

資 料

LC-MS/MSによるキノコ及び魚介類の中毒成分迅速分析法(第2報)

—キノコ中のイボテン酸及び魚介類中のテトロドトキシン分析法—

多田裕之, 筑本貴郎, 神山恵理奈, 永井宏幸, 伊藤哲朗

要 旨

キノコ中毒成分であるイボテン酸の分析について, 既報のキノコ中毒成分及び魚介類中毒成分分析法に
適応させ, ムシモール, ムスカリンと共に一斉分析する方法を確立した. また, 魚類の中毒成分であるテ
トロドトキシンについても, 既報の魚介類抽出液を用いて系統的に分析する方法を検討し, 良好な結果を
得た. キノコ中毒成分の精製用ミニカラムは, 既報から変更し, 残存シラノールの影響の少ないカラムを
使用した. 同ミニカラムは, 魚介類抽出液を用いたテトロドトキシン分析用検体の精製にも適用した. イ
ボテン酸, テトロドトキシン, 及び既報から定量イオンを変更したムシモールの検出限界は, 0.30~0.47
µg/gであった. イボテン酸, ムシモール, ムスカリンの2試料各3回による平均添加回収率は85.0~101.0 %
であり, テトロドトキシンの3試料各3回の平均添加回収率は93.8~111.3 %であった.

キーワード: イボテン酸, テトロドトキシン, LC-MS/MS

1 はじめに

毒キノコであるテングタケ, ベニテングタケは, 食
後30分程で嘔吐, 下痢, 腹痛など胃腸消化器系, ま
ためまい等の神経系の症状も現れ, まれには死に至る
こともある危険なキノコである¹⁾. 毒成分は, イボテ
ン酸, ムシモール, ムスカリン等であり, イボテン酸,
ムシモールについては, 込山ら²⁾ 佐藤ら³⁾, が親水性
相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)による分析
法を報告している. 著者らは既報⁴⁾ において,
LC-MS/MS法を用いた他のキノコ中毒成分(イルー
ジンS, アマニチン, ファロイジン)のC18カラム精製
による分析法と共に, HILICモードによるムシモール,
ムスカリンの分析法を報告したが, イボテン酸につ
いては検討しなかった. イボテン酸は, テングタケ,
ベニテングタケの主要な毒成分であるため, 今回はイ
ボテン酸について既報の分析法に適用可能か検討し,
ムシモール, ムスカリンと共に一斉分析できるか検討し
た.

また, フグ毒による中毒は毎年30件程度発生し,
死亡率が高く, 日本で起こる食中毒死亡者の過半数を
占めている⁵⁾. フグ毒の主成分であるテトロドトキ
シンについては, 秦野ら⁶⁾, 赤木ら⁷⁾の報告のように,
多くの事例でHILICモードによるLC-MS/MSで分析
が行われている. 著者らは, 同手法による魚介類中の
不揮発性アミン類の分析法を既報にて報告したが, 今

回この分析法における抽出液を用いて, 系統的にテ
トロドトキシンを分析する方法を検討したので報告する.

2 実験方法

2.1 試料

添加回収用試料として, 市販のブナシメジ, エリン
ギ, シロサバフグ, シオサバ, マイワシを用いた.

2.2 試薬, 標準溶液

標準品: シグマアルドリッチ社製 イボテン酸, (±)
ムスカリンクロリド水和物, 和光純薬工業株式会社製
生化学用ムシモール, アレキシスバイオケミカルズ社
製 テトロドトキシン(クエン酸フリー)を用いた.

標準溶液: 標準品を70%メタノールに溶解し, イ
ボテン酸は200 mg/L, ムシモール及びムスカリンは
500 mg/Lの標準原液を調製した. また, テトロドトキ
シンは0.1%酢酸に溶解して100 mg/Lの標準原液を
調製した. 各標準原液をイボテン酸, ムシモール, ム
スカリンについては0.05%(v/v)トリフルオロ酢酸含
有 水/アセトニトリル(1:4), テトロドトキシンにつ
いては0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸含有 水/アセトニ
トリル(1:1)で希釈して標準溶液を調製した.

