

資料

LC/MS/MSによる食品中のアトロピン及びスコポラミンの迅速定量法の検討

西村 修一 岩屋 あまね 下堂 菌 栄 子
大小田 修 司 愛 甲 武 仁

1 はじめに

トロパン系アルカロイドの一種であるアトロピン、スコポラミンはチョウセンアサガオ、ハシリドコロ、ヒヨス、ベラドンナなどのナス科植物に含まれ、一定量以上の摂取で瞳孔散大と分泌機能抑制で、興奮状態となり、心悸高進、狂騒状態などの中毒症状を呈する¹⁾。上記植物のうち、チョウセンアサガオは華岡青洲が1804年にこの植物から得た麻酔薬「通仙散」で世界ではじめて乳がんの手術をしたことでも知られている。一般にはダツラやエンゼルトランペットとして知られ、帰化植物として野生化しているほか、昨今の園芸ブームや花が美しいこともあり家庭で園芸種として栽培されることもある。しかし、その毒性について一般にはあまり知られていない。根茎がゴボウ、つぼみがオクラ、種がゴマと酷似していることから、誤食による食中毒事例が毎年全国で報告されており、県内でも数年毎に中毒事例が発生しており、最近では、2006年度に1件、2003年度に2件発生している。

県内においてチョウセンアサガオの誤食が疑われる食中毒事例が発生した場合、残品の形状や摂食者からの聞き取り調査、症状などから原因食材の同定を行っていた。アトロピン、スコポラミンの定量については食品衛生検査指針理化学編等^{1), 2)}に試験法（以下「公定法」という。）が掲載されているが、この方法は煩雑で抽出濃縮操作に約1日を要する。調理済み食品や植物体、血清、尿からのアトロピン及びスコポラミンの簡易迅速抽出法が報告^{3), 4), 5)}されているが、今回、固相カラムを用いてさらに簡便な抽出および精製後LC/MS/MSにより測定を行う方法を試み、良好な結果を得たので報告する。

2 調査方法

2. 1 試料

植物体はキダチチョウセンアサガオ属の葉で2007年10月28日に採取後冷凍保存していたものを用いた。

添加回収試験用試料には市販の冷凍きんぴらゴボウを自然解凍したもの及び即席みそ汁（乾燥タイプ）を調理方法に準じて調理したものを用いた。

2. 2 試薬及び試液

2. 2. 1 試薬

硫酸アトロピン、臭化水素酸スコポラミン標準品は和光純薬工業製特級試薬を使用した。LC/MS/MSの測定には関東化学製LC/MS用メタノール及び特級酢酸アンモニウムを使用した。塩酸及びアンモニア水については関東化学製の有害金属測定用を用いた。その他の試薬については和光純薬工業製の残留農薬分析用を使用した。

2. 2. 2 試液及び標準液

標準原液（1000mg/L）は硫酸アトロピン12.0mg（アトロピンとして10.0mg）、臭化水素酸スコポラミン13.3mg（スコポラミンとして10.0mg）を秤量し、個別にメタノールに溶解して10mLとしたものを用いた。各標準原液1mLを混ぜ、メタノールで10mLに定容したものを標準混合原液とした。なお、検量線用及び添加回収用の標準液は標準混合原液を測定初期の移動相で過倍希釈したものを使用した。

固相カラムにはVARIAN社製Bond Elut SCX及びGL Sciences社製InertSep PLS-2, Supelco社製SPEL/CLEAN Envi-Carb SPEを使用した。各固相カラムをあらかじめメタノール10mLでコンディショニングしたものを使用した。

