平成29年度模擬訓練の原因植物）された根塊を当センター敷地内で栽培し、花が枯れた後に掘り起こした根塊を用いた。
- (2) チョウセンアサガオ：平成30年度地方衛生研究所九州ブロック模擬訓練結果検討会で熊本市から提供された種をセンター敷地内で栽培し、葉及びつぼみを用いた。

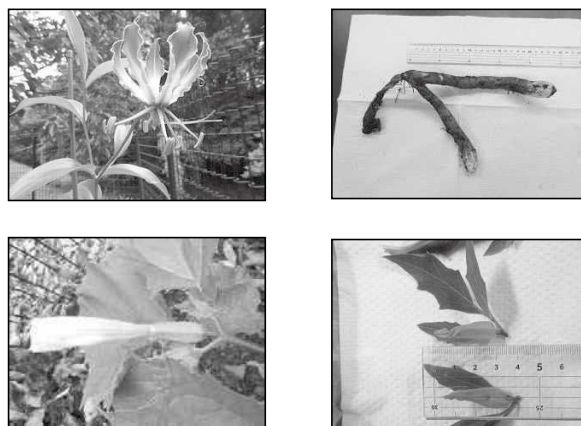


図1 検体写真（左上：グロリオサ花、右上：グロリオサ根塊、左下：チョウセンアサガオ花、右下：チョウセンアサガオつぼみ）

*¹：大分県環境保全課 *²：大分県中部保健所

1.2 試薬・標準品等

コルヒチン及びスコポラミンの標準品として、コルヒチン及びスコポラミン臭化水素酸塩n水和物（富士フィルム和光純薬(株)製、和光一級）をそれぞれ用いた。メタノールは残留農薬分析用、PTFE製メンブランフィルターはDISMICフィルター（13HP020AN）を用いた。

1.3 前処理

検体を包丁またはフードプロセッサーで細切、可能な限り均一化したものを試料とした。

試料1gにメタノールを20mL添加し、ホモジナイザーで粉碎、抽出した（10,000rpm、2分間）。その後、3,000rpmで5分間遠心分離器にかけ、上澄みを1mL分取し、メタノールで10mLに定容したものを試験溶液とした。試験溶液1mLを孔径0.2 μ m PTFE製メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS分析を行った（検体から200倍希釈）。また、試験溶液の50倍希釈（検体から10,000倍希釈）溶液の測定も実施した。

1.4 標準溶液及び検量線

コルヒチン標準原液（100 μ g/mL）及びスコポラミン標準原液（100 μ g/mL）を混合し、コルヒチン・スコポラミン混合標準原液（5 μ g/mL）を調製した。これをメタノールで希釈したものを検量線用標準液とし、1ng/mL～200ng/mLの8点検量線を作成した。

1.5 装置及び測定条件

表1のとおりであり、モニターイオンは2.5に記載するので省略する。

表1 装置及び測定条件

LC条件	
装置	: Agilent社製 1260Infinity II
分析カラム	: GLサイエンス社製 Inertsil ODS-3 (5 μ m, 2.1 \times 150mm)
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
移動相	: (A液) 10mMギ酸アンモニウム溶液 (B液) メタノール
グラジエント条件	: 0%B (0min.-2min.) \rightarrow 100%B (8min.-20min.) \rightarrow 0%B (25min.-30min.)
流速	: 0.2mL/min.
注入量	: 5 μ L
MS条件	
装置	: AB Sciex社製 QTRAP4500
イオン化法	: ESI (+)
測定モード	: MRM-EPI

2 多成分一斉分析法での添加回収試験

生野菜に自然毒標準溶液を添加し、本分析法での添加回収試験を行った。あわせて、標準溶液を繰り返し測定し、装置定量下限値を算出した。操作はn=3で実施した。

2.1 検体

小売店で購入したジャガイモ、水菜、ゴボウ、ヤマイモ、ニラ。ジャガイモは水洗いして皮をむき、ゴボウは水洗いして皮をむかず、水菜、ヤマイモ及びニラは水洗いせず野菜全体を検体とした。