その他の試薬等: 和光純薬工業株式会社製 特級ア
セトニトリル(抽出, 精製に使用), LC/MS用アセト
ニトリル(LC-MS/MS移動相に使用), 特級メタノ
ール, 特級トリフルオロ酢酸(TFA), LC/MS用ギ酸, シ

グマアルドリッチ社製 HPLC 用ギ酸アンモニウムを用いた。

メンブランフィルター：ミリポア社製 MILEX-LG SLLGH13NL 孔径 0.2 μm (キノコ試料用として)、及び MILEX-LH SLLHH13NL 孔径 0.45 μm (魚介類試料用として) を用いた。

C18 ミニカラム：G Lサイエンス社製 InertSep C18 500 mg/6 mL を用いた。

ホモジナイザー：マイクロテックニチオン社製 ヒスコトロン NS50 (ジェネレーターNS-10 外径 10.5 mm) を用いた。

2.3 LC-MS/MS 測定条件

2.3.1 LC 条件

イボテン酸、ムシモール、ムスカリンについては既報のムスカリン、ムシモールの分析と同条件で実施した。テトロドトキシンについては、イボテン酸等と同じカラム、移動相を使用し、移動相 A 液、B 液のグラジエント条件を B 液% = 70 → (15 分) → 30 (1 分保持) → (1 分) → 70 (9 分保持) とした。また、注入量は 10 μL とし、他の条件はイボテン酸等と同じで実施した。

2.3.2 MS/MS 条件

装置は AB SCIEX 社製 4000 QTRAP を使用し、イオン化モード、Ion Spray Voltage は既報と同じ条件で実施した。Turbo Spray Temp. 及び MRM パラメータを表 1 に示した。既報ではムシモールの定量イオンは m/z 98 であったが、 m/z 68 に変更した。

表 1 MRM パラメータ

Analyte	Turbo spray temp.(°C)	Q1 (m/z)	mode	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
ibotenic acid		159	quant.	113	26	17	18
			qualit.	159		5	26
muscimol	600	115	quant.	68	51	29	10
			qualit.	98		17	16
muscarine		174	quant.	57	46	33	8
			qualit.	115		23	20
tetradotoxin		320	quant.	302	126	33	16
			qualit.	162		51	28

2.4 試料溶液からの抽出、調製

2.4.1 キノコ (イボテン酸、ムシモール、ムスカリン)

キノコ試料からのイボテン酸、ムシモール、ムスカリンの抽出、及び精製法を図 1 に示す。精製ミニカラムは、既報で用いた BOND ELUT LRC-C18 500 mg から InertSep C18 500 mg/6 mL に変更し、コンディショニングはアセトニトリル 5 mL 及び水/アセトニトリル(1:9) 2 mL で実施した。イルージン S、アマニチン、ファロイジンについては、遠心分離した抽出液 2.0 mL

を既報通りに調製することとした。

2.4.2 魚介類 (テトロドトキシン)

魚介類からのテトロドトキシンの抽出、精製法について図 2 に示した。遠心分離を行った抽出液 2.0 mL を、アセトニトリル 5 mL 及び水/アセトニトリル 2 mL でコンディショニングした InertSep C18 500 mg に通し、水 1.0 mL で溶出した。通過液及び溶出液に水を加え 5.0 mL に定容し、0.45 μm 孔径のメンブランフィルタ



図 1 試料溶液の調製方法 (キノコ)

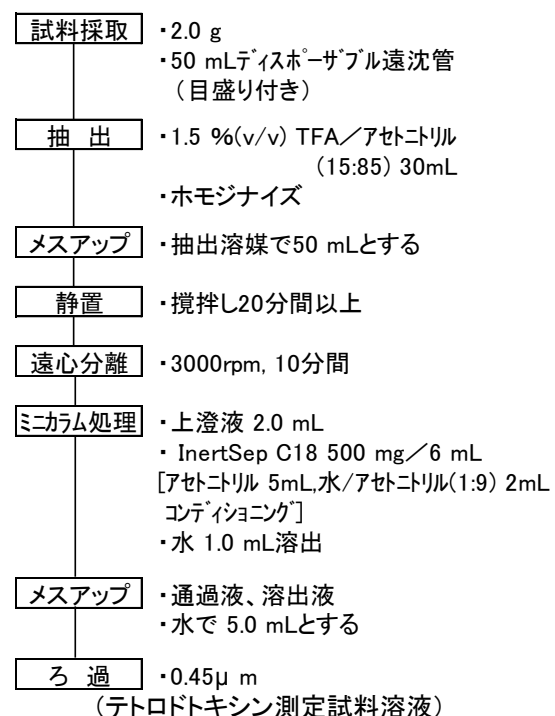


図 2 試料溶液の調製方法 (魚介類)

