

毒キノコ中の有毒成分の分析方法の検討

食品薬品部

木村 貴美恵 亀田 陽亮¹ 石原島 栄二

鈴木 尚子² 市本 範子³

(¹現県北健康福祉センター) (²現薬務課) (³現県南健康福祉センター)

1 はじめに

栃木県では、例年毒キノコを原因とした食中毒が発生している。通例では、調理残品のキノコの形態学的な観察により原因物質の特定が行われるが、調理済みのもものでは形態からの半別が困難な場合や、調理残品中にキノコが残っていない場合がある。そのため、キノコ以外の部分等を用いた有毒成分の分析により、原因物質の特定に有用な情報を得ることが求められている。

また、複数の有毒成分を同一条件下で一斉分析することができれば、原因物質の特定が迅速化できる。そのため、当センターにおいて既に分析法を確立¹⁾⁻³⁾しているツキヨタケ、シロタマゴテングタケ及びドクツルタケに加え、県内で食中毒の発生が多いクサウラベニタケ⁴⁾の有毒成分を合わせた計6成分を対象としたLC-MS/MSによる一斉分析法を策定するための各条件について、標準溶液を用いて検討した。その結果、いくつか知見が得られたので報告する。

なお、今回の検討にあたり、移動相にアイソクラティック条件を用いたこれまでのLC条件²⁾を見直し、グラジエント条件での検討をすることとした。

2 実験方法

2.1 分析対象成分

「県内で発生事例の多い」または「致死性の中毒症状を呈する」有毒キノコに含有されている成分のうち6成分。具体的な成分名及びその成分を含有するキノコについて、表1に示した。

2.2 標準物質・試薬

α -アマニチン、 β -アマニチン、塩化コリン(以下、コリンとする)及び(±)-ムスカリン塩酸塩水和物はSigma Aldrich製、ファロイジンは和光純薬工業(株)製、イルジンSは林純薬工業(株)製を使用した。

試薬は、市販の特級、アミノ酸自動分析用又は高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

2.1で示した6種の標準物質を50%メタノールで溶解した後、それぞれの一定量を混合して同じ溶媒で段階的に希釈し、0.01、0.1、0.25、0.5、1及び2 ppmの6種の混合標準液を調製した。

2.3 装置及び測定条件

過年度(令和3(2021)年度)に発生したキノコを原因とした食中毒調査において、LCをアイソクラティックな条件下で分析し、コリン及びムスカリンを検出した事例があった³⁾。ただし、 α -及び β -アマニチンについては保持時間が極めて接近しており、さらに、それらのモノアイソトピック質量⁵⁾は、それぞれ918.3542及び919.3382と質量差が1未満とほとんど差がなく、アイソクラティック条件ではピークの分別が困難であった。そこで、 α -及び β -アマニチンの分離度の向上を図るため、移動相はアイソクラティック条件ではなく、グラジエント条件を検討した。

測定に用いた装置及び測定条件等を表2に、グラジエント条件を表3及び図1に、解析に用いたモニターイオンを表4に示した。

表1 分析対象成分とそれらを含む有毒キノコの例

成分名	左欄の成分を含む 有毒キノコの例
α-アマニチン	シロタマゴテングタケ ドクツルタケ
β-アマニチン	
ファロイジン	
イルジンS	ツキヨタケ
コリン	クサウラベニタケ
ムスカリン	

表2 装置及び測定条件

装置	
SCIEX 3200 Q TRAP® LCMSMS システム (エービーサイエックス社製)	
測定条件	
カラム	: Mightysil RP-18PA (2.0×150 mm, 3 μm)
移動相	: (A) 0.1% ギ酸水溶液 (B) 0.1% ギ酸含有アセトニトリル
グラジエント条件	: (表3及び図1参照)
カラム温度	: 40°C
流速	: 0.2 mL/min
注入量	: 10 μL
イオン化法	: ESI 法、ポジティブモード
モニターイオン	: (表4参照)

表3 各移動相のグラジエント条件

時間 (min)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	90	10
1.0	85	15
6.5	85	15
6.6	10	90
14.0	10	90
14.1	90	10
15.0	90	10