2.2 試薬・標準品等

1.2の試薬等に加えて、アコニチン（富士フィルム和光純薬(株)製、生薬試験用）、メサコニチン（富士フィルム和光純薬(株)製、生薬試験用）、アトロピン硫酸塩（ナカライテスク(株)製、ナカライ規格特級）、 α -ソラニン（シグマアルドリッチ製、純度95%以上）、リコリン塩酸塩一水和物（東京化成製、純度98%以上）を用いた。

2.3 前処理

検体をフードプロセッサーで細切、可能な限り均一化したものを試料とした。試料1gに対して2.4の方法で調整し標準溶液（100 μ g/mL）を0.5mL添加した。（試料中50 μ g/g）ジャガイモに α -ソラニン、水菜にアコニチン及びメサコニチン、ゴボウにアトロピン及びスコポラミン、ヤマイモにコルヒチン、ニラにリコリンを添加した。その後の操作は、1.3と同じであり、50mLに定容した。（図2操作フロー参照）

2.4 標準溶液及び検量線

添加用に α -ソラニン、アコニチン、メサコニチン、アトロピン、スコポラミン、コルヒチン及びリコリンの標準原液（100 μ g/mL）をそれぞれ調製した。それらを混合して植物性自然毒7種混合標準原液（5 μ g/mL）を調製し、これをメタノールで希釈したものを検量線用標準液とし、1ng/mL～200ng/mLの8点検量線を作成した。

2.5 装置及び測定条件

1.5と同条件であり、以下のイオンを測定した。

表2 モニターイオン

測定成分	モニターイオン (m/z)
α -ソラニン	868.5 \rightarrow 398.4(定量),722.3(定性),706.3(定性)
アコニチン	646.3 \rightarrow 586.3(定量),554.2(定性),526.3(定性)
メサコニチン	632.3 \rightarrow 572.2(定量),354.2(定性),540.2(定性)
アトロピン	209.1 \rightarrow 124.1 (定量),76.9 (定性),91.0 (定性)
スコポラミン	304.1 \rightarrow 138.1(定量),156.1(定性),103.0(定性)
コルヒチン	400.2 \rightarrow 358.2(定量),310.2(定性),341.2(定性)
リコリン	288.1 \rightarrow 147.1(定量),119.0(定性),91.0(定性)

添加した7種自然毒成分に加えて、ヒパコニチン、ジェサコニチン、 α -チャコニン、ガラントミン、ジギトキン、オレアンドリン、ベラトラミン、ジェルビン、プロトベラトリンも測定成分とし、16種の自然毒成分一斉分析条件を設定した。

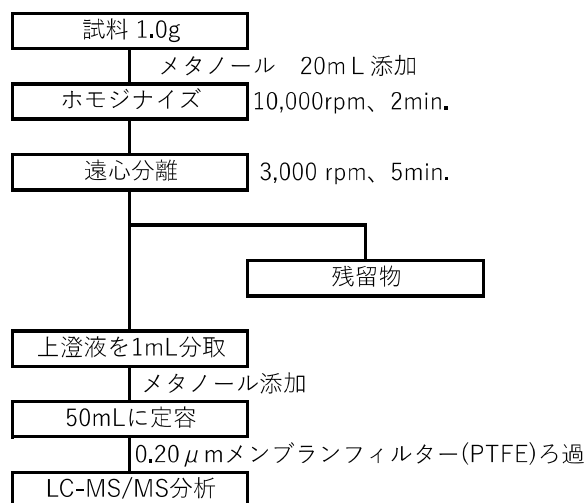


図2 操作フロー

3 ライブラリー検索機能を利用した定性

グロリオサ及びチョウセンアサガオ試験溶液で検出したピークをライブラリー検索し、含有成分を特定できるか確認した。

結 果

1 有毒植物を用いた前処理方法検討

グロリオサ及びチョウセンアサガオから検出された成分は表3のとおりであった。

表3 有毒植物中の自然毒成分濃度

試料名	測定した自然毒成分	希釈率	濃度(µg/g)
グロリオサ(根塊)	コルヒチン	10,000倍	2176.2
チョウセンアサガオ(葉)	スコポラミン	10,000倍	88.5
チョウセンアサガオ(つぼみ)	スコポラミン	200倍	147.2