一でろ過し、テトロドトキシン測定用試料溶液とした。ヒスタミン、カダベリン、チラミン、テトラミンについては、遠心分離した抽出液を既報通りに調製することとした。

3 結果および考察

3.1 LC-MS/MS 条件

テトロドトキシン分析のカラム、移動相は、イボテン酸等の分析と同じであるため、続けて分析することが出来、効率的である。

MS/MS 分析では、イボテン酸は脱炭酸イオンである m/z 113, テトロドトキシンは脱水イオンである m/z 302 を定量イオンとした。ムシモールの定量イオンは、既報では m/z 98 であったが、このイオンではクロマトグラムのベースライン変動が大きいので、 m/z 68 に変更した。ムスカリンは既報通り m/z 57 を定量イオンとした。また、参考にヒスチジンを次の条件で測定した。

Turbo Spray Temp. : 600°C, Q1 : m/z 156, Q3 : m/z 110, DP : 41V, CE : 21V, CXP : 18V

3.2 抽出、精製

既報におけるキノコのムスカリン、ムシモール分析で使用する精製ミニカラムは、ロットによってはイボテン酸、ムシモールが溶出しない場合があった。残存シラノールの影響が懸念されたため、この残存量が品質管理されているとされる InertSep C18 を使用した。イルージン S 等では、既報の精製ミニカラムで支障はなかった。

魚介類の抽出、メスアップ後の静置時間は、20 分以上としたほうが遠心分離後の上澄液の濁りが少なかった。また、テトロドトキシン試料溶液のろ過時に、0.2 μm 孔径のフィルターでは詰る場合があったため、0.45 μm 孔径のフィルターを使用した。

既報及び今回における試料採取量はキノコ 5.0 g, 魚介類 2.0 g であるが、事例によっては試料量が不足する場合が考えられる。この場合は試料量を 1/5 に減らし、メスアップ量を 10 mL としても良い。

3.3 クロマトグラム

イボテン酸及びテトロドトキシン、更に既報の MRM 測定イオンを変更したムシモールについて、市販のキノコ及び魚に添加後、調製した試料溶液のクロマトグラムを図 4～図 6 に示した。

ブナシメジ 5.0 g にイボテン酸 25 μg を添加した試料及び無添加試料のクロマトグラム (図 4) では、イボテン酸溶出時間の約 0.5 分前に比較的強度の強い夾雑ピークが出現しているが、イボテン酸とは確実に分離しており、測定に支障を及ぼすことはないと考えられた。しかし、その他にも夾雑ピークが出ており、イボテン酸を測定する場合は、分離が十分でないと誤認す

