

## 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

### 「汎用性の高い植物性自然毒の分析法の確立」

研究分担者 南谷臣昭 岐阜県保健環境研究所 食品安全検査センター

#### 研究要旨

有毒植物や有毒キノコに含まれる植物性自然毒による食中毒の発生時に、地方衛生研究所（地研）は保健所と協力して原因究明にあたる。地研にとって有用な分析法の開発は、中毒原因の迅速な特定と正確なリスク評価を可能とし、新たな食中毒対策につながることを期待される。有毒植物に含まれる毒成分については、令和2年度までに国内の食中毒事例全般に対応することが可能な多成分分析法を構築した。一方、有毒キノコに含まれる毒成分の有用な分析法は未だ確立されていない。そこで、本研究では、主に国内での食中毒発生件数が多いキノコや死亡事例が多いキノコを対象として、含有毒成分を化学的性質により2系統に分類し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）による分析法を確立することを目的に次の2つの検討を行った。

#### (1) 低極性のキノコ毒の分析法の開発（分析法1）

国内で食中毒発生件数が多いツキヨタケや死亡事例が多いドクツルタケなどの有毒キノコに含まれる低極性のキノコ毒9成分を対象とする分析法を開発した。しいたけを用いた添加回収試験を実施したところ、8成分の真度が85-98%と良好な結果が得られたことから、本法は有毒キノコによる食中毒の原因究明に有用な分析法であると考えられた。

#### (2) 高極性のキノコ毒の分析法の開発（分析法2）

国内で食中毒発生件数が多いテングタケにはイボテン酸などのアミノ酸やムシモールなどのアミン類が含まれる。こうした高極性のキノコ毒を対象として、プレカラム誘導体化LC/MS/MSによる新たな分析法を検討した。アミノ酸分析試薬である3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート（APDS）をプレカラム誘導体化試薬として用いたところ対象成分は迅速に誘導体化され、逆相クロマトグラフィーで保持可能な誘導体化物として高感度に分析することが可能であった。

研究協力者	谷口 賢	名古屋市衛生研究所	
友澤潤子	滋賀県衛生科学センター	吉岡直樹	兵庫県立健康科学研究所
岩附綾子	岐阜県保健環境研究所	野村千枝	大阪健康安全基盤研究所
竹内 浩	三重県保健環境研究所	山口瑞香	大阪健康安全基盤研究所
吉村英基	三重県保健環境研究所	阿部尚仁	岐阜薬科大学生薬学研究室

## A. 研究目的

自然毒食中毒は、発生頻度や患者数の割合は低いものの症状が重篤化しやすく死に至る事例もあるため、食品衛生上の重要な課題とされてきた。特に近年、有毒植物や有毒キノコに含まれる植物性自然毒については、誤食による死亡事例が毎年発生している。厚生労働省の食中毒統計によると、平成28年—令和2年の5年間の植物性自然毒による死者数は12名で、その内訳は有毒植物が10名(イヌサフラン7名、スイセン、トリカブト、グロリオサ各1名)、有毒キノコ2名(ニセクロハツと種類不明の野生キノコ各1名)となっている。また、令和3年はイヌサフランを原因として1名が亡くなっており、近年植物性自然毒による死者数は大きく増加している。このことから、食中毒発生時の迅速な原因究明とその予防対策が地方衛生研究所(地研)や保健所等の地方自治体衛生部局にとって重要な課題となっている。

食中毒事件の発生時に、植物性自然毒が原因と疑われる場合は、地研が中毒残品(患者が喫食したものの残品)の化学分析や遺伝子解析を行い、病因植物種や毒成分の同定を行っている。地研の分析結果は、正確な食中毒統計に欠かすことができない上、患者の治療や中毒の予防対策にとっても重要な科学的知見を提供するものであり、極めて重要である。

中毒事例の対応を通して開発された種々の分析法は、これまで地研のネットワークにより情報共有されてきた。その中で改良や分析精度の向上が図られてきたが、未だ課題が残されている。有毒植物に含ま

れる毒成分の化学分析については、先の厚生労働科学研究(H30-食品-一般-008)において、食中毒の発生件数が多い28植物群の44の毒成分を対象とした多成分分析法を開発し、食中毒発生時に地研にとって有用な分析法となり得ることを示した。一方、有毒キノコについては、対象とする毒成分の化学的性質が多岐にわたること、毒成分の標準物質を確保することが困難であるなどといった理由により、未だに有効な多成分分析法は確立されていない。

本研究では、国内で食中毒の発生件数や死亡事例が多い有毒キノコの毒成分(または指標成分)を化学的性質により分類し、低極性の成分はそのまま、高極性の成分のうちアミノ基を有するものはAPDS試薬によるプレカラム誘導体化により、それぞれ逆相クロマトグラフィー(RPLC)-タンデム質量分析(LC/MS/MS)により分析する2つの分析法を開発することを目的とした。

低極性の分析対象化合物は、食中毒の発生件数や死亡事例が多い4キノコ群(ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエンタケ、カキシメジ)に含まれる毒成分8種とニセクロハツの指標成分であるシクロプロピルアセチル-(R)-カルニチン(CPAC)の9成分とした。高極性の分析対象化合物は、APDS誘導体化により分析したアミノ酸類やアミン類の毒成分5種にアセタケ属など広範囲のキノコ種に含まれる四級アミンのコリンやムスカリンおよびヒドラジン構造を持つジロミトリンの3種を加えた8成分とした。高極性の分析対象化合物は、ペンタフルオロフェニル(PFP)基

を有するカラムを用いて分析条件を検討し、低極性の毒成分と同時に分析する手法の開発に挑戦した。

また、未市販の標準物質の確保の一環として、令和3年度はニセクロハツの指標成分である CPAC の化学合成を行った。

## B. 研究方法

### 1. 低極性のキノコ毒の分析法の開発 (分析条件1)

#### 1.1 分析対象化合物

分析対象化合物としたキノコ毒(または指標成分)9成分を表1および図1に示した。

#### 1.2 試料

添加回収試験にシイタケ(生、市販品(菌床栽培品))を用いた。

#### 1.3 試薬・試液

$\alpha$ -アマニチン、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチン、ファロイジンの4成分の標準品は、市販品をメタノールに溶解し100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製した。イルジン S は林純薬工業(株)製の1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ メタノール溶液を用いた。カエンタケのサトラトキシシン H およびサトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテートはAgilent technologies社の滝埜博士から提供された100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアセトニトリル溶液を用いた。カキシメジのウスタル酸は、日本大学の早川教授から提供された合成品(Hayakawa et al. (2008))から調製した33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のメタノール溶液を用いた。ニセクロハツの指標成分であるCPACは、松浦らの報告(Matsuura et al. (2016))に基づき、化学合成したもの(後述)を分取HPLCにより精製し、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のメタノール溶液として用いた。

内部標準として、安定同位体標識化合物のイソバレリル-(R)-カルニチン-d9 塩酸塩(Cambridge Isotope Laboratories社製)、バージニアマイシン B (Santa Cruz Biotechnology社製)、2, 2'-ビフェニルジカルボン酸(東京化成工業(株)製)、ジアセトキシシルペノール(富士フィルム和光純薬(株)製)を用いた。ジアセトキシシルペノールはアセトニトリルに、その他の化合物はメタノールに溶解して200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。これら4種の内部標準溶液を混合して、60%メタノールにより希釈し、50  $\text{ng}/\text{mL}$ の混合標準溶液を調製して、試験溶液と検量線用標準溶液の調製に使用した。

精製に用いたカートリッジはAgilent Technologies社製のCaptiva EMR-Lipid (3 mL, 300 mg)を使用した。

10%(w/v)トリクロロ酢酸(TCA)溶液はナカライテスク(株)製の特級試薬を用いて調製した。その他試験溶液の調製およびLC-MS/MS測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用またはLC-MS用を用いた。

#### 1.4 装置

LC-MS/MS装置は以下の高速液体クロマトグラフトリプル四重極タンデム質量分析計を用いた。

・ACQUITY UPLC System (Waters社製)  
-API4000 (Sciex社製)

#### 1.5 LC-MS/MS測定条件

分析対象化合物としたキノコ毒9成分および内部標準4成分のLC-MS/MS測定条件を表2-1、表2-2および図2に示した。分析カラムは、Waters社製のXBridge

Shield RP18 (2.1 mm  $\phi$   $\times$  150 mm, 3.5  $\mu$ m)を用い、0.05%ギ酸溶液とメタノールの2液グラジエントによるRPLCにより分析を行った。質量分析のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法で行った。

## 1.6 試験溶液の調製

低極性のキノコ毒の試験溶液調製法をScheme 1に示した。

### 1.6.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン製遠心沈殿管に量り採り、10%TCA 溶液 10 mL およびメタノール 10 mL を加えて2分間ホモジナイズした後、常温、2,000 $\times g$ で5分間遠心分離し、上清を採り、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

### 1.6.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、Captiva EMR-Lipid カートリッジに負荷し、常温、1,000 $\times g$ で1分間遠心分離し、溶出液を捨てた。さらに抽出液 1 mL を負荷し、同様に遠心分離して得られた溶出液を採り、4種内部標準混合溶液(50 ng/mL)を1 mL 加えた後、60%メタノールにより5 mL に定容したものを試験溶液とした(0.02 g sample/mL)。バイアルは不活性処理済みガラス製バイアルを用いた。