なお、チョウセンアサガオのつぼみは、確保できた少量(0.25g)の試料で測定を行い、グロリオサ根塊の測定結果は10,000希釈でも検量線範囲を超えている。(検量線最高濃度200ng/mLに対して、171~242ng/mL)また、メタノールに2種混合標準液を添加して前処理を実施した添加回収試験の結果は、コルヒチン112.6%、スコポラミン88.5%と良好であった。

表4 添加回収試験結果

野菜名	添加自然毒成分	検体濃度平均(µg/g) n=3	真度(回収率)(%)	備 考
ジャガイモ	α -ソラニン	76.3	153	ジャガイモ由来の α -ソラニンをマトリックス補正
水菜	アコニチン	51.8	104	トリカブト有毒成分
	メサコニチン	47.6	95	トリカブト有毒成分
ゴボウ	アトロピン	57.8	116	チョウセンアサガオ有毒成分
	スコポラミン	44.4	89	チョウセンアサガオ有毒成分
ヤマイモ	コルヒチン	48.0	96	グロリオサ有毒成分
ニラ	リコリン	47.7	95	スイセン有毒成分

2 多成分一斉分析法での添加回収試験

添加回収試験の結果は、表4のとおりであった。 α -ソラニンは、ジャガイモに含まれる成分(発芽部分や皮付近に多い)であり、SBLからも検出されたため、正確な回収率は算出できなかった。その他の植物については89%~116%であった。

また、7種混合標準溶液の繰り返し測定により装置定量下限値を算出したところ、表5のとおりであり、0.5ng/mL~ α -ソラニンの1.5ng/mLの範囲であった。

表5 装置検出下限値及び定量下限値

自然毒成分	装置検出下限値 IDL (ng/mL)	装置定量下限値 IQL (ng/mL)
α -ソラニン	0.6	1.5
アコニチン	0.3	0.8
メサコニチン	0.2	0.6
アトロピン	0.2	0.5
スコポラミン	0.2	0.5
コルヒチン	0.5	1.2
リコリン	0.3	0.9

3 ライブラリー検索機能を利用した定性

グロリオサ試験溶液からコルヒチンを、チョウセンアサガオ試験溶液からスコポラミン及びアトロピンの成分をライブラリーで推定できたが、複数の異なる成分も高い一致率で候補として挙がっていた。

考 察

実際に栽培した有毒植物(グロリオサ及びチョウセンアサガオ)の前処理及び測定により、誤食による食中毒が発生した際にどの程度の濃度の有毒成分を含有した検体を扱うことになるのか対応方法を確認しながら前処理方法を検討することができた。

有毒植物の測定結果から、検体を1,000倍以上希釈した試験溶液を測定し、その後検量線の範囲を超えるようであれば適宜希釈する方法が適当である。

また、7種自然毒成分の装置定量下限値が最も高い α -ソラニンで1.5ng/mLであることから、検量線は2ng/mL～200ng/mLの範囲で作成すれば十分であり、今回の検量線では1ng/mLの1点を除くと7点検量線になるが、点数が増えればその分測定時間を要するので、迅速さと定量の正確性を考慮して3点以上の検量線を作成すれば十分であると考ええる。

ライブラリー検索機能については、原因物質が絞られていない段階でのスクリーニングに有用ではあることがわかった。活用するにあたり、検索機能の特性上複数の成分が候補としてあがるため、検体の状態や現場での聞き取り情報などを加味した判断を行う必要がある。

今後は、優先順位をつけて複数の自然毒標準品を定期的に更新し、食中毒事例発生時にすぐに定性検査ができる体制を整えておくとともに、平常時に標準品の測定結果を追加していくことで、ライブラリー情報量（MSスペクトル、RT等）の充実にも努める。

参 考 文 献

- 1) 茶屋真弓, 原田卓也, 吉田純一: LC/MS/MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の検討, 鹿児島県環境保健センター所報 第19号, 67-71, (2018)
- 2) 大藤升美, 土田貴正, 野澤真理奈, 茶谷祐行: LC-MS/MSによる自然毒の迅速試験法の評価について, 京都府保環研年報 第58号, 41-46, (2013)