表1 アトロピン及びスコポラミンの定量におけるLC/MS/MS測定条件

分析カラム	SeQuant Zic-pHILIC			
移動相流量	0.2mL/min			
注入量	5μL			
カラム温度	40℃			
移動相	移動相A: 5mM酢酸アンモニウム 移動相B: 5mM酢酸アンモニウム含有メタノール			
グラジエント条件	0min (A:B=25:75) → 10min (25:75) → 20min (60:40) → 25min (60:40)			
インターフェース	Turbo Ion source			
イオン化モード	ESI positive mode			
パラメーター	Q1	Q3	DP	CE
	(m/z)	(m/z)	(V)	(V)
アトロピン	290.2	124.1	46	39
スコポラミン	304.1	138.1	21	31

2. 3 装置および測定条件

2. 3. 1 装置

高速液体クロマトグラフにはAgilent Technologies社製1100シリーズを、質量分析装置にはApplied Biosystems社製API2000を使用した。

2. 3. 2 測定条件

LC/MS/MSの測定条件は表1に示した。

2. 4 試験方法

2. 4. 1 公定法による試験液の調製

食品衛生検査指針「理化学編 2005 (3)トロパンアルカロイド②高速液体クロマトグラフィーによる定性および定量²⁾」に準じて行った。なお、試料は植物体を用いて、細切均一化後、25gを採取した。なお、最終試料溶液にする際には移動相にて溶解した。

2. 4. 2 固相抽出法及び添加回収試験

図1に固相抽出のフローを示した。まず、試料をミキサー等で粉碎均一化した後、50mL遠沈管に1g採取し(添加回収試験では、この時点で40mg/L濃度の混合標準液0.1mLを添加し、常温に30分間放置したものを用いた)、これに抽出溶液30mLを加え、5分間振とうを行い、毎分3000回転で5分間遠心分離したものをポアサイズが100~160μmの円筒ロート形ガラスろ過器にてろ過を行った。残渣物にさらに抽出液20mLを加え、再度同じ条件で振とう及び遠心分離、ろ過を行った。ろ液を最初のろ液に合わせたものを抽出液とした。コンディショニング済みの固相カラムを流水方向の下流から直列にBond Elut SCX, Envi Carb SPE, Inert Sep PLS2の順で連結したもの(図2)に、抽出液を全量負荷し、メタノール10mLで洗浄した後、連結を解き、Bond Elut SCXのみを水10