### 1.7 定量

4種内部標準混合溶液が10 ng/mLとなるように加え、0.4%TCA含有60%メタノール溶液により、5–200 ng/mLの標準溶液を調製した。それぞれ5  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入して絶対検量線法または内部標準法により定量値を求めて比較した。内部標準の割り当ては表2-1に従った。

## 1.8 添加回収試験

粉碎均質化したシイタケ 5 g にキノコ毒9成分を以下の濃度になるように添加、混和して30分間静置した後、3または5回併行の添加回収試験を行い、真度と併行精度を求めた。

- ・イルジン S、 $\alpha$ -アマニチン、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチン：2  $\mu$ g/g
- ・ファロイジン、サトラトキシシン H、サトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテート：1  $\mu$ g/g
- ・ウスタル酸：0.5  $\mu$ g/g

## 2. 高極性のキノコ毒の分析法の開発

### (分析条件 2)

### 2.1 分析対象化合物

分析対象化合物としたキノコ毒15成分を表3および図3に示した。高極性の毒成分であるコリン、ムスカリン、イボテン酸、ムシモール、アシルグリシン、プロパルギルグリシン、アガリチン、ジロミトリンの8成分に加え、分析条件1の対象成分の9成分のうち、市販の標準品が入手できなかったサトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテートおよびウスタル酸の2成分を除く7成分を加えた。

### 2.2 試薬・試液

ニセクロハツの指標成分であるCPAC以外は市販品を用いた。高極性の8成分はメタノール・水(1:1)混液に溶解し100、500、または1000  $\mu$ g/mLの標準原液を調製した。低極性の7成分の標準溶液は1.3 試薬・試液に示すとおり調製した。

また、内部標準として、安定同位体標識化合物のアラニン-d4 (Sigma-Aldrich 社製)を用いた。メタノール・水(1:1)に溶解し500  $\mu$ g/mLの標準溶液を調製した。

誘導体化には、富士フィルム和光純薬(株)製のAPDS試薬(APDSTAG)およびホウ酸緩衝液(APDSTAG Wako Borate Buffer)を用いた。APDS試薬100 mgをLC-MS用アセトニトリル5 mLに溶解して20 mg/mLの溶液を調製し、4°Cで保存して用いた。

その他試験溶液の調製およびLC-MS/MS測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用またLC-MS用を用いた。

### 2.3 装置

LC-MS/MS装置は以下の高速液体クロマトグラフトリプル四重極タンデム質量分析計を用いた。

・ExionLC AD (Sciex社製) -Triple Quad 5500+・QTRAP Ready (Sciex社製)

誘導体化反応に用いたヒートブロックは、Thermo Fisher Scientific社製のReacti-Thermを用いた。

### 2.4 LC-MS/MS測定条件

キノコ毒15成分および内部標準1成分のLC-MS/MS測定条件を表4および図4に示した。分析カラムは、Phenomenex社製のLuna PFP(2) (2 mm φ × 150 mm, 3 μm)を用い、0.01%ギ酸含有5 mMギ酸アンモニウム溶液とメタノールの2液グラジエントによるRPLCにより分析を行った。質量分析のイオン化は、ESI法で行い、予想される溶出時間帯のみを測定するScheduled MRMを用いた。

### 2.5 誘導体化反応

誘導体化の反応操作および反応式をScheme 2に示した。

分析対象とした16成分(内部標準のアラニン-d4を含む)のうち、アミノ酸類(イ

ボテン酸、アシルグリシン、プロパルギルグリシン、アガリチンおよびアラニン-d4)とアミン類(ムシモール)の6成分は、分子内のアミノ基をAPDS法により誘導体化した上で分析した。アミノ基を有しない他の10成分と合わせ、16成分の混合標準液を80%メタノール溶液により調製し、1.5 mLの不活性処理済みガラス製バイアル中に100 μL分取した。これにホウ酸緩衝液300 μLおよびAPDS溶液100 μLを加えて、スクリュウキャップでフタをして密閉し、ヒートブロックで55°C、10分間加温して誘導体化した。反応液を室温に戻した後、0.2%ギ酸含有60%メタノール溶液500 μLを加えて試験溶液とした。

### 2.6 SRM条件の最適化

APDS誘導体化物(APD-M)のSRM条件の最適化は、2.5誘導体化反応により、各成分の10 μg/mLの標準溶液を誘導体化して得られた試験溶液(1 μg/mL)をメタノールで100倍希釈した後、シリンジポンプによるインフュージョンにより質量分析計に導入して行った。誘導体化物のプロトン付加分子([APD-M+H]<sup>+</sup>)に相当するプリカーサーイオンが、*m/z* *Mm*+121 (*Mm*: 分析対象化合物のモノアイソトピック質量)として検出されたことを確認後、定量用として*Mm*+121 > 121、確認用として*Mm* +121 > *Mm*+1の2つのトランジションを選択してSRM条件を最適化した。

イボテン酸とアガリチンの*Mm*+121 > 121と*Mm* +121 > *Mm*+1のトランジションはインフュージョンにより最適化できなかったため、PFPカラムを用いて得

られたクロマトグラムにより最適化を実施した。分離カラムは Merck 社製のコアシェル型 PFP カラム、Supelco Ascentis Express F5 (2.1 mm  $\phi$   $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m) を用いた。1  $\mu$ g/mL の標準溶液を誘導体化した試験溶液 (100 ng/mL) を PFP カラムにより分離し、Declustering potential (DP) を 30-100 V まで、Collision energy (CE) を 20-110 V まで、それぞれ 10 V ずつ変えて誘導体化物のピークの面積値を比較することにより、最適な DP と CE を設定した。

その他の SRM トランジションについては PFP カラムで分離したピークについて、プロダクトイオンスペクトルから候補を探索し、CE を 20-110 V まで 10 V ずつ変え、プロダクトイオンの強度が最大となる CE を設定した。

各誘導体化物について、定量用で 1 つ、確認用で 3 つの合計 4 つのトランジションを設定した。なお、インフュージョンにより最適化できなかったトランジションの Collision exit potential (CXP) は一律 10 V に設定した。

誘導体化しない 10 成分の SRM 条件の最適化は、標準原液をメタノールまたはメタノール・水 (1:1) 混液で適宜希釈したものをインフュージョンにより質量分析計に導入し、定量用と確認用の 2 つのトランジションを設定した。

## 2.7 機器分析の検出限界および定量限界の推定

16 成分の混合標準液を、80%メタノール溶液で希釈して 1、2.5、5、10、25、50、100、250 ng/mL の 8 濃度の標準溶液を調

製し、Scheme 2 により誘導体化して得られた試験溶液を表 4 および図 4 の条件で分析した (誘導体化後の試験溶液の濃度は 0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25 ng/mL)。各濃度に対するクロマトグラムのピーク面積をプロットし、最小二乗法による直線回帰して得られた検量線の傾き (a) を求めた。さらに、各濃度のクロマトグラムから、検出限界に近い濃度の試験溶液を選択して 6 回繰り返し測定し、ピーク面積の標準偏差 ( $\sigma$ ) を求めた。検出限界は  $3\sigma/a$  により、定量限界は  $10\sigma/a$  により算出した。検量線の相関係数 ( $R$ ) は、誘導体化後の濃度として 1、2、5、10、20、50 ng/mL の 6 濃度からなる検量線から算出した。

## 3. CPAC の化学合成

松浦らの報告 (Matsuura et al. (2016)) に基づき、シクロプロピル酢酸と L-カルニチン (いずれも東京化成工業 (株) 製) から脱水縮合反応により合成した (Scheme 3)。これを分取 HPLC により精製した後、重水中、22°C で  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。装置は日本電子 (株) 製の JEOL ECA-500 を用いた。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. 低極性のキノコ毒の分析法の開発 (分析条件 1)

日本において過去の食中毒発生件数が最も多いキノコはツキヨタケで、次いでクサウラベニタケ、カキシメジとなっており、現在もこの 3 種のキノコの誤食による食中毒が毎年数多く発生している。また、過去の食中毒の死亡事例は、ドクツルタケが最も多く、次いでシロタマゴテングタケ、ニセクロハツ、カエントケとなっている

(登田ら, (2012))。図 1 に分析対象化合物として示した 9 成分は、これらの有毒キノコのうちクサウラベニタケ以外のものに対応しており、致命的な食中毒事例をはじめ、多くの事例に対応することが可能であると考えられる。なお、クサウラベニタケの毒成分は、消化器症状の原因となる溶血性タンパク質や神経症状の原因となるコリンやムスカリンとされるが、後者については後述する高極性のキノコ毒の分析法の対象化合物としている。

分析対象化合物とした 9 成分は、誘導体化やイオンペア試薬を用いることなく、RPLC で分析することが可能であった。分析条件については、先の厚生労働科学研究 (H30-食品-一般-008) において最適化しており、今回、有毒植物の多成分分析に用いた前処理法を応用して添加回収試験を実施した。