公共用水域に係る全有機炭素 (TOC) の調査

後藤 郁夫、山崎 信之、白石 桃子*、秋吉 貴太、水江 智子

Survey on Total Organic Carbon (TOC) in Public Waters

Ikuo Goto, Nobuyuki Yamasaki, Momoko Shiraiishi, Takahiro Akiyoshi, Satoko Mizue

Key words : COD : 化学的酸素要求量, TOC : 全有機炭素, 公共用水域 : public waters

要 旨

有機物による河川や湖沼の水質汚濁の指標として、生物化学的酸素要求量 (BOD) 及び化学的酸素要求量 (COD) が定められている。しかし、有機物の種類によって酸化率に大きな差があり¹⁾、また、共存する還元性無機物の影響を受けるので、有機汚濁物質の量を必ずしも正確に反映しない。一方、TOCは有機物に含まれる炭素 (C) を精度よく定量することができる。平成31年度の公共用水域の常時監視に係る水質測定計画に基づき、河川及び湖沼で採取した試料について、各水質項目を測定するとともに、TOCについても併せて測定し、その相関を調べた。BODや全窒素・全磷等の水質項目に比べると、CODは強い相関があることが確認できた。

目 的

平成31年2月の大分県環境審議会水質部会において、公共用水域等の水質に係るTOCの測定に対する県の取り組みについて質問されるとともに、数年分程度はCOD等と併せてTOCの測定結果を蓄積することが望ましいとの意見があった。

この意見を踏まえ、公共用水域の常時監視に係る河川及び湖沼の試料について、COD等の項目と併せてTOCを測定し、他の指標との相関を調べるとともに、現況を把握することを目的とした。

方 法

水質測定計画に基づき、当所に搬入される河川及び湖沼の試料について、昭和46年12月の環境庁告示59号「水質汚濁に係る環境基準について」に規定された方法でCOD等を測定し、日本産業規格K0102 22.2「燃焼酸化-赤外線式TOC計自動計測法」に準じた方法によりTOCを測定した。TOC自動計測器は三菱ケミカルアナリティック社製TOC-310V型を使用した。

なお、TOCの定量下限値は、検量線のために調

製した標準のなかで、最も低い0.5mg/Lと同じとした。

結果及び考察

河川及び湖沼の全測定結果に係るCOD-TOCプロットは図1のとおり。河川・湖沼ともにグラフ上で範囲が重なっており、傾向は概ね同じといってよい。線形近似したときの決定係数は0.83。

COD以外では、浮遊物質量、全磷、BODの順に相関がみられたが、決定係数は0.4~0.5であり、CODに比べると弱い。

CODをTOCで除した値をCT比とし、TOCに対してプロットすると図2のとおり。TOCが高いほど、CT比は概ね1に収束していく。逆に、低いほど発散し、TOCに対するCODの理論値 (試料中の有機物由来のCのみがCODとして全量定量されると仮定した場合のCT比) である2.66を超えるもの (全測定中5.4%) も少なからずあった。