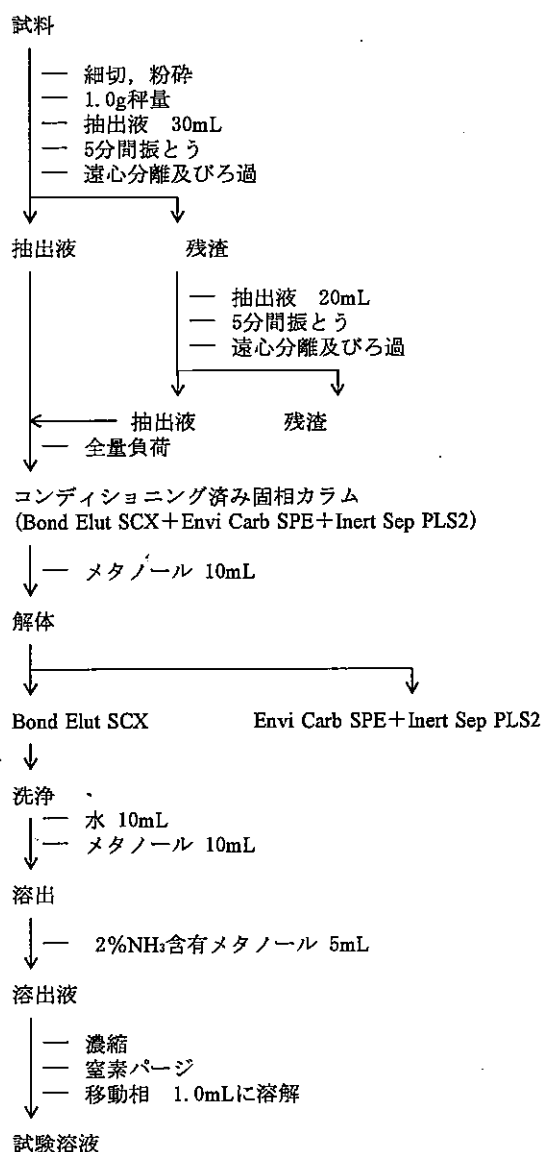


図1 固相抽出法フロー図

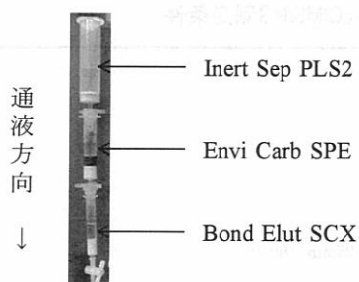


図2 Bond Elut SCX+Envi Carb SPE+Inert Sep PLS2

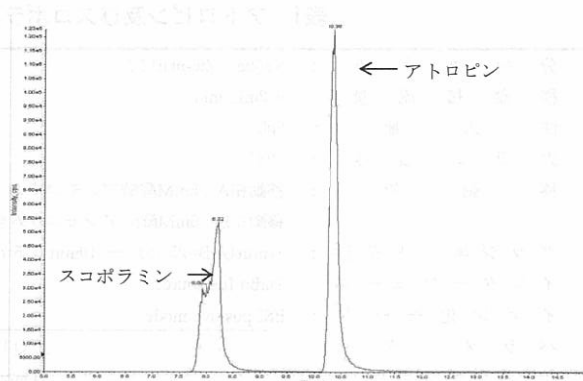
mL, メタノール10mLで洗浄し、2%アンモニア含有メタノール5mLにて溶出した。この溶出液を減圧濃縮した後、移動相1.0mLにて溶解したものを試験液とした。なお、LC/MS/MSに注入する際は、試験液を適宜移動相にて希釈後、注入を行った。

3 結果及び考察

3.1 HPLC及びLC/MS/MS測定条件の検討

公定法では分離カラムにオクタデシルシラン化学結合シリカゲルを用いているが、実際測定してみると、スコポラミンのピークの立ち上がりが鈍く、またアトロピンでもピークトップが割れたりして形状が悪かった(図3)。オクタデシルシラン化学結合シリカゲル充填の分離カラムを使用する際には小西ら³⁾が報告しているようにイオンペア試薬等を検討する必要があると思われる。ただし、イオンペア試薬使用后、別条件の測定を行う際にHPLC部分等の洗浄に時間を必要とするため、一台のLC/MS/MSを各種試験検査で共用している現状においては望ましい測定条件とは言えない。そこで、近年、極性および親水性化合物の分離に用いられることの多いHilic系のカラムでの測定を試みた。Hilic系のカラムSeQuant Zic-pHILICを用いたところ、図4のとおり良好なクロマトが得られた。

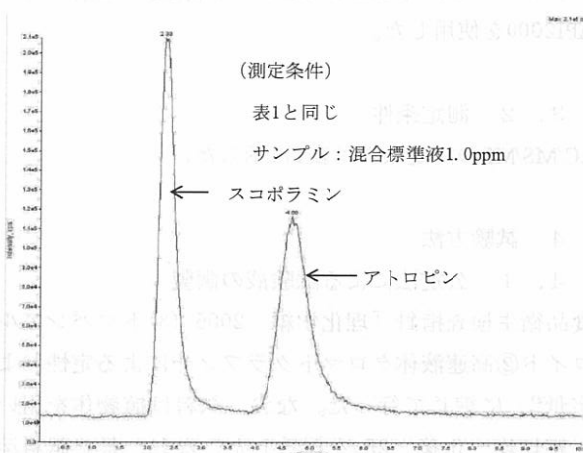
次に移動相について検討を試みた。移動相についてはメタノール・水系とアセトニトリル・水系で比較を行った。アトロピンではメタノール・水系に比べ、アセトニトリル・水系の方が感度の良いピークが得られた。ところがスコポラミンではその逆であった。また、メタノール・水系で植物体から抽出した試験液を測定したところ、アトロピンの標準ピークと同一保持時間のピークに隣接するところに別のピーク(以下「疑似アトロピンピーク」という。)が検出された(図5)。コリジョンエナジー(以下「CE」という。)を30V、39V及び50Vと変化させ、プロダクトイオンスキャンを行った。アトロピンの標準品から得られたピーク及びアトロピンと同一保持