### 1.1 添加回収試験の結果

シイタケを用いて 0.5-2  $\mu\text{g/g}$  の濃度で添加回収試験を実施した結果を図 5 に示した。内部標準補正を行わない場合、CPAC を除く 8 成分で真度は 81-87%、併行精度は 1.7-10.1RSD%となった。内部標準補正を行った場合、真度は 8 成分いずれも向上し、85-98%となった。併行精度は 3.1-9.0RSD%となり、成分によっては定量値のバラツキが大きくなったが、いずれも 10%以下となり内部標準補正が有効であることが示された。

表 2-1 には記載しなかったが、アマニタトキシシン類の 4 成分 ( $\alpha$ -アマニチン、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチンおよびファロイジン) は、ESI のポジティブモード (ESI(+))

でも分析が可能であった。しかし、ネガティブモード (ESI(-)) に比べて測定感度が低く、特に $\alpha$ -アマニチン、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチンの場合は検量線や定量値のバラツキが大きくなる傾向が見られたため、ESI(-)での分析条件を採用した。

CPAC の真度は内部標準補正の有無に関わらず 69%で、70%を下回る低値となったが、指標成分としてニセクロハツを同定する目的としては十分であると考えられた。しかし、シイタケのブランク試料のクロマトグラムにおいて、CPAC の保持時間付近に定量および確認の両トランジション (244 > 85 および 244 > 185) で夾雑ピークが確認され、選択性に問題があると考えられた。定量トランジションのクロマトグラムではブランク試料のピーク面積が 1  $\mu\text{g/g}$  の添加試料に対して 3.1%と小さかったものの、夾雑ピークは高感度に検出されていた (図 6)。ニセクロハツの同定に用いるためには、閾値の設定や他のトランジションや分析カラムを用いた確認方法を工夫する必要があると考えられた。

本法におけるマトリックス存在下での定量限界は、いずれの成分も 0.5  $\mu\text{g/g}$  以下を担保していた。検量線の相関係数( $R$ )は、CPAC を除く 8 成分で、内部標準補正の有無に関わらず 0.995 以上となり良好な結果が得られた。

本法は、食中毒の発生件数が多いキノコや死亡事例が多いキノコの食中毒の原因究明に有用な分析法であることが示唆されたことから、今後、試験室間妥当性評価を実施し、分析法の汎用性を検証する。

## 2. 高極性のキノコ毒の分析法の開発

## (分析条件 2)

キノコ毒には、ベニテングタケから単離されたムスカリンをはじめ、イボテングタケから単離されたイボテン酸やムシモールなど、低分子の高極性化合物が数多く存在する。前述のように、ムスカリンは日本の過去の食中毒発生件数が 2 番目に多いクサウラベニタケの毒成分の 1 つであるとともに、シロトマヤタケやオオキヌハダトマヤタケなどのアセタケ属のキノコをはじめとする広範囲のキノコに含まれる毒成分である。また、イボテン酸やムシモールは、過去の食中毒発生件数が多く報告されているテングタケをはじめとする一部のテングタケ属のキノコの主要な毒成分である。

特に日本では、キノコによる食中毒事例における、これらの低分子の高極性毒成分の含有実態は十分に把握されておらず、リスク評価のためのデータが不足している。先の厚生労働科学研究 (H30-食品-一般-008) においては、これらの高極性毒成分を親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) /MS/MS により分析する方法を検討したが、夾雑成分の影響のため、正確な同定、定量は困難であった。また、本年度の予備的な検討において、分析に影響を与えていると考えられた夾雑成分の無機塩類を除去するため、グラファイトカーボンカートリッジによる固相抽出を検討したが、分析対象化合物を回収することができず HILIC/MS/MS による分析法の開発を断念した。

今回検討に用いた APDS 法は、ほ乳類の血漿中に含まれる遊離アミノ酸のプレカ

ラム誘導体化分析法として新保らが開発した方法である (Shimbo et al. (2009))。

APDS 試薬は、分子内に活性カーバメートを有しており、アミノ酸をはじめ第 1 級アミンや第 2 級アミンなど、アミノ基の誘導体化を穏和な条件で迅速に進めることができる。また誘導体化物にイオン化効率の高いアミノピリジル基が含まれるため、質量分析計で高感度に検出できるという利点がある。APDS 試薬は現在、市販の試薬として入手可能であり、ヒトの血漿のアミノ酸メタボロミクスや食品中のアミノ酸の分析例も報告されている。

以上のことから、キノコ中毒発生時に低分子の高極性毒成分を質量分析により迅速かつ正確に定量するための汎用性の高い分析法として、APDS 法は有用性が高いと考え分析法の検討を行った。

## 2.1 誘導体化反応

誘導体化反応の操作は、富士フィルム和光純薬(株)が示す APDS 試薬 (APDSTAG) の標準操作法に従った (Scheme 2)。

APDS 法で分子内のアミノ基が 1 つ誘導体化された場合、タンデム質量分析において誘導体化物のプロトン付加イオン ( $[\text{APD}\cdot\text{M}+\text{H}]^+$ ) に相当する  $m/z M_m+121$  にプリカーサーイオンが検出され、ピリジルアミノカルボニル部位 ( $[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_2\text{O}]^+$ ) に由来する  $m/z 121$  のプロダクトイオンが特異的に生じる。分析対象化合物とした 15 成分のうち、誘導体化可能なアミノ基を有していると考えられたイボテン酸、ムシモール、アリルグリシン、プロパルギルグリシン、アガリチンの 5 成分は、Scheme 2 の反応操作により、いずれも  $M_m +121$

> 121 のトランジションでピークを検出することが可能であった。

誘導体化の操作は、比較的穏やかな条件で簡易、迅速に実施することが可能であったが、一般的に誘導体化の反応効率や試料マトリックスの影響を受けることが知られている。試料マトリックス存在下での誘導体化の反応時間や誘導体化試薬量の最適化は今後の検討課題である。

## 2.2 誘導体化物の SRM 条件の最適化

APDS 誘導体化物の SRM 条件の最適化はインフュージョン法で実施したが、APDS 試薬をはじめとする反応試薬の影響のため、イボテン酸やアガリチンでは得られた SRM トランジション条件が正確でなく、クロマトグラム上でピークを高感度に検出できなかった。そのためこれらの 2 成分は、DP と CE を変えてクロマトグラムのピーク面積を比較することにより最適化を行った。

また確認用トランジションの候補とした  $Mm +121 > Mm +1$  は強度が小さかったため、プロダクトイオンスペクトルによりその他の候補も探索した。図 7 に CE 20 と 50 V における誘導体化物のプロダクトイオンスペクトルを示した。CE 20 V においては、アガリチンを除いてプリカーサーイオン ( $[APD-M+H]^+$ ) が検出された。また、CE 50 V においては、3-アミノピリジンのプロトン付加分子 ( $[C_5H_7N_2]^+$ ) に相当する  $m/z$  95 や  $m/z$  78 のプロダクトイオンがいずれの誘導体化物からも検出された。

アガリチンは CE 20 V において、 $[APD-M+H]^+$  の脱水イオンに相当する  $m/z$  370

のプロダクトイオンが検出された。さらに、 $m/z$  232, 256, 276 にもプロダクトイオンが検出された。CE 50 V においては他の誘導体化物と同様に  $m/z$  95 と  $m/z$  78 のプロダクトイオンが検出されたが、 $m/z$  77 にも強度の高いプロダクトイオンが検出された。

以上の結果から、誘導体化物の SRM トランジションとして、定量用として  $Mm +121 > 121$ 、確認用として  $Mm +121 > Mm +121$ 、 $Mm +121 > Mm +1$ 、 $Mm +121 > 95$  (アガリチンの確認用は  $Mm +121 > Mm +1$ 、 $Mm +121 > 232$ 、 $Mm +121 > 77$ ) の 4 つのトランジションを設定した (表 4)。

## 2.3 分離条件の最適化

APDS 誘導体化物と表 1 に示した低極性の毒成分を分析する場合は、図 2 の条件により C18 カラムを用いて RPLC により分析することが可能であったが、四級アミンを持つコリンやムスカリンは十分に保持されなかった。そこで、分析カラムとしてカチオンの保持に優れた PFP カラムを採用し、APDS 誘導体化物に加え低極性の毒成分も同時に分析することとした。

$\beta$ -アマニチンは $\alpha$ -アマニチンの分子内のアスパラギンがアスパラギン酸となった構造を持ち、モノアイソトピック質量は $\alpha$ -アマニチンよりも 0.984 大きい (表 4)。その結果、トリプル四重極における $\beta$ -アマニチンの SRM 測定においては、 $\alpha$ -アマニチンの第一同位体に由来するピークが出現し、両者をクロマトグラフィーにより分離しなければ、 $\beta$ -アマニチンの正確な定量ができない。そこで、移動相 A のギ酸アン