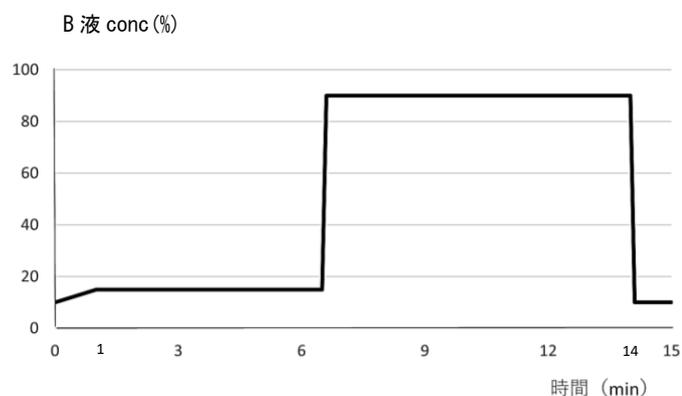


図1 グラジエント条件

表4 モニターイオンとMRM条件

成分	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)
α-アマニチン	920.1	259.2	47	101	9	4
	920.1	85.9	73	101	9	6
β-アマニチン	920.3	258.8	49	91	6.5	12
	920.3	259.3	49	91	6.5	14
ファロイジン	789.2	330.1	45	81	9.5	14
	789.2	157.3	67	81	9.5	6
イルジンS	265.2	201.1	16	16	2.5	4
	265.2	128.3	16	16	2.5	4
コリン	105.2	61.1	21	36	5	4
	105.2	60.1	23	36	5	4
ムスカリン	175.1	57.1	29	31	6.5	4
	175.1	129.2	11	31	6.5	4

Q1: プリカーサーイオン (m/z)、Q3: プロダクトイオン (m/z)
 CE: Collision Energy (V)、DP: Declustering Potential (V)
 EP: Entrance Potential (V)、CXP: Collision cell Exit Potential (V)

3 結果

2.3に記載した条件で得られた6成分のクロマトグラムを図2に示した。 α -及び β -アマニチンの分離度が向上し、ピーク形状も良好であった。

これまで、アイソクラティック条件ではピークの分別が困難であった α -及び β -アマニチンについては、保持時間(RT)がそれぞれ3.85分から5.91分(α -アマニチン1、2とも)、4.22分から6.19分(β -アマニチン1)及び6.21分(β -アマニチン2)となり、分離度は1.23から1.89となった。

また、作成した検量線を図3に、検量線の相関係数を表5に示す。なお、図3及び表5について、MRM条件の相違を区別するため、成分名に「1」及び「2」と数字を付して示した。 α -アマニチン、 β -アマニチン及びイルジンSは0.1~2 ppm、ファロイジン、コリン及びムスカリンは0.01~2 ppmの範囲で相関係数(R)が0.988以上であり、さらに適切なモニターを選択した場合には、 α -及び β -アマニチン、ファロイジン並びにイルジンSにおいて、0.999以上の極めて良好な直線性が得られた。