*大分県生活環境部環境保全課

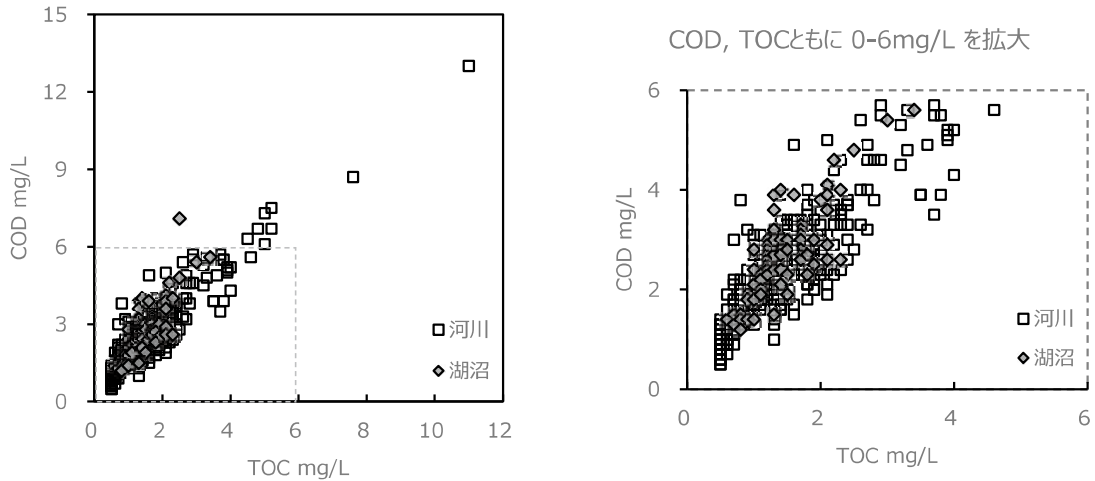


図1 全測定のCOD-TOC

特に、南田位橋（朝見川上流）は年平均値でも超過している。潜石橋（町田川）は超過していないが、高く推移している。ともに温泉地であり、流入する温泉水の影響があるものと思われる。

4地点（4河川）は毎月調査している。COD、TOC及びCT比の推移は図4のとおり。CT比は、4地点とも8月にスパイク様のピークがあるなど傾向は似ているが、涼月橋のみ12月にCT比が突出している。TOCは1mg/Lで、前後の月と同様に低いが、一方でCODは2.8mg/Lと、前後の月に比べて高い。有機物由来でない何らかの汚濁が増加したものと推察される。

参考文献

- 1) 厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会（2003），資料1-4有機物の指標について（TOCの基準値案について）。