モニウムは 5 mM のまま、ギ酸濃度を 0、0.01、0.05、0.1% と変化させて、 $\alpha$ 、 $\beta$ -アマニチンの分離度を確認したところ、ギ酸濃度が少ないほど両者の分離度は上がることが分かった。一方で、ギ酸を入れないとムスカリンをはじめとする他の成分のピークが広がったため、5 mM ギ酸アンモニウムにギ酸を 0.01% 添加することとした (pH4.0)。この時の $\alpha$ 、 $\beta$ -アマニチンの分離度  $R_s = 2.1$  となり完全分離の指標である  $R_s = 1.5$  を上回っていた (図 8)。

また、APDS 誘導体化した 6 成分のうち、プロパルギルグリシン、ムシモール、アイルグリシンの 3 成分は分子量の差がそれぞれ 1 ずつ異なっている (表 4)。 $\beta$ -アマニチンの定量に $\alpha$ -アマニチンの第一同位体が影響するのと同様に、プロパルギルグリシンの第一同位体がムシモールに、ムシモールの第一同位体やプロパルギルグリシンの第二同位体がアイルグリシンに影響して定性や定量を妨害することを避けるため、十分に分離することが必要となる。こうした分離の問題を克服するために種々の分析カラムを検討した結果、最も適していた分析カラムは Phenomenex 社製の Luna PFP(2) (2 mm  $\phi$   $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m)であった (図 8)。

#### 2.4 検量線と検出限界および定量限界

以上最適化された分析条件により、分析対象化合物 16 成分を Scheme 2 によって処理した後、検量線を作成したところ、試験溶液 1-50 ng/mL の範囲で相関係数 ( $R$ ) が 0.998 以上となり良好であった。

繰り返し測定による保持時間の変動はなかった。また、定量限界はイボテン酸が

2 ng/mL、イルジン S が 3 ng/mL、ジロミトリンが 5 ng/mL で、その他の成分が < 1 ng/mL となった。前処理の希釈率にもよるものの、食中毒残品の分析に必要な定量限界であると考えられた。

### 3. 化学合成による標準品の確保

毒成分の標準物質を確保することが困難であることは、キノコ毒のリスク評価にとって支障となっている。今回、過去の死亡事例が多く、近年も死者の発生が多いニセクロハツの指標成分である CPAC に着目して、化学合成により標準品を確保することとした。

合成法は松浦らの報告 (Matsuura et al. (2016)) に従い、シクロプロピル酢酸に塩化チオニルを加えて酸塩化物を生成させた後、L-カルニチンを加えて目的化合物を得た (Scheme 3)。重水中での  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは松浦らが報告した結果とよく一致し、純度の高い目的化合物が得られた (図 9)。今後、ニセクロハツの食中毒事例が発生した場合に同定用の標準品として使用することが可能であることが示された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

特になし

### 3. 行政関係者向け説明会

- 1) 南谷臣昭：有毒植物による食中毒に対応するための一斉試験法の開発、第 58

回全国衛生化学技術協議会年会部門別研究会（食品部門）、Web 開催／名古屋市、2021 年 11 月

- 2) 南谷臣昭：有毒植物による食中毒への対応と予防対策について、令和 3 年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第 34 回理化学部会自然毒勉強会、書面開催／静岡市、2022 年 2 月

#### 4. 市民向け発表会

特になし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### G. 参考文献

- 1) Hayakawa, I., Watanabe, H. and Kigoshi, H. *Tetrahedron*, **64**, 5873-5877 (2008).
- 2) Matsuura, M., Kato, S., Saikawa, Y., Nakata, M. and Hashimoto, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 602-608 (2016).
- 3) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福肇, 森川馨. *食品衛生学雑誌*, **53**, 105-120 (2012).
- 4) Shimbo, K., Oonuki, T., Hirayama, K., Yahashi, A. and Miyano, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 1483-1492 (2009).

表 1 分析対象化合物と対応する主な有毒キノコ（分析条件 1）

Group	No.	化合物名	CAS No.	主なキノコ種
1	1	イルジン S	1149-99-1	ツキヨタケ
2	2	ウスタル酸	470699-70-8	カキシメジ
3	3	$\alpha$ -アマニチン	23109-05-09	ドクツルタケ
	4	$\beta$ -アマニチン	21150-22-1	シロタマゴテングタケ
	5	$\gamma$ -アマニチン	21150-23-2	
	6	ファロイジン	17466-45-4	
4	7	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン		ニセクロハツ
5	8	サトラトキシシン H	53126-64-0	カエンタケ
	9	サトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテート	60538-74-1	

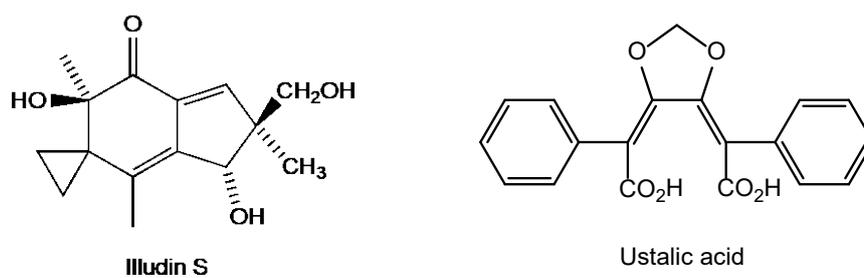
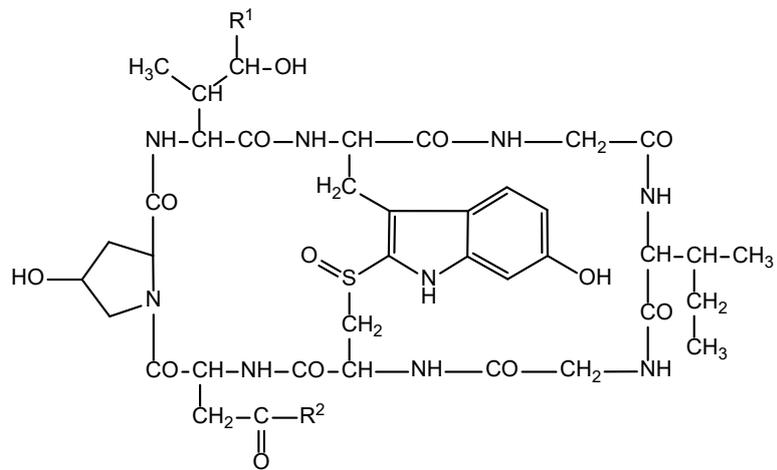
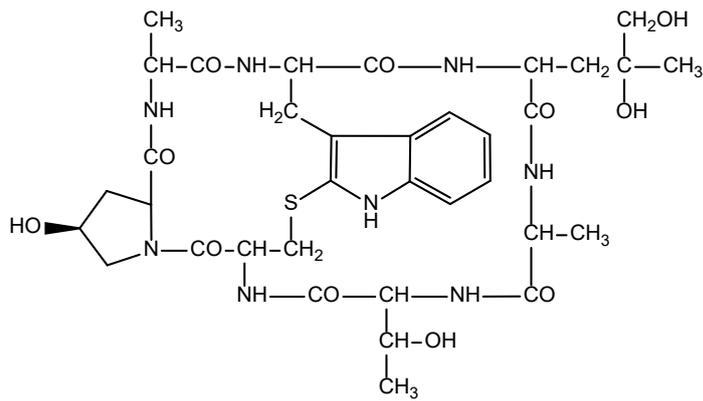


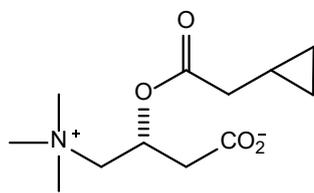
図 1 分析対象化合物の化学構造（分析条件 1）



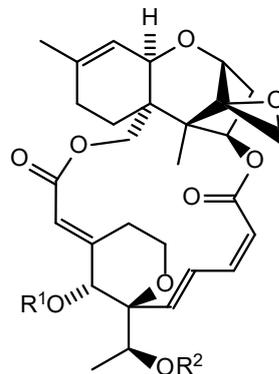
$R^1 = \text{CH}_2\text{OH}, R^2 = \text{NH}_2$      $\alpha$ -Amanitin  
 $R^1 = \text{CH}_2\text{OH}, R^2 = \text{OH}$      $\beta$ -Amanitin  
 $R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \text{NH}_2$      $\gamma$ -Amanitin



Phalloidin



Cyclopropyl-(R)-carnitine



$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{H}$     Satratoxin H  
 $R^1 = \text{Ac}, R^2 = \text{Ac}$     Satratoxin Hb 12', 13'-diacetate

図 1 分析対象化合物の化学構造 (分析条件 1) (つづき)

表 2-1 有毒キノコの毒成分の保持時間、SRM トランジション条件および内部標準の割り当て (分析条件 1、保持時間順)