(測定条件)

カラム: Inertsil ODS-SP (3 μ m, 2 \times 100mm)
 移動相: A: アセトニトリル B: 0.05%ギ酸
 0 min (A: 5%) \rightarrow 40min (A:95)
 他の条件は表1と同じ
 サンプル: 混合標準液1.0ppm

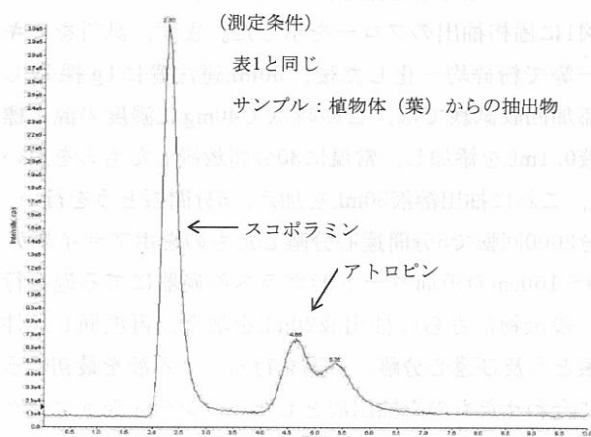
図3 オクタデシルシラン化学結合シリカゲルを用いた混合標準液のクロマトグラフ



(測定条件)

表1と同じ
 サンプル: 混合標準液1.0ppm

図4 SeQuant Zic-pHILICを用いた混合標準液のクロマトグラフ



(測定条件)

表1と同じ
 サンプル: 植物体(葉)からの抽出物

図5 SeQuant Zic-pHILICを用いた植物体抽出物のクロマトグラフ

時間のピーク内のプロダクトイオンの構成はほぼ同じであった(図6, 7)。ところが、疑似アトロピンピーク内のプロダクトイオンには構成比の異なる m/z 142のフラグメントが存在し(図8)、アトロピンとは別物質の可能性を示唆した。また、L-ヒヨスチアミン(東京化学工業(株)社製)の標準品も同様に測定してみたが、アトロピン標準と比べ保持時間及びプロダクトイオンの構成比もほぼ同じであった。そこで、この2つのピークを分離するために、移動相のメタノール濃度を90%、75%、60%にして、測定を行った。メタノール濃度を高くするに従って、ピーク間の分離時間は広がったが、完全な分離は困難であった。一方、アセトニトリル・水系で植物体抽出物試験液を測定すると疑似アトロピンピークは確認できず、一峰性のピークとなった。しかし、アトロピン濃度がメタノールで測定した値に比べ2倍近くになっており、また、そのピークをプロダクトイオンスキャンしたところ標準のピーク内に構成比の異なる m/z 142のフラグメントが存在し、アトロピンのピーク中に疑似アトロピンピークが埋没している可能性があった。そこで、今回移動相にはメタノール・水系を用いることとした。また、アイソクラティックな条件で試料抽出試験液の測定を行うと、注入の度に保持時間がずれたり、ピーク形状が悪くなるなど測定に影響があった。そこで、各測定後(注入から10分後)グラジエントをかけ、カラム洗浄を行ったところ、ピークへの影響は見られなくなった。