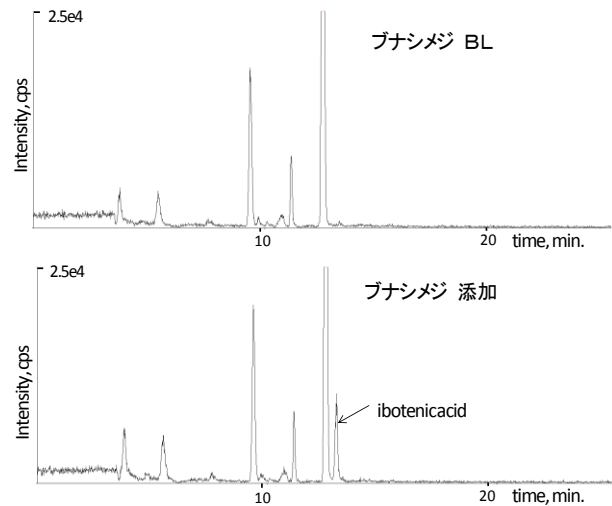


図 4 イボテン酸クロマトグラム

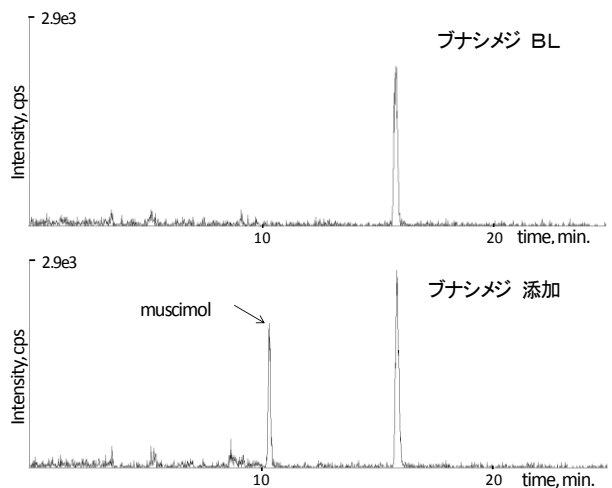


図 5 ムシモール クロマトグラム

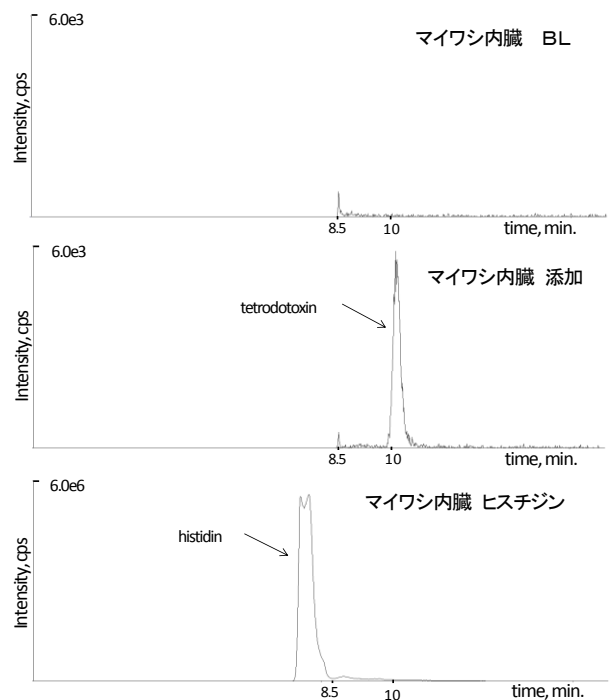


図 6 テトロドトキシン及び夾雑成分 クロマトグラム

る可能性が考えられ、注意を払う必要がある。

同じくブナシメジ5.0 gにムシモール25 μ gを添加した試料及び無添加試料のクロマトグラム(図5)では、ムシモールのピーク付近には夾雑ピークはほとんど出現せず、支障なく分析が可能であった。

マイワシの内臓2.0 gにテトロドトキシン10 μ gを添加した試料及び無添加試料のクロマトグラム(図6)については、分析に支障となる夾雑ピークはほとんど出現しなかった。しかし、テトロドトキシンの約2.5分前にヒスチジンと考えられる成分が溶出している。このピーク強度はかなり大きく、定量値に影響があると考えられたため、ヒスチジンの溶出がほぼ終了した8.5分から質分析計に溶出液を通して測定した。

3.4 添加回収試験

イボテン酸、ムシモール、ムスカリンについて25 μ gを、市販のブナシメジ及びエリンギのそれぞれ3試料に添加した。表2に示すように、ブナシメジに添加したムシモールは80 %台の平均回収率であったが、他は92.2~101.0 %と良好な結果を示した。CV値は、ブナシメジのイボテン酸が6.2 %と僅かに高いが、他は5.0 %以下であった。

表2 添加回収試験(キノコ) (%)

毒成分		ブナシメジ	エリンギ
イボテン酸	平均値	101.0	92.7
	CV	6.2	3.6
ムシモール	平均値	85.0	92.2
	CV	3.7	4.4
ムスカリン	平均値	94.8	92.8
	CV	0.6	3.0

(n=3, 添加量:25 μ g/5g)

テトロドトキシンは10 μ gを、シロサバフグ、シオサバの筋肉及びマイワシの内臓に添加した。各3試料を用いた平均回収率は、シロサバフグ及びシオサバはそれぞれ105.1 %, 93.8 %と良好な結果が得られた(表3)。マイワシの内臓における平均回収率が111.3 %と比較的高い値であったが、食品検査の精度管理における目標回収率(70~120 %) ⁸⁾を採用した場合、この範囲内であり食品分析では問題がないと考えられた。CV値については、5.1 %以下であり良好な結果であった。

表3 添加回収試験(魚類) (%)

毒成分		シロサバフグ	シオサバ	マイワシ内臓
テトロドトキシン	平均値	105.1	93.8	111.3
	CV	0.9	5.1	4.1

(n=3, 添加量:10 μ g/2g)