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	分子式	分子量	モノアイソトピック 質量	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	内部標準
1	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン	Cyclopropylacetyl-(R)- carnitine	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	243.30	243.1471	3.5	+	[M+H] <sup>+</sup>	244.3 244.3	85.1 185.0	46 46	29 19	14 10	イソバレリルカルニチン-d9
2	α-アマニチン	α-Amanitin	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S	918.97	918.3542	5.0	-	[M-H] <sup>-</sup>	917.3 917.3	899.4 917.5	-125 -125	-38 -8	-21 -19	バージニアマイシンB
3	β-アマニチン	β-Amanitin	C <sub>39</sub> H <sub>53</sub> N <sub>9</sub> O <sub>15</sub> S	919.96	919.3382	5.4	-	[M-H] <sup>-</sup>	918.3 918.3	900.5 918.5	-135 -135	-42 -10	-21 -23	バージニアマイシンB
4	イルジンS	Illudin S	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264.32	264.1362	5.4	+	[M+H] <sup>+</sup>	265.1 265.1	217.2 247.2	31 31	13 11	14 14	バージニアマイシンB
5	γ-アマニチン	γ-Amanitin	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S	902.97	902.3593	5.5	-	[M-H] <sup>-</sup>	901.4 901.4	883.5 901.5	-140 -140	-38 -8	-15 -19	バージニアマイシンB
6	ファロイジン	Phalloidin	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> N <sub>8</sub> O <sub>11</sub> S	788.87	788.3163	6.8	-	[M-H] <sup>-</sup>	787.3 787.3	743.4 787.5	-145 -145	-44 -10	-11 -13	バージニアマイシンB
7	ウスタル酸	Ustalic acid	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	338.32	338.0790	8.5	-	[M-H] <sup>-</sup>	337.3 337.3	219.0 117.0	-35 -35	-12 -32	-15 -9	2,2'-ビフェニルカルボン酸
8	サトラトキシ H	Satratoxin H	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	528.59	528.2359	8.8	+	[M+H] <sup>+</sup>	529.4 529.4	231.3 245.2	81 81	25 23	12 14	ジアセトキシシルペノール
9	サトラトキシ H 12', 13'-ジアセテート	Satratoxin H 12', 13'-diacetate	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	612.66	612.2571	10.0	+	[M+H] <sup>+</sup>	613.3 613.3	245.3 217.3	61 61	25 43	14 12	ジアセトキシシルペノール

上段：定量トランジション、下段：確認トランジション

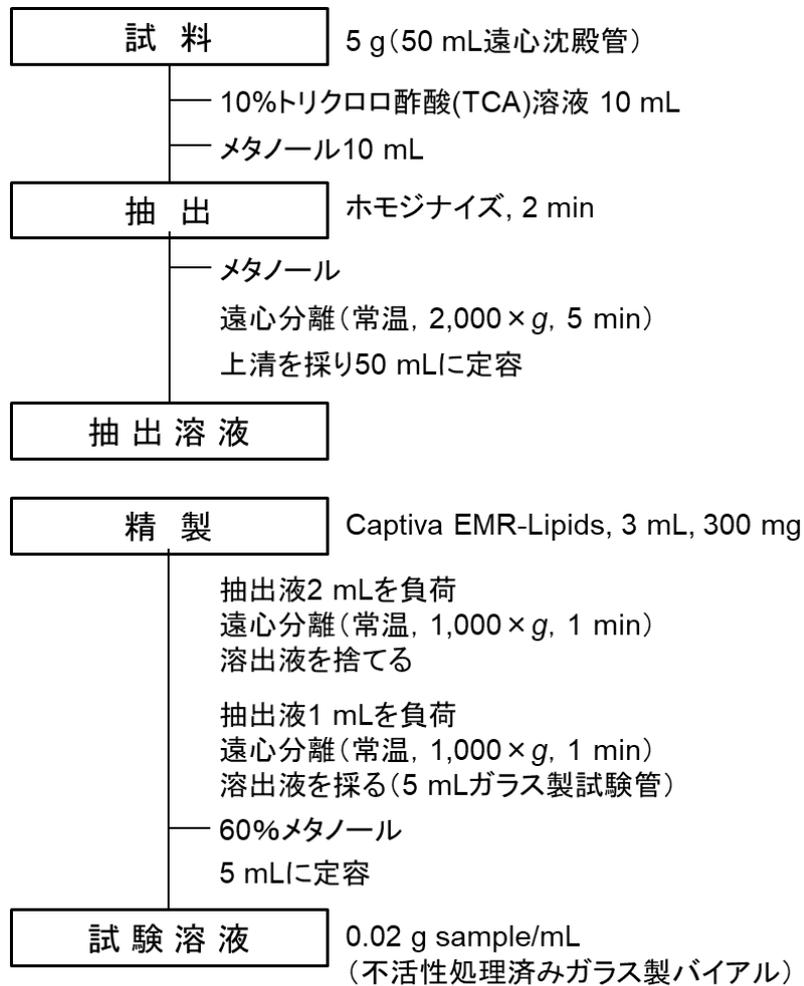
表 2-2 内部標準の SRM トランジション条件 (分析条件 1、保持時間順)

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	備考
IS1	イソバレリルアセチル-(R)- カルニチン-d9	Isovalerylacetyl- carnitine-d9	4.0	+	[M+H] <sup>+</sup>	255.3	85.1	51	31	14	シリンジスパイク
IS2	ジアセトキシ スシルペノール	Diacetoxy- scirpenol	7.4	+	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	384.2	307.2	56	17	18	シリンジスパイク
IS3	2,2'-ビフェニル ジカルボン酸	2,2'-Biphenyl- carboxylic acid	7.9	-	[M-H] <sup>-</sup>	240.9	153.2	-45	-22	-1	シリンジスパイク
IS4	バージニアマイシン B	Virginiamycin B	9.3	+	[M+H] <sup>+</sup>	867.4	663.4	106	37	22	シリンジスパイク
				-	[M-H] <sup>-</sup>	865.3	177.2	-120	-58	-3	

カラム	XBridge Shield RP18 (Waters) 2.1 × 150 mm, 3.5 μm		
移動相	(A) 0.05%ギ酸 (B) メタノール		
グラジエント	<b>Time/min</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
	0	90	10
	10	0	100
	12	0	100
	12.1	90	10
	20	90	10
流速	0.2 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	5 μL		
イオン源	<b>Parameter \ Porarity</b>	<b>ESI(+)</b>	<b>ESI(-)</b>
	Curtain gas (psi)	20	20
	Collision gas (psi)	7	7
	Ion Spray Voltage (V)	5000	-4500
	Temperature (°C)	300	300
	Ion Source Gas1 (psi)	60	60
	Ion Source Gas2 (psi)	60	60

\* SCIEX社製 Turbo-Vソースの設定例

図 2 液体クロマトグラフおよびMS イオン源の条件 (分析条件 1)



Scheme 1 有毒キノコの試験溶液調製法 (分析条件 1)

表 3 分析対象化合物と対応する主な有毒キノコ（分析条件 2）

Group	No.	化合物名	CAS No.	主なキノコ種
1	1	コリン	62-49-7	ベニテングタケ
	2	ムスカリン	300-54-9	アセタケ属
2	3	イボテン酸	25690-45-3	イボテングタケ
	4	ムシモール	2763-96-4	テングタケ
3	5	アリルグリシン	16338-45-0	コテングタケモドキ タマシロオニタケ
4	6	プロパルギルグリシン	23235-01-0	タマシロオニタケ テングタケモドキ
5	7	ジロミトリン	16568-02-8	シャグマアミガサタケ
6	8	アガリチン	2757-90-6	ツクリタケ
7	9	イルジン S	1149-99-1	ツキヨタケ
8	10	$\alpha$ -アマニチン	23109-05-09	ドクツルタケ
	11	$\beta$ -アマニチン	21150-22-1	シロタマゴテングタケ
	12	$\gamma$ -アマニチン	21150-23-2	
	13	ファロイジン	17466-45-4	
9	14	シクロプロピルアセチル- (R)-カルニチン		ニセクロハツ
10	15	サトラトキシシン H	53126-64-0	カエンタケ



表 4 有毒キノコの毒成分と内部標準の保持時間および SRM トランジション条件 (分析条件 2、保持時間順)