質量分析装置の条件として、イオン化はエレクトロスプレーイオン化(ESI)によるポジティブモードを用い、測定モードは高感度測定に適したMRM(Multiple Reaction Monitoring)モードを用いた。各物質の条件はInfusionによりプリカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)および質量分析装置本体のパラメータの最適化を行い、感度の良い条件を決定し、イオン源についてはFIA(Flow Injection Analysis)により最適化を行い、各パラメーターを決定した。決定した各パラメーターについては表1に示す。

上述のLC/MS/MS条件でのアトロピン及びスコポラミンの検量線は0.01~2mg/Lの範囲でいずれの成分も相関係数0.9999であった。また、0.01mg/Lにおける変動係数(以下「CV」という。)($n=5$)はアトロピンで2.8%、スコポラミンで3.0%であった。

3. 2 固相抽出法の検討

3. 2. 1 固相カラムの検討

クリーンアップに使用する固相カラムの選定に当たって、まず対象の2物質は共にアルカロイドであり、極性

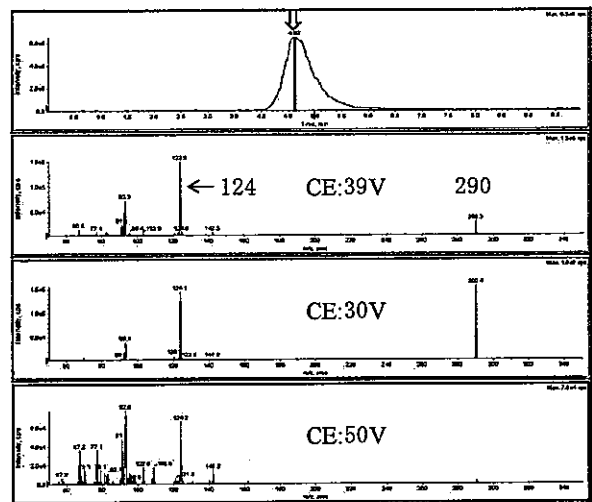


図6 アトロピン標準品のプロダクトイオン

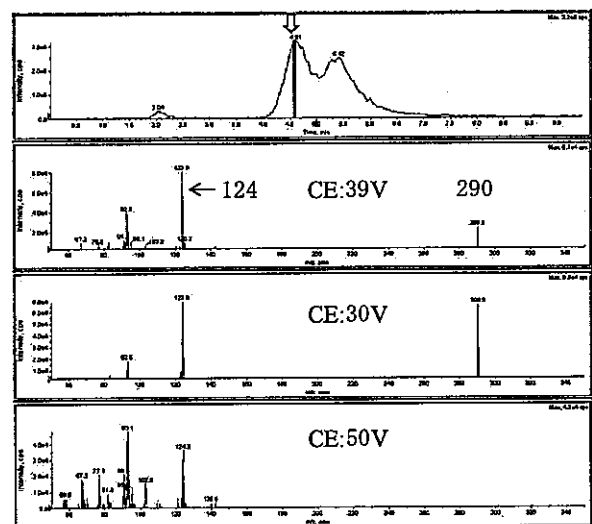


図7 アトロピン標準品と同一保持時間のピーク内のプロダクトイオン

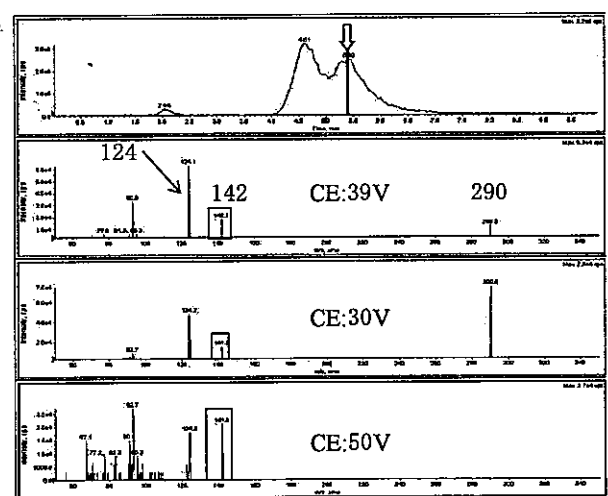


図8 疑似アトロピンピーク内のプロダクトイオン

表2 抽出溶媒の検討

	植物体 (葉) 含有量 (mg/kg)		みそ汁回収率 (%)		キンピラ回収率 (%)	
	アトロピン	スコポラミン	アトロピン	スコポラミン	アトロピン	スコポラミン
0.01N HCl	46.9	177.2	96.1	79.5	82.1	92.6
35%メタノール含有0.01N HCl	49.3	176.0	98.9	92.5	92.9	100.3
50%メタノール含有0.01N HCl	48.1	176.6	99.1	93.4	100.3	100.6
75%メタノール含有0.01N HCl	46.3	157.3	87.9	88.9	58.5	75.6
95%メタノール含有0.01N HCl	47.7	153.2	96.3	86.8	92.4	87.0

が高くC18カラム等ではほとんど保持されないことが予想されたので、陽イオン交換モード固相であるBond Elut SCX固相による抽出を検討した。まず、負荷する溶液について検討した。メタノール濃度20%、75%及び95%の溶液を0.5N HClにてそれぞれpHを2、3及び4にした溶液50mLに混合標準液(10mg/L) 1.0mLを添加したものをコンディショニング済みのBond Elut SCXに全量負荷し、洗浄工程(精製水10mL, メタノール10mL)を経て、2%アンモニア含有メタノール5mLにて溶出し、溶出液を減圧濃縮し、窒素ページにて乾固したものを移動相5mLで溶解したものを測定し、回収率を求めた。回収率は、それぞれの溶液ともアトロピンで84.0~79.5%、スコポラミンで97.5~93.0%であり、イオン交換カラムに負荷する溶液のpHが2~4の間であれば、メタノール濃度による固相カラムの保持能への影響はなかった。