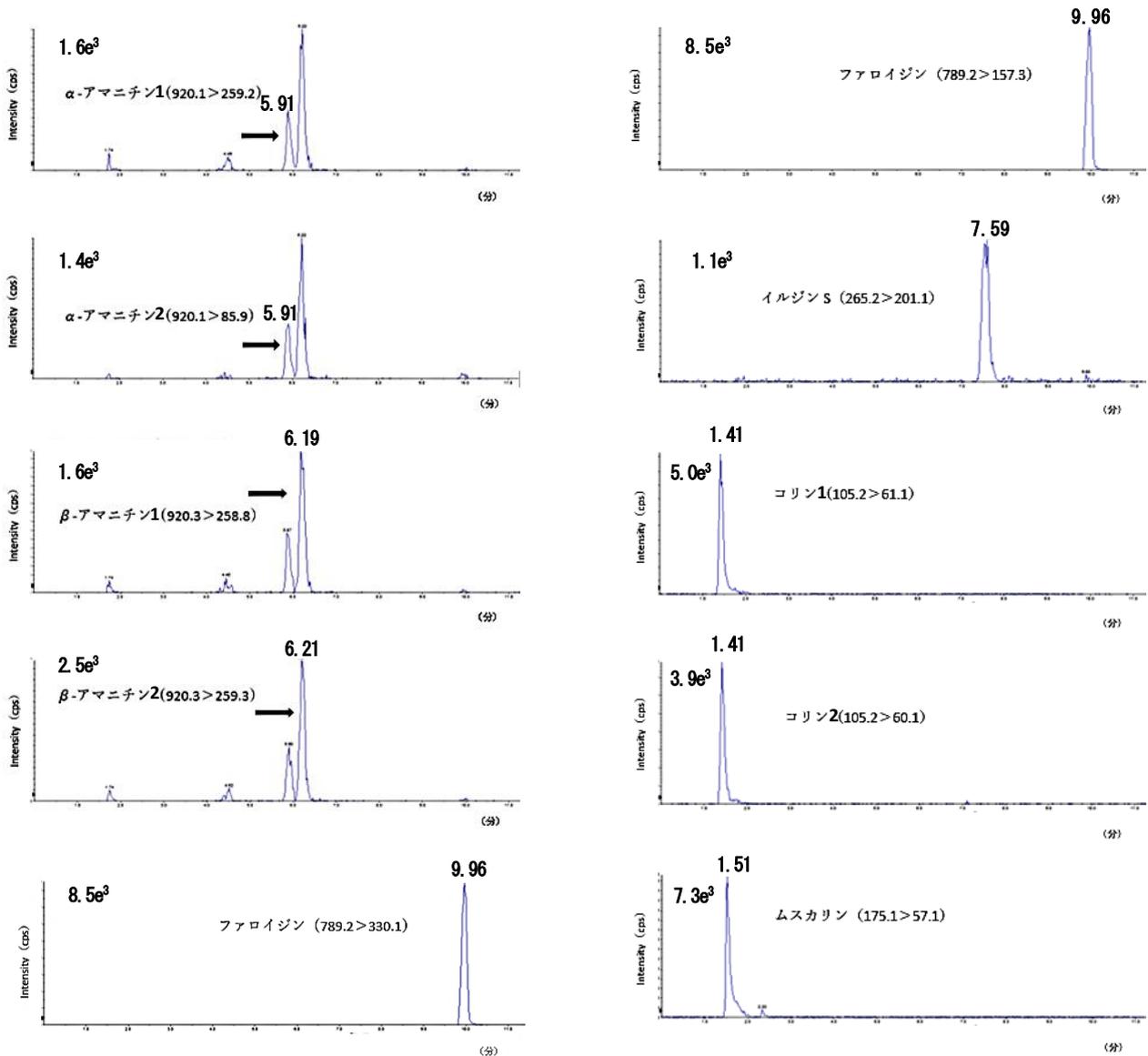


図2 混合標準液のクロマトグラム (混合標準溶液 2 ppm)

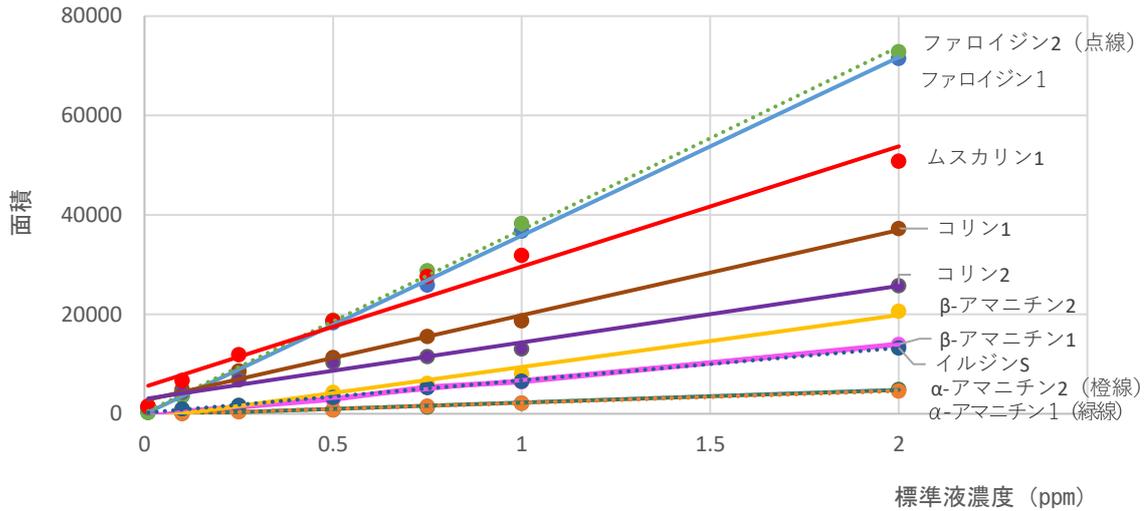


図3 検量線

表5 検量線の相関係数

成分	Q1	Q3	相関係数	成分	Q1	Q3	相関係数
	(m/z)	(m/z)			(m/z)	(m/z)	
α - アマニチン1	920.1	259.2	0.997	ファロイジン2	789.2	157.3	0.999
α - アマニチン2	920.1	85.9	0.999	イルジジンS	265.2	201.1	1.000
β - アマニチン1	920.3	258.8	0.999	コリン1	105.2	61.1	0.996
β - アマニチン2	920.3	259.3	0.994	コリン2	105.2	60.1	0.988
ファロイジン1	789.2	330.1	1.000	ムスカリン	175.1	57.1	0.991

4 考察

食中毒の原因となるキノコに含有される成分のうちの6成分、α-アマニチン、β-アマニチン、コリン、ムスカリン、ファロイジン及びイルジジンSについて、LC-MS/MSによる分析方法の検討を行った。

これまでの、アイソクラティック条件下でのα-及びβ-アマニチンの分離度に係る問題について、グラジエント条件で分析することにより改善が見られた。しかしながら、調理品等、マトリクスを含んだ試料において、保持時間が変化した場合、ピークの同定に支障をきたす可能性も視野に入れる必要がある。

また、今回の検討では、イオン性のコリン及びムスカリンは、保持時間がそれぞれ1.41分及び1.51分と非常に短かったため、分析に用いたC18型カラムに対して保持されにくく、より保持時間を長くする分析条件の再考が必要と考えられた。

コリン及びムスカリンについて、カチオン保持に優れたペンタフルオロフェニル基を有する分析カラムを使用し、誘導体化した他の高極性成分を含め、低極性成分と一斉分析することができたという研究があるが⁵⁾、極性等の異なる多成分を誘導体化等の工程のない迅速簡易な前処理方法で一斉分析することは難易度が高いものと思われる。

本県ではクサウラベニタケによる食中毒が最も多く発生していることから、コリン及びムスカリンを含めた有毒成分の一斉分析については、重要な課題として引き続き検討する必要があると考えられるが、C18型カラムで6成分の一斉分析を目指すことは課題が多く、分析カラムの再選定が必要であろうと思われる。

また、食中毒原因物質検査においては、当然のことながら迅速かつ簡易な前処理方法が必要とされているため、試料の精製方法においては、固相抽出用カラムの適用等を中心に、前処理の工程を簡便化していきたい。

以上のことを踏まえ、繰り返し測定等を実施し、定量性を確認した上で今後、添加回収試験、さらには模擬調理品を用いた検討を進めていきたいと考える。

5 参考文献

- 1) 松下和裕他、キノコ食中毒における有毒成分の分析法の検討、栃木県保健環境センター年報、21、42-45、2016.
- 2) 若林勇輝他、毒キノコに含まれる有毒成分の一斉分析法の検討、令和元(2019)年度生活衛生関係業績発表会抄録、29-32.
- 3) 亀田陽亮他、栃木県内で発生したキノコ食中毒の原因物質の特定について、令和2(2020)年度生活衛生関係業績発表会抄録、65-68.
- 4) 栃木県ホームページ、栃木県内の食中毒発生状況.
- 5) 南谷臣昭他、汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立、令和3年度厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業 自然毒等のリスク評価のための研究 研究分担報告書、42、2021.