No.	化合物名 (和名)	化合物名 (英名)	分子式	分子量	モノアイソトピック質量	保持時間 (min)	ESI (+/-)	プリカーサー イオン	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	コリン	Cholin	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO <sup>+</sup>	104.17	104.1075	2.4	+	M <sup>+</sup>	104.0	60.0	26	25	10
									104.0	58.0	26	41	10
2	ムスカリン	Muscarin	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	174.26	174.1494	5.0	+	M <sup>+</sup>	174.0	57.0	51	31	6
									174.0	43.0	51	49	10
3	イボテン酸	L-Ibotenic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	158.11	158.0328	5.0	+	[APD-M+H] <sup>+</sup>	279.1	121.0	90	30	10
									279.1	159.1	90	20	10
									279.1	279.0	90	20	10
									279.1	95.0	90	50	10
									214.0	121.0	81	38	14
IS1	アラニンd4 (内部標準)	Alanine d4 (Internal Standard)	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> D <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	93.12	93.0728	5.7	+	[APD-M+H] <sup>+</sup>	214.0	94.0	81	52	11
									214.0	214.2	81	20	10
									214.0	95.2	81	50	10
									388.3	121.0	40	40	10
4	アガリチン	Agaritine	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	267.28	267.1219	5.8	+	[APD-M+H] <sup>+</sup>	388.3	268.0	40	20	10
									388.3	232.2	40	30	10
									388.3	76.9	40	80	10
									234.1	121.3	80	25	8
5	プロバルギルグリシン	L-Propargylglycine	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	113.11	113.0477	6.0	+	[APD-M+H] <sup>+</sup>	234.1	113.9	80	18	16
									234.1	234.1	80	20	10
									234.1	95.2	80	50	10
									244.3	85.1	46	29	14
6	シクロプロピルアセチル (R)-カルニチン	Cyclopropylacetyl (R)-carnitine	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	243.30	243.1471	6.4	+	[M+H] <sup>+</sup>	244.3	185.0	46	19	10
									244.3	42.0	46	29	10
7	ジロミトリン	Gyromitrin	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O	100.12	100.0637	6.5	+	[M+H] <sup>+</sup>	101.0	73.0	46	15	12
8	β-アマニチン	β-Amanitin	C <sub>39</sub> H <sub>53</sub> N <sub>9</sub> O <sub>15</sub> S	919.96	919.3382	6.6	-	[M-H] <sup>-</sup>	918.3	900.5	-135	-42	-21
									918.3	918.5	-135	-10	-23
9	ムシモール	Muscimol	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.10	114.0429	6.7	+	[APD-M+H] <sup>+</sup>	235.1	121.2	81	26	8
									235.1	115.0	81	19	18
									235.1	235.0	81	20	10
									235.1	95.3	81	40	10
10	α-アマニチン	α-Amanitin	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S	918.97	918.3542	7.0	-	[M-H] <sup>-</sup>	917.3	899.4	-125	-38	-21
									917.3	917.5	-125	-8	-19
									236.0	121.0	72	27	7
11	アリルグリシン	L-Allylglycine	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115.13	115.0633	7.1	+	[APD-M+H] <sup>+</sup>	236.0	116.3	72	18	8
									236.0	236.2	72	20	10
									236.0	95.2	72	50	10
									265.1	217.2	41	13	14
12	イルジジンS	Illudin S	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264.32	264.1362	7.5	+	[M+H] <sup>+</sup>	265.1	247.2	41	11	14
									265.1	41	11	14	
13	γ-アマニチン	γ-Amanitin	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub> S	902.97	902.3593	7.5	-	[M-H] <sup>-</sup>	901.4	883.5	-140	-38	-15
14	ファロイジン	Phalloidin	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> N <sub>8</sub> O <sub>11</sub> S	788.87	788.3163	8.5	-	[M-H] <sup>-</sup>	901.4	901.5	-140	-8	-19
									787.3	743.4	-145	-44	-11
15	サトラトキシジン H	Satratoxin H	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	528.59	528.2359	10.2	+	[M+H] <sup>+</sup>	787.3	787.5	-145	-10	-13
									529.4	231.3	81	25	12
									529.4	245.2	81	23	14

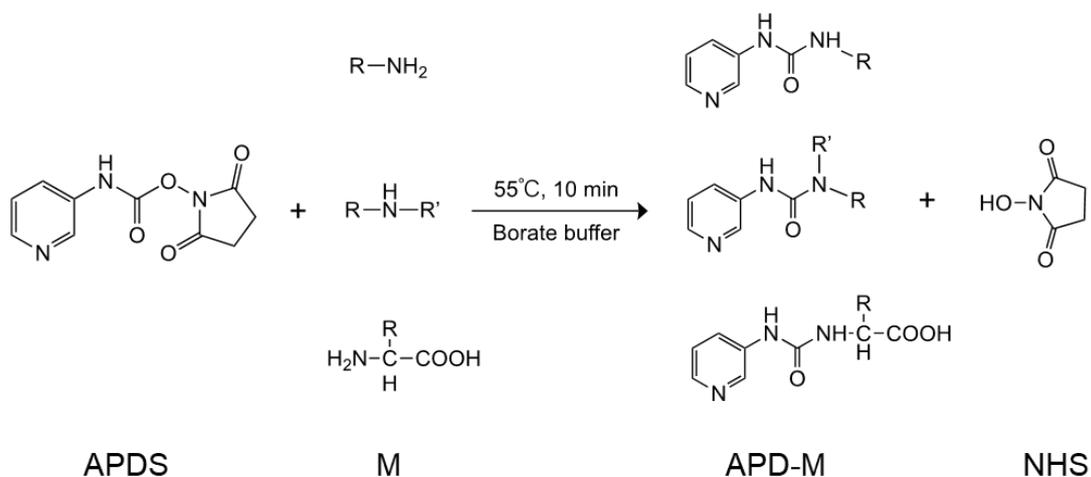
[APD-M+H]<sup>+</sup>: APDS誘導体化合物のプロトン付加分子  
最上段: 定量トランジション、2段目以降: 確認トランジション

カラム	Luna PFP(2) (Phenomenex) 2 × 150 mm, 3 μm		
移動相	(A) 0.01%ギ酸 含有5 mMギ酸アンモニウム (B) メタノール		
グラジエント	<b>Time/min</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
	0	100	0
	10	0	100
	12	0	100
	12.1	100	0
	20	100	0
流速	0.2 mL/min		
カラム温度	40°C		
注入量	5 μL		
イオン源	<b>Parameter \ Porarity</b>	<b>ESI(+)</b>	<b>ESI(-)</b>
	Curtain gas (psi)	30	30
	Collision gas (psi)	9	9
	Ion Spray Voltage (V)	5000	-4500
	Temperature (°C)	300	300
	Ion Source Gas1 (psi)	60	60
	Ion Source Gas2 (psi)	60	60

\* SCIEX社製 Turbo-Vソースの設定例

図4 液体クロマトグラフ及びMSイオン源の条件（分析条件2）

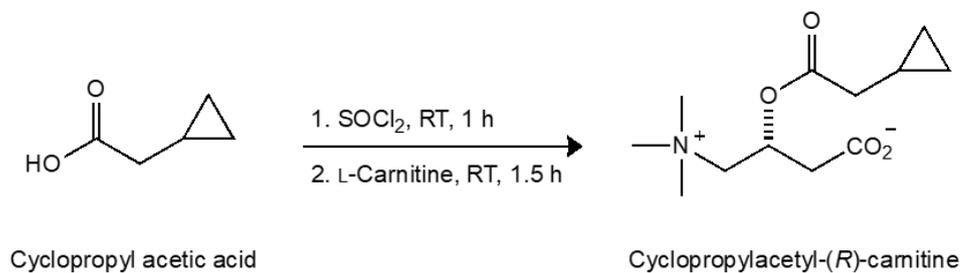
<b>標準溶液</b>	100 $\mu$ L (1.5 mL不活性処理済みガラス製バイアル)
	— ホウ酸緩衝液 300 $\mu$ L
	— APDS試薬溶液 100 $\mu$ L (20 mg/mLアセトニトリル溶液)
<b>加温</b>	55°C, 10 min (スクリューキャップで密閉)
	— 0.2%ギ酸含有60%メタノール溶液 500 $\mu$ L
<b>試験溶液</b>	