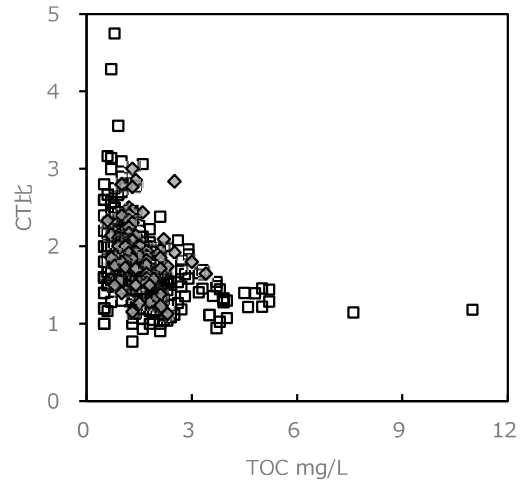


図2 全測定のCT比-TOC

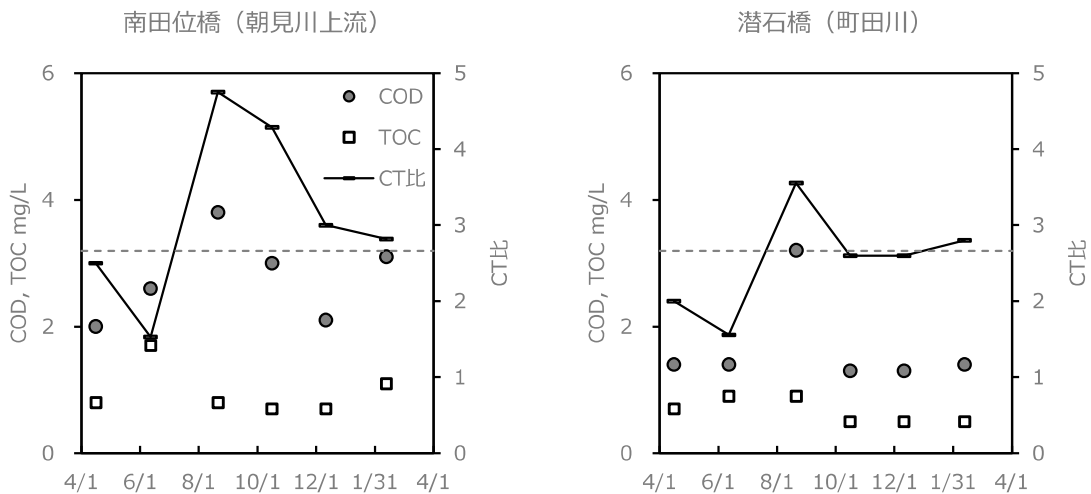


図3 CT比が高い地点

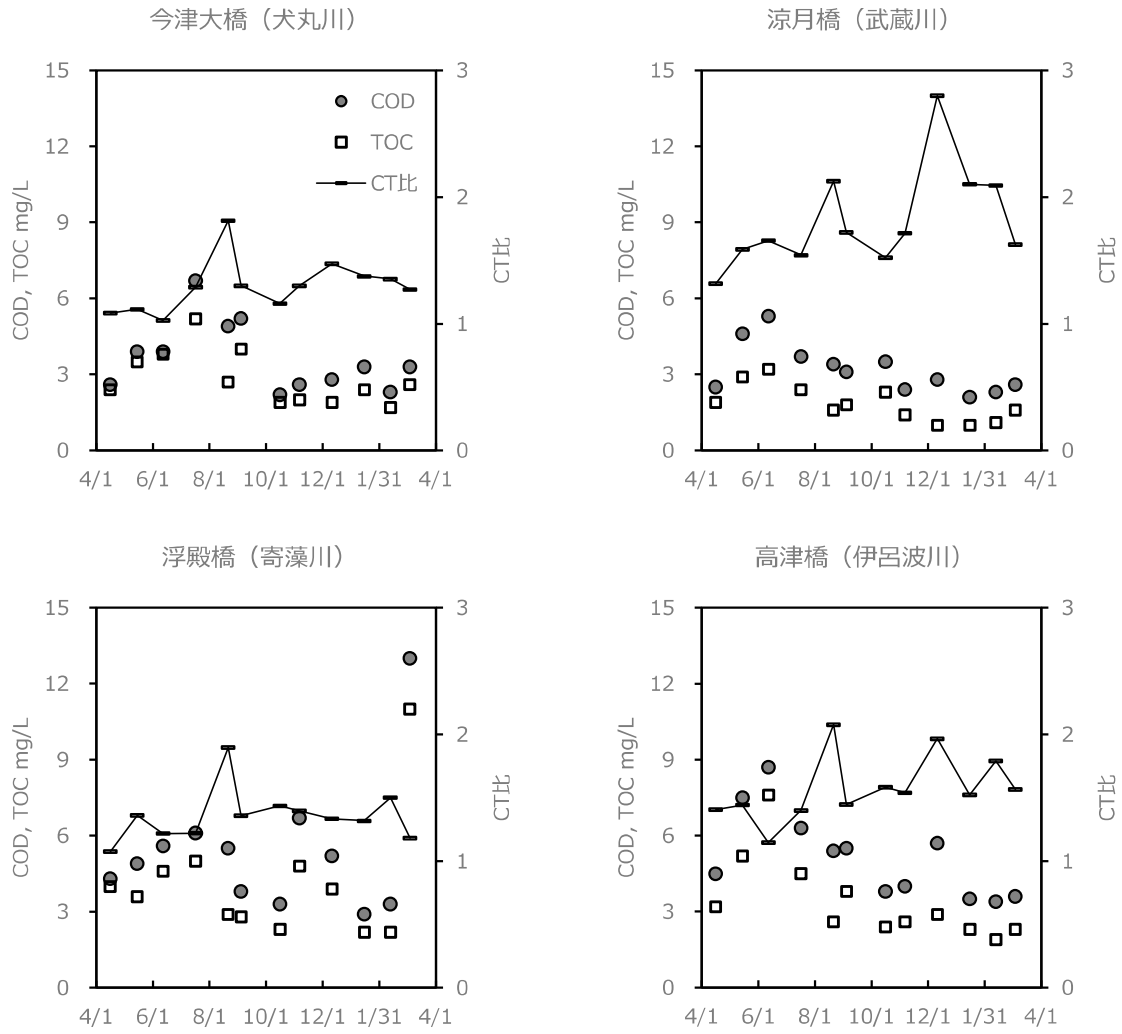


図4 COD、TOC及びCT比の推移