イオン交換カラムでの精製についての報告^{4),5)}はあるが、食品中の多種多様な夾雑物質を取り除くために操作方法が煩雑化しやすくなる傾向がある。そこで、さらにより簡便な前処理法として固相カラムのみで夾雑物質の除去等ができないか検討した。精製に使用するイオン交換カラムへの保持や、測定時に影響をきたすような夾雑物質の除去を目的に固相カートリッジとして、オクタデシルシラン化学結合シリカゲルカラム、スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム、グラファイトカーボンカラムについて検討した。固相カラムカートリッジにはSep-Pak Vac C18, Sep-Pak Plus PS-2, Oasis HLB; Plus (以上 Waters), Supelclean Envi-Carb SPE, Supelclean Envi-Carb/LC-NH₂ (以上 Supelco), Meg Bound Elut C18 (Varian) 及びInertSep PLS-2 (GL Sciens) を用いた。pHを3.0に調製したメタノール濃度75%とほぼ100%の溶液で0.1mg/Lになるように希釈した標準液5mLを固相カラムカートリッジに通液させ、通液中のアトロピン及びスコポラミンの含有量を測定した。結果は、Meg Bound Elut C18以外は通過率80~103%であり、また、メタノール濃度をあげるにより各固相カラムカートリッジへの対象2物質の保持能が低下することもわかった。そこで、今回は実試料を負荷することによる目詰まり等

を考慮しカラム口径の大きいInertSep PLS-2と、色素の除去を考えSupelclean Envi-Carb SPEを使用することにした。

3. 2. 2 抽出溶媒の検討

まず、効率よく対2象物質を抽出できる溶媒について検討した。抽出溶媒としてメタノールを0%、35%、75%および95%含有する0.01N HClを用いて、図1, 2による固相抽出法により植物体(葉)及び添加回収試験用試料からアトロピンおよびスコポラミンの抽出を試みた。結果は、メタノール濃度35%および50%含有の抽出液で対象2物質の添加回収率が100%近くであった(表2)。今回は試料に高タンパクの食品を想定して、抽出液にはメタノール含有量の多い50%メタノール含有0.01N HClを用いることにした。また、マトリクスを多く含む実サンプルにおいても、ここではとりわけ塩類によるイオン交換カラムの対象2物質の保持能への影響はないように思われた。

3. 2. 3 添加回収試験及び繰り返し試験

みそ汁およびキンピラボゴウを細切、粉碎したものを試料として、試料1.0gに混合標準液(4.0mg/L) 0.1mLを添加し、30分間常温放置していたものを添加回収試験用試料とした。抽出液には50%メタノール含有0.01N HClを用い、固相抽出法を用いて添加回収試験を行った。

結果は、みそ汁の場合アトロピン、スコポラミンの回収率が100.1%、98.1%、CVが1.7%、2.2%であり、キンピラボゴウの場合は回収率がそれぞれ96.6%、92.5%、CVが1.5%、2.2%とともに非常に良好であった(表3)。

また、植物体(葉)も同様に抽出溶媒に50%メタノール含有0.01N HClを用いて、固相抽出法での繰り返し検査を行った。結果は、アトロピン及びスコポラミンのCVは4.3%と3.5%であり、再現よく抽出されていた。

表3 添加回収試験

試料名	添加量 (μ g)	回収率 ^{*)} (%)	
		アトロピン	スコポラミン
みそ汁	4.0	100.1 \pm 1.7	98.1 \pm 2.1
キンピラ	4.0	96.6 \pm 1.5	92.5 \pm 2.0

*) 回収率 \pm 標準偏差

3. 2. 4 公定法と固相抽出法の比較

公定法に基づき得られた試験液を測定した結果、植物体（葉）の含有量はアトロピン33.4mg/kg、スコポラミン123.6mg/kgであった。固相抽出法から得られた含有量を公定法から得られた含有量で比した結果、100%を超えた抽出率が得られた。これはひとつに公定法による抽出に不慣れだったことがあげられる。公定法では抽出の際に水層とエチルエーテル層の間に植物体（葉）がありエチルエーテル層の分取が難しく、この工程での損失が大きかったのではと推察される。ところが、固相抽出法では熟練した技術がなくても、簡易で迅速に検査することが可能であり、検査時間の短縮化も図ることができた。

4. まとめ

- 1) 分離カラムにHilic系のZic-pHILICを用いることにより、アトロピンおよびスコポラミンは良好に分離された。
- 2) 移動相にメタノールを用いて植物体抽出試験液を測定すると、アトロピンピークの近傍にアトロピンと非常に似通ったQ1, Q3を持つ別のピークが検出された。
- 3) 抽出液に50%メタノール含有0.01N HCl溶液を用い、連結させた固相カラム（強陽イオン交換カラムとジビニルベンゼン共重合体カラムとグラファイトカーボンカラムカートリッジ）を用いることで植物体及び食品（みそ汁及びキンピラ）からの精製が可能であり、対象物質を効率よく回収できた。
- 4) 本固相抽出法は熟練した技術を必要とすることなく、簡便で抽出時間の短縮化も図ることができた。

参考文献

- 1) 日本薬学会編，衛生試験法・注解2005，247～249，金原出版株式会社（2005）
- 2) 食品衛生検査指針理化学編等2005，739～745 社団法人日本食品衛生協会（2005）
- 3) 小西友彦，赤木浩一，畑野和広；LC/MS/MSによるヒト血清・尿中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンの分析，食衛誌，49，266～271
- 4) 山辺真一，肥塚加奈江，他；LS/MS/MSによる食品中のアトロピン，スコポラミンの迅速定量，岡山県環境保健センター年報，31，127～132（2007）
- 5) 多田裕之，白木康一，他；固相抽出によるハシリドコロ及びヒト血清中のアトロピン，スコポラミンの分析法，岐阜県保健環境研究所報，9，29～34（2001）