### Scheme 2 APDS 誘導体化の反応操作および反応式

APDS : 3-アミノピリジル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカーバメート

M : 分析対象化合物、APD-M : APDS 誘導体化物、NHS : *N*-ヒドロキシスクシンイミド



### Scheme 3 シクロプロピルアセチル- (*R*) -カルニチンの合成

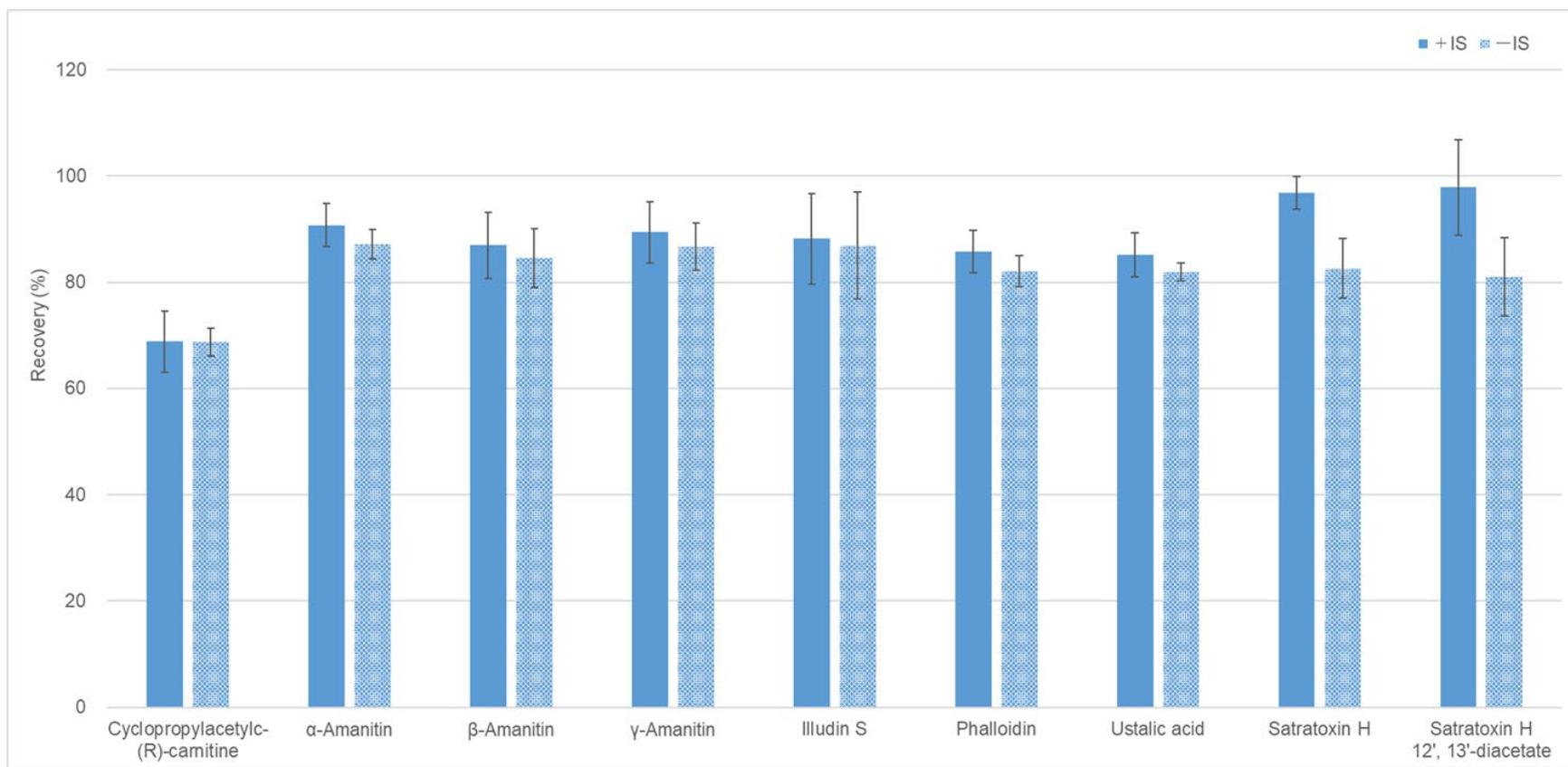


図5 低極性のキノコ毒の添加回収試験の結果（分析条件1）

左：内部標準補正あり、右：内部標準補正なし、 $n=5$ （サトラトキシシン H、サトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテート及びウスタル酸は  $n=3$ ）  
 添加濃度：2  $\mu\text{g/g}$ （イルジン S、 $\alpha$ -アマニチン、 $\beta$ -アマニチン、 $\gamma$ -アマニチン）、1  $\mu\text{g/g}$ （ファロイジン、サトラトキシシン H、サトラトキシシン H 12', 13'-ジアセテート）、0.5  $\mu\text{g/g}$ （ウスタル酸）

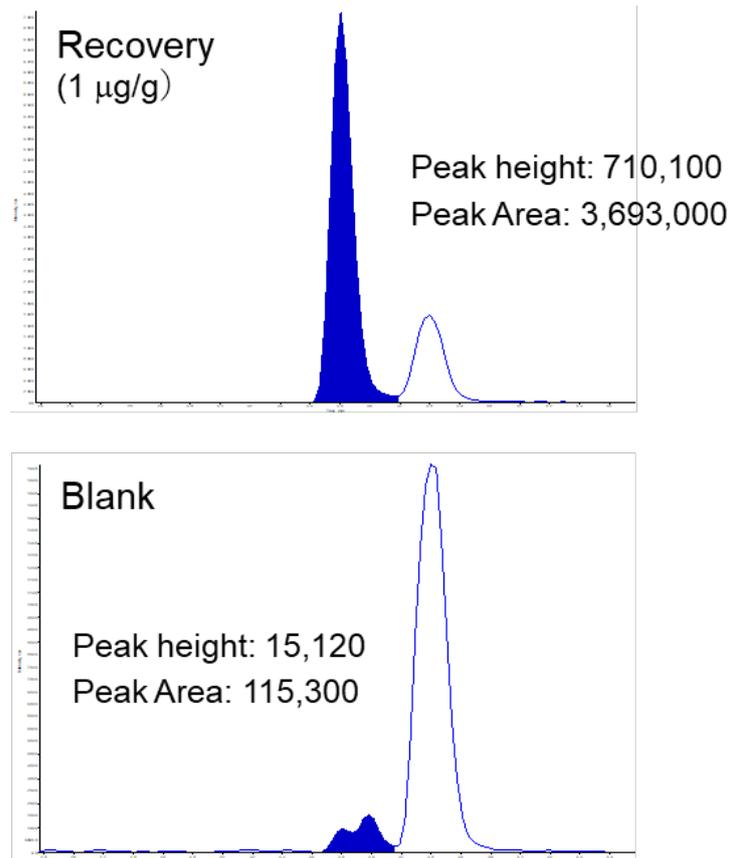


図6 シクロプロピルアセチル-(*R*)-カルニチンの添加回収試料とブランク試料のクロマトグラムの比較 (分析条件 1、測定トランジション : 244.3 > 85.1)

添加試料及びブランク試料 : シイタケ、添加濃度 : 1 µg/g

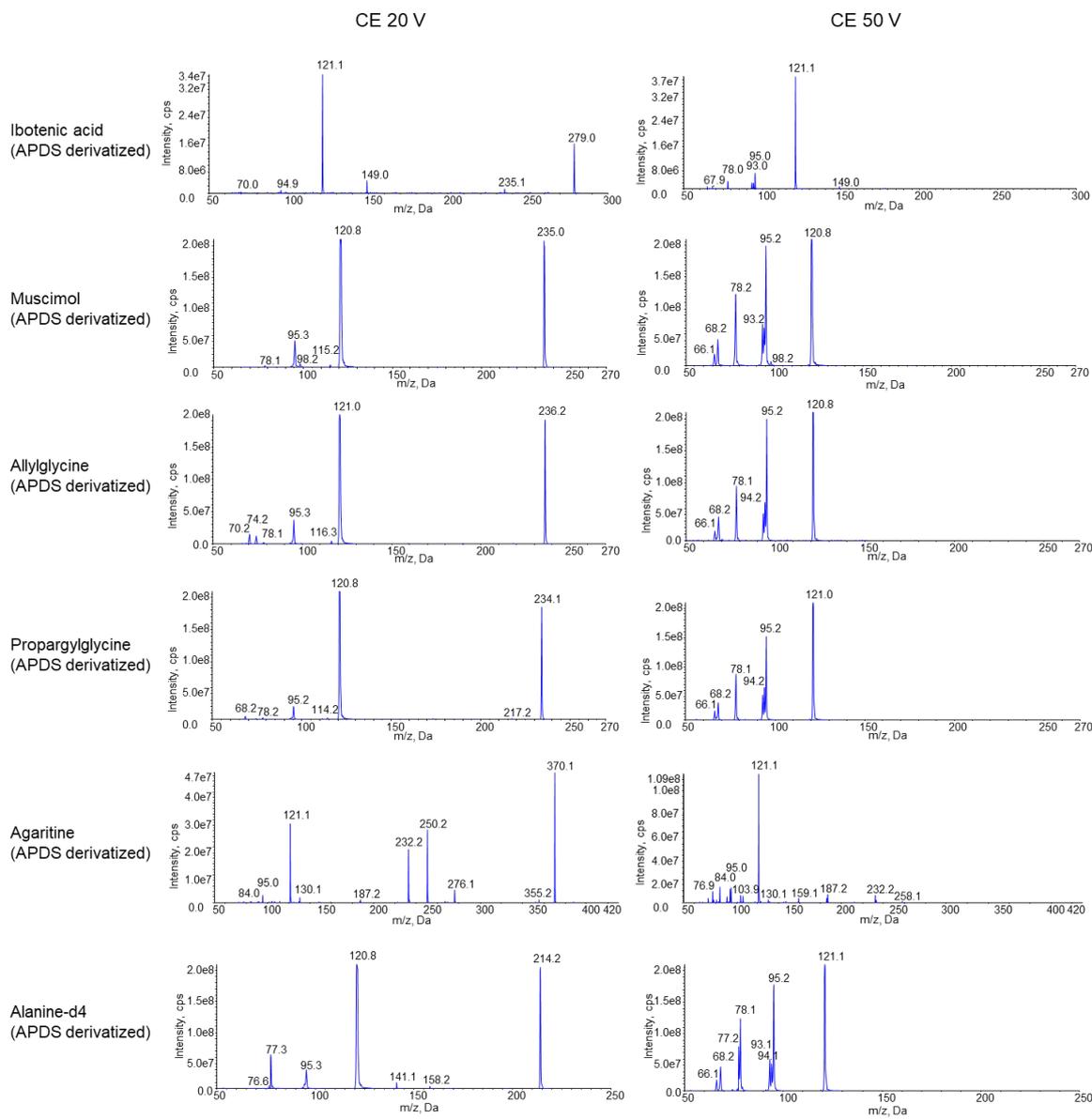


図7 APDS 誘導体化物のプロダクトイオンスペクトル  
 左列：CE 20 V、右列：CE 50 V

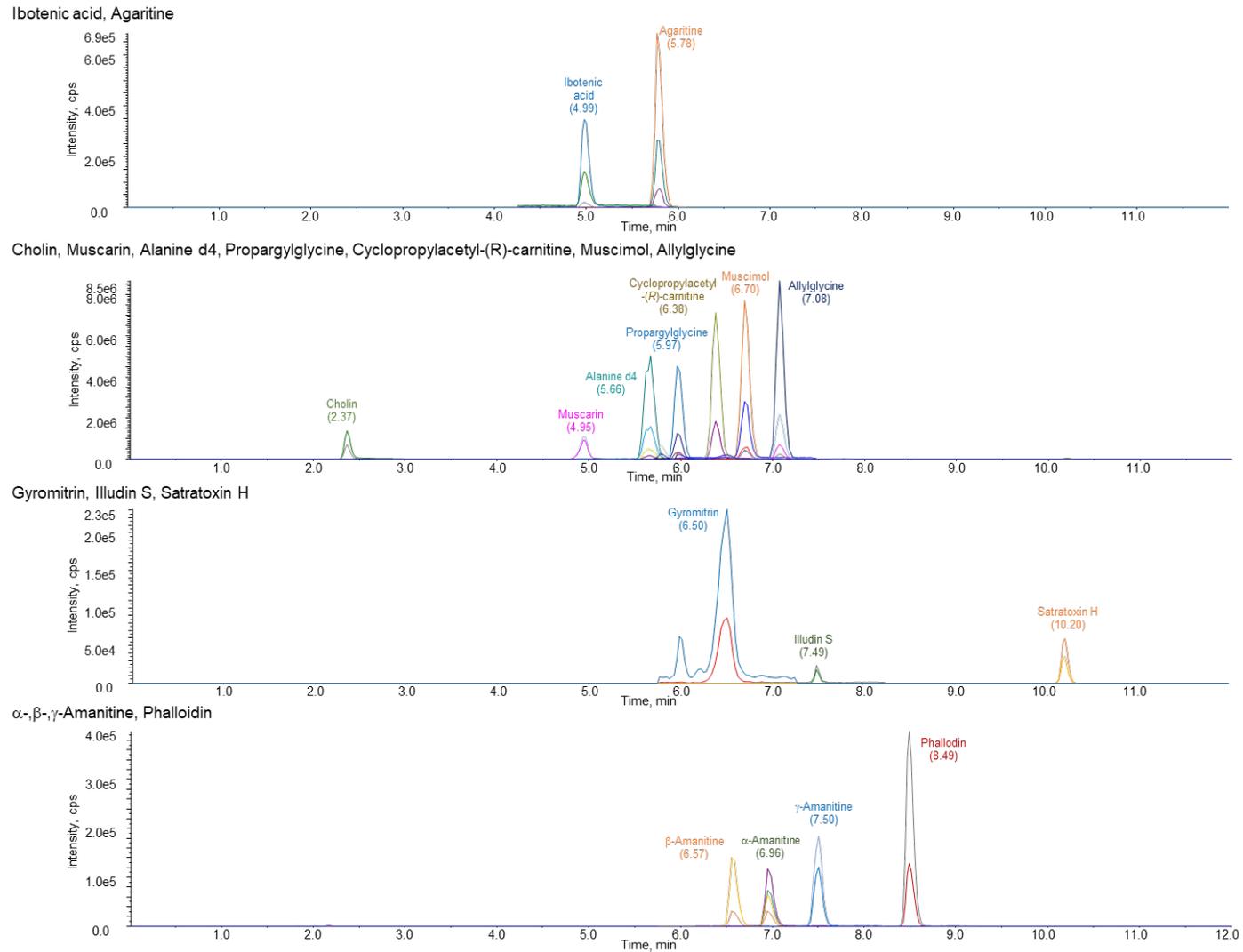


図8 LC/MS/MS のクロマトグラム (分析条件 2、100 ng/mL、APDS 誘導体化後)

表 5 分析条件 2 の検量線の相関係数、検出限界および定量限界

No.	Compound name	RT (min)	<i>R</i>	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
1	Cholin	2.4	0.9999	0.25	0.85
2	Muscarin	5.0	0.9988	0.15	0.52
3	Ibotenic acid	5.0	0.9999	0.53	1.78
IS1	Alanine-d4 (Internal Standard)	5.7	0.9998	0.10	0.33
4	Agaritin	5.8	0.9997	0.30	0.99
5	Propargylglycine	6.0	0.9996	0.17	0.58
6	Cyclopropylacetyl-( <i>R</i> )-carnitine	6.4	1.0000	0.14	0.48
7	Gyromitrin	6.5	0.9992	1.26	4.21
8	$\beta$ -Amanitine	6.6	0.9998	0.22	0.74
9	Muscimol	6.7	0.9997	0.14	0.46
10	$\alpha$ -Amanitine	7.0	1.0000	0.19	0.64
11	Allylglycine	7.1	0.9995	0.12	0.39
12	Illudin S	7.5	0.9986	0.82	2.74
13	$\gamma$ -Amanitine	7.5	0.9999	0.11	0.37
14	Phalloidin	8.5	0.9997	0.14	0.48
15	Satratoxin H	10.2	0.9998	0.13	0.42

\* *R*: Coefficient of correlation, LOD: Limit of detection, LOQ: Limit of quantitation

\*\* The range of calibration curve: 1-50 ng/mL

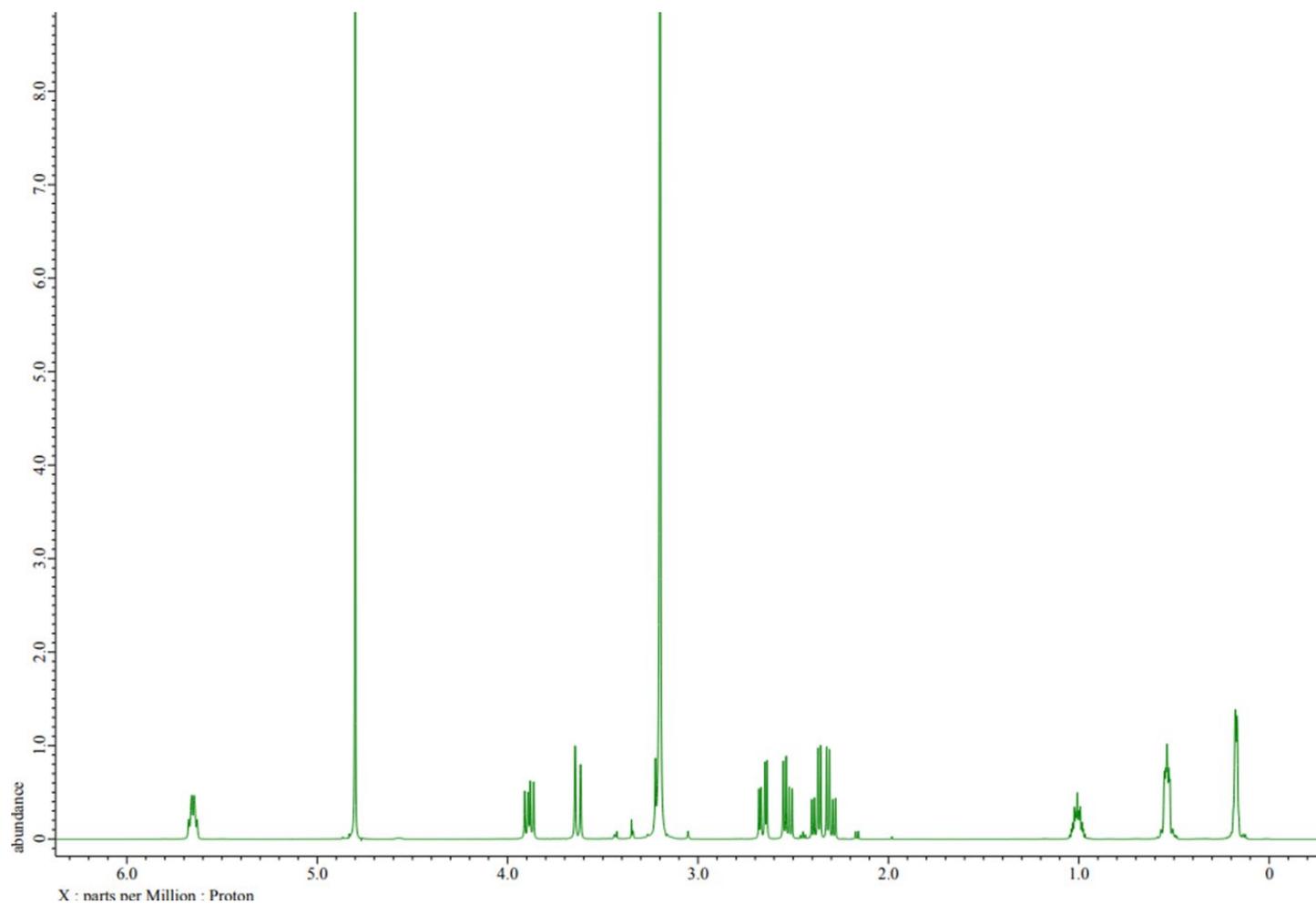


図 9 シクロプロピルアセチル-(*R*)-カルニチンの合成品の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (500 MHz、D<sub>2</sub>O、HOD = 4.8ppm (22°C))