3.5 検出限界

検出限界は、イボテン酸が0.45 μ g/g、ムシモールが0.47 μ g/g、テトロドトキシンが0.30 μ g/gであった。

Tsujikawa ら⁹⁾は、乾燥したベニテングタケ及びテングタケのカサを分析したところ、イボテン酸含量は最大で2845 μ g/gであり(平均約620 μ g/g)、ムシモールは最大で1880 μ g/gであった(平均約790 μ g/g)と報告している。またテトロドトキシンはマウス試験による10 MU/g(テトロドトキシンとして2.2 μ g/g)未満では無毒とされている¹⁰⁾。したがって、今回の分析法では、実用分析において十分な感度を得られたと考えられる。

4 まとめ

1 毒キノコであるテングタケ、ベニテングタケの中毒成分であるイボテン酸について、既報の分析法に適用可能な検討したところ、精製ミニカラムを残存シラノールの影響の少ないものに変更することで可能となり、ムシモール、ムスカリンと共に一斉分析することが出来た。

2 ムシモールの定量イオンは、既報のm/z 98ではクロマトグラムのベースライン変動が大きいため、m/z 68に変更した。

3 フグ毒の主成分であるテトロドトキシンについて、既報の魚介類抽出液を用いて、イボテン酸と同じ精製ミニカラムで精製を行い、系統的に分析する方法を検討し良好な結果を得た。

4 テトロドトキシンのLC-MS/MS分析では、高濃度のヒスチジンが定量値に影響を及ぼす可能性があるため、ヒスチジンの溶出後に質量分析計へ導入して測定した。

5 イボテン酸、ムシモール、ムスカリンの2試料各3回による平均回収率は85.0~101.0 %であり、テトロドトキシンの3試料各3回による平均回収率は93.8~111.3%であった。また、検出限界は、イボテン酸が0.45 μ g/g、テトロドトキシンが0.30 μ g/g、既報における定量イオンを変更したムシモールは0.47 μ g/gであった。

6 今回の追加検討により、キノコ中毒7成分と魚介類中毒5成分について、検体原液を系統的に精製して、迅速分析することが可能となった。本分析法は、中毒成分が不明の場合有用な選択肢となり得る。

文 献

- 厚生労働省、自然毒のリスクプロファイル：テングタケ、http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/kinoko_det_07.html
- 込山茂久、山浦由郎、中澤裕之、藤田昌彦、梶澤洋三：高速液体クロマトグラフィーによるベニテングタケ中のイボテン酸及びムシモールの定量、分析化学、34(4)、161-165、1985。
- 佐藤正幸、姉帯正樹：テングタケ類に含有される

- イボテン酸及びムッシモールの分析, 北海道立衛生研究所報, 64, 27-33, 2014.
- 4) 多田裕之, 南谷臣昭, 神山恵理奈, 河村 博: LC-MS/MS によるキノコ及び魚介類の中毒成分迅速分析法, 岐阜県保健環境研究所報, 21, 1-7, 2013.
- 5) 厚生労働省, 自然毒のリスクプロファイル: 魚類: フグ毒, http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_01.html
- 6) 秦野真澄, 難波江芳子, 友岡美智代, 東 忠英, 岡 裕三, 小笠原光憲, 大瀬戸光明, 井上博雄: LC/MS/MS による尿中のテトロドトキシンの分析, 愛媛県立衛生環境研究所年報, 8, 17-20, 2005.
- 7) 赤木浩一, 畑野和広: 親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた LC/MS/MS によるテトロドトキシンの分析, 福岡市保健環境研究所報, 32, 98-100, 2006.
- 8) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知, 食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について, 平成9年4月1日, 衛食第117号, 1997.
- 9) Kenji Tsujikawa, Hiroyuki Mohri, Kenji Kuwayama, Hajime Miyaguchi, Yuko Iwata, Akinaga Gohda, Sunao Fukushima, Hiroyuki Inoue, Tohru Kishi: Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan, *Forensic Science International*, 164, 172-178, 2006.
- 10) 佐藤 繁, 児玉正昭, 第7章 自然毒 試験法 A 動物毒 1.フグ毒, 食品衛生検査指針委員会, 食品衛生検査指針理化学編, 813-820, 公益社団法人日本食品衛生協会, 2015.

Simultaneous Rapid Analysis of Toxins in Poisonous Mushrooms and Seafood by LC-MS/MS(The 2nd report)

— Analysis of Ibotenic Acid in Poisonous Mushrooms and Tetrodotoxin in Seafood —

Hiroyuki TADA, Takao CHIKUMOTO, Erina KOHYAMA, Hiroyuki NAGAI, Tetsuro ITO

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan*