

令和 5 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

自然毒等のリスク管理のための研究

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

有毒植物や有毒きのこ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、先の厚生労働科学研究（H30-食品-一般-008）において、国内の食中毒事例全般に対応することが可能な一斉分析法を構築した。

一方、有毒きのこに含まれる毒成分の有用な多成分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きのこや死亡事例が多いきのこに含まれる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研究を行ってきた。

令和 3-4 年度は、食中毒の発生件数や死亡事例が多い 5 きのこ群（ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエントケ、カキシメジ、ニセクロハツ）に含まれる低極性の毒成分（又は指標成分）を一斉分析する手法の開発を行い、6 機関による試験室間共同試験により妥当性確認を実施した（分析法 1）。

令和 5 年度は、高極性のアミノ酸やアミン類の毒成分を AQC 試薬によりプレカラム誘導体化し、四級アミンのムスカリンと同時に LC-MS/MS により分析する手法を開発した（分析法 2）。テングタケ等のきのこに含まれるイボテン酸やムシモール等の 4 成分は AQC 試薬により誘導体化し、アセタケ類やクサウラベニタケ等の多くの有毒きのこに含まれるムスカリンは誘導体化せずそのまま、両者を同時に逆相クロマトグラフィーで分析するため、LC-MS/MS の測定条件を最適化した。また、先の厚生労働科学研究において開発した有毒植物の一斉分析法について、有毒植物の実試料を添加した模擬調理試料を用い、試験室間共同試験を実施した。回収率、併行精度、室間精度及び HorRat 値の各パラメーターは、農林水産省の分析法の妥当性確認に関するガイドラインのクライテリアを概ね満足したことから、有毒植物の食中毒発生時に適用可能な汎用性の高い分析法であることが実証された。

研究協力者

友澤潤子	滋賀県衛生科学センター	山口瑞香	大阪健康安全基盤研究所
谷口 賢	名古屋市衛生研究所	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	吉岡直樹	兵庫県立健康科学研究所

原 有紀 三重県保健環境研究所
吉村英基 三重県保健環境研究所
林 克弘 三重県保健環境研究所
有沢拓也 富山県衛生研究所
堀井裕子 富山県衛生研究所
中山恵理子 富山県衛生研究所

土屋小百合 福井県衛生環境研究センター
木村亜莉沙 静岡市環境保健研究所
竹田正美 石川県保健環境センター
三野真輝 金沢市環境衛生試験所
海野明広 愛知県衛生研究所
茅原田 一 岐阜市衛生試験所

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、有毒植物や有毒きのこ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30年—令和4年の5年間の植物性自然毒による死者数は11名で、その内訳は有毒植物が9名(イヌサフラン7名、グロリオサ2名)、有毒きのこ2名(ニセクロハツと種類不明の野生きのこ各1名)となっている。また、令和5年はドクツルタケを原因として1名が亡くなっている。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一斉分析法を開発し、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、有毒きのこについては、対象とな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ことなどの理由により、未だに有効な一斉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きのこに含まれる毒成分(又は指標成分)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ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート型誘導体化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

一 (RPLC) により分離した上で、タンデム質量分析により定量する 2 つの分析法を開発することを目的とした。また、有毒植物の一斉分析法については、実際の食中毒事例を反映した高濃度の毒成分を含む模擬調理試料を用いて、試験室間共同試験により汎用性を検証することを目的とした。

令和 3-4 年度は、低極性のきのこ毒として、食中毒の発生件数や死亡事例が多い 4 きのこ群 (ツキヨタケ、ドクツルタケ、カエンタケ、カキシメジ) に含まれるきのこ毒 8 成分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 成分を対象とした分析法を開発した (分析法 1)。また、市販の標準試薬が入手可能であったきのこ毒 6 成分と、化学合成したニセクロハツの CPAC の 7 成分を対象として、6 機関の試験室間共同試験により分析法 1 の妥当性を確認した。

令和 5 年度は、カルバミン酸 6-アミノキノリル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジル (AQC) をプレカラム誘導体化試薬として、高極性のアミノ酸やアミン類の 4 成分を、アセタケ類やクサウラベニタケ等、多くの毒きのこに含まれるムスカリンと同時に分析する手法を開発した (分析法 2)。

また令和 5 年度は、有毒植物の毒成分一斉分析法については、国内での中毒事例が数多く報告されているチョウセンアサガオ類のアトロピン及びスコポラミンを対象として試験室間共同試験を実施した。チョウセンアサガオ類と同じ毒成分を含むハシリドコロを使用することにより、実際

の食中毒残品を反映した高濃度の毒成分を含む 2 種類の模擬調理試料 (きんぴらごぼう、ナスのミートソース) を調製して用いた。先の厚生労働科学研究 (H30-食品-一般-008) において開発した前処理法により定量を行った 10 機関の結果と、さらに LC-MS/MS の機種以外の分析条件まで同一であった 6 機関の結果を統計解析し、回収率 (%)、併行精度 (RSD_r %)、室間精度 (RSD_R %) 及び HorRat 値を求めて分析法の汎用性を検証した。

B. 研究方法

1. 有毒きのこの毒成分一斉分析法 2

1.1 試料

添加回収試験用に、シイタケ、ブナシメジ、ナメコ、ヒラタケ、マイタケ、エノキタケ及びツクリタケ (生、市販品) の 7 種のきのこを用いた。

1.2 試薬・試液

(+)-ムスカリン塩酸塩、イボテン酸は Sigma-Aldrich 社製の標準試薬を用いた。ムシモールは Tronto Research Chemicals 社製の標準試薬を用いた。L-プロパルギルグリシン及び L-アリルグリシンは Combi-Blocks 社製の標準試薬を用いた。内部標準は東京化成工業 (株) 製の *O*-Methyl-D-tyrosine (MTY) を用いた。それぞれ、メタノール・水 (1:1) 混液に溶解し 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製した。このうち、ムスカリン塩酸塩、イボテン酸、ムシモール、L-プロパルギルグリシン及び L-アリルグリシンの 5 つの標準原液を混合し、メタノール・水 (1:1) 混液で希釈し

て 10 µg/mL の 5 種きのこ毒混合標準溶液を調製した。

抽出に用いた 10%(w/v)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。標準溶液の希釈に用いた 2%TCA、80%メタノール溶液は、10%TCA 溶液 20 mL にメタノールを加えて 100 mL に定容して調製した。

精製カートリッジは、Agilent Technologies 社製の Captiva EMR-Lipid (3 mL、300 mg) を使用した。誘導体化に用いたほう酸緩衝液は、富士フィルム和光純薬 (株) 製の APDS タグワコー用ほう酸緩衝液を用いた。誘導体化試薬溶液は、Waters 社製の AccQ-Tag™ Ultra Derivatization Kit 付属のカルバミン酸 6-アミノキノリル-*N*-スクシイミジル (AQC) 3 mg を、同キット付属の脱水アセトニトリル 1 mL に溶解して、3 mg/mL の溶液を調製して用いた。

その他試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は LC-MS 用を用いた。

1.3 装置

ホモジナイザーは、(株) マイクロテック・ニチオン製のヒスコトロン NS-51 (ジェネレーターシャフト NS-10P (10.5 mm φ × 140 mm)) を用いた。アルミブロックヒーターは、Thermo Fisher Scientific 社製の Reacti-Thermo™ Heating Module を用いた。LC-MS/MS 装置は、Sciex 社製の Exion LC AD -5500+ QTRAP Activated を用いた。

1.4 LC-MS/MS 測定条件

きのこ毒 5 成分及び内部標準 1 成分の測定条件を表 1-1 及び 1-2 に示した。

1.5 試験溶液の調製

きのこの分析法 2 の試験溶液調製法の概略を、Scheme 1 に示した。

1.5.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL のポリプロピレン (PP) 製遠心沈殿管に量り採り、10 µg/mL の内部標準 (MTY) 溶液 0.5 mL を添加し、混和後 30 分間静置した。10%TCA 溶液 10 mL 及びメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、ホモジナイザーの刃をメタノールで洗い、さらにメタノールを PP 製遠心沈殿管の 35 mL の標線まで加えた。常温、2,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上清を 50 mL メスフラスコに採った。遠心沈殿管の残渣にメタノールを 15 mL 加えて混和後、常温、2,000×*g* で 5 分間遠心分離して、上清を採り、先のメスフラスコに合わせ、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

1.5.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管 (10-15 mL 容) にセットした Captiva EMR-Lipid カートリッジに負荷し、常温、1,000×*g* で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てた。このカートリッジを別の遠心沈殿管にセットして、さらに抽出液 1 mL を負荷し、溶出液を採取した。

1.5.3 誘導体化

2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルに、**B.1.5.2 精製** で得られた溶出液 100 µL を量り採り、ほう酸緩衝液 300 µL を加えて混和後、さらに AQC 試薬溶液 (3 mg/mL) 100 µL を加えて混

和した。スクリーキャップを閉めて密閉後、アルミブロックヒーターで 55°C、10 分間加熱した。室温に戻した後、水 500 μ L を入れて混和したものを試験溶液とした (0.01 g sample/mL)。

1.6 定量

検量線用標準溶液の調製のため、以下の溶液をまず調製した。

① 1 μ g/mL 5 種きのご毒混合標準溶液

(2%TCA、75%メタノール溶液)

10 μ g/mL 5 種きのご毒混合標準溶液 (50%メタノール溶液) 1 mL 及び 10%TCA 溶液 2 mL に、メタノールを加えて 10 mL に定容した。

② 0.1 μ g/mL 5 種きのご毒混合標準溶液

(2%TCA、80%メタノール溶液)

1 μ g/mL 5 種きのご毒混合標準溶液を 2%TCA、80%メタノール溶液で 10 倍希釈した。

③ 1 μ g/mL 内部標準 (MTY) 溶液

(2%TCA、80%メタノール溶液)

100 μ g/mL 内部標準 (MTY) 溶液 (50%メタノール溶液) を 2%TCA、80%メタノール溶液で 100 倍希釈した。

①、②及び③を混合し、2%TCA、80%メタノール溶液で希釈することにより、内部標準 (MTY) 100 ng/mL を含有する、0、10、20、50、100、200 ng/mL の 5 種きのご毒混合標準溶液を調製した。これらの 6 溶液 100 μ L を 2 mL の不活性処理済みガラス製スクリーバイアルに量り採り、**B.1.5.3 誘導体化**に従って誘導体化したものを検量線用標準溶液とした (0、1、2、5、10、20 ng/mL)。それぞれ 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、ムスカリン塩酸塩は絶

対検量線により、その他の 4 成分は内部標準との面積比を求めて検量線を作成して濃度を求めた。

1.7 イオン化及び SRM 条件の最適化

質量分析のイオン化は、エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI(+)) で行った。ムスカリンの SRM 条件の最適化は、標準原液をメタノール・水 (1:1) 混液により適宜希釈して、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。その他の成分は、プロダクトイオンスキャン測定を行い、共通して得られた m/z 171、116 のイオンについて、**B.1.6 定量**で調製した 10 ng/mL の誘導体化後の溶液を用い、以下の手順で最適化を行った。

① DP を 80 V に固定し、CE を 10-70 V まで 10 V 刻みで、SRM 測定。 (m/z 116 は 30-90 V)

② 面積値が最大となった CE を選択。

③ ②で選択した CE を固定し、DP を 30-110 V として SRM 測定。

④ 面積値が最大となった DP を選択。

なお、EP と CXP は 10 V に設定した。

1.8 添加回収試験

B.1.1 試料で示したきのご 5 g に、5 種きのご毒混合標準溶液 (10 μ g/mL) 及び内部標準 (MTY) 溶液 (10 μ g/mL) をそれぞれ 0.5 mL ずつ添加し、混和後 30 分間静置したものを添加試料とした (添加濃度 : 1 mg/kg)。各きのごで 3 回併行の添加回収試験を行い、**B.1.6 定量**で作成した検量線で定量した。同時にブランク試験溶液とマトリックス標準溶液 (試料中 1 mg/kg 相当) を調製し、定量を妨害するピ

ークの有無と測定におけるマトリックスの影響を評価した。

2. 有毒植物の模擬調理試料を用いた試験室間共同試験(アトロピン、スコポラミン)

2.1 試料

試験室間共同試験の模擬調理試料として、ハシリドコロの地下部を含むきんぴらごぼう(模擬試料①)とハシリドコロの地上部を含むナスのミートソース(模擬試料②)を調製した(調製方法は **B.2.7 模擬試料の調製**)。ハシリドコロは、2021年4月18日に岐阜県内の山林で採取後、-20℃以下で冷凍してあったものを使用した。また、きんぴらごぼうとナスのミートソースは以下のとおり調理して用いた。

① きんぴらごぼう：

(原材料)ゴボウ 700 g、ニンジン 300 g、いりごま 大さじ×2 (9 g×2)、ごま油 大さじ 3 (12 g×3)、しょうゆ 大さじ 5 (18 g×5)、砂糖 大さじ 4 (9 g×4)、みりん 大さじ 6 (18 g×6)

(調理法)ゴボウとニンジンは細切りにした。ゴボウは水に浸してあく抜きした。フライパンにごま油を入れ、水気を切ったゴボウを加えて炒め、色が変わってきたらニンジンも加えて炒めた。全体がしんなりしてきたら、調味料を加え、汁気がなくなるまで煮た後、いりごまを加えた。

② ナスのミートソース：

(原材料)ミートソース(N社のレトルト商品) 260 g×3袋、ナス 400 g、オリーブ油大さじ×3 (12 g×3)

(調理法)ナスを半月切りにした。フライパンにオリーブ油を入れ、ナスを炒めた後、ミートソースを入れて温めた。

2.2 試薬・試液

標準試薬は、富士フィルム和光純薬(株)製のアトロピン硫酸塩水和物及びスコポラミン臭化水素酸塩水和物を用いた。内部標準として、安定同位体標識化合物のスコポラミン-d3 臭化水素酸塩 (Tront Research Chemicals 社製)を用いた。塩と水和物の重量を換算した上で秤量し、メタノールに溶解して、アトロピン、スコポラミン、スコポラミン-d3 として 100 µg/mL の濃度になるように調製した。

10%(w/v)トリクロロ酢酸(TCA)は、ナカライテスク(株)製の特級試薬などを用いて調製した。精製カートリッジは、Agilent Technologies 社製の Captiva EMR-Lipid (3 mL, 300 mg)を用いた。

その他試験溶液の調製及び LC-MS/MS 測定に用いた有機溶媒は、市販の残留農薬試験用又は LC-MS 用を用いた。

2.3 装置

試験室間共同試験の模擬試料の調製は、Retsch 社製グラインドミックス GM200 及び(株)中部コーポレーション製フードプロセッサ PS-3000S を用いた。LC-MS/MS 測定の質量分析計は、いずれの機関もトリプル四重極型の装置を用いた。

2.4 LC-MS/MS 測定条件

機関 A の測定条件を表 2-1 及び 2-2 に示した。試験室間共同試験の各機関の測定条件を表 2-3 及び 2-4 に示した。

2.5 試験溶液の調製

有毒植物の試験溶液調製法の概略を、Scheme 2 に示した。

2.5.1 抽出

試料 5.0 g を 50 mL の PP 製遠心沈殿管に量り採り、10%TCA 溶液 10 mL 及びメタノール 10 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、ホモジナイザーの刃をメタノールで洗い、さらにメタノールを PP 製遠心沈殿管の 50 mL の標線まで加えた。転倒混和後、常温、 $2,000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上清をメスフラスコに採り、メタノールを加えて正確に 50 mL とした。

2.5.2 精製

抽出液を 2 mL 採り、遠心沈殿管 (10-15 mL 容) にセットした 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。このカートリッジを別のガラス製の遠心沈殿管 (10 mL 容) にセットして、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、水を加えて 10 mL に定容した (0.01 g sample/mL)。この溶液を 0.2% (w/v)TCA、8% (v/v)メタノールにより適宜希釈したものを試験溶液とした。バイアルは不活性処理済みのガラスバイアルを用いた。

2.6 定量

0.2%TCA、8%メタノール溶液で 1、2、5、10、20、50 ng/mL の標準溶液を調製し、それぞれ 5 μL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線を作成して濃度を求めた。内部標準法の場合は、別途 0.2%TCA、8%メタノール溶液で調製した 10 ng/mL のスコポラミン- d_3 内部標準溶液を、HPLC のオートサンプラーで 5 μL 共注入し、アトロピン、スコポラミンと内部標準との面積比を求めて検量線を作成して濃度を求めた。

2.7 模擬試料の調製

模擬試料①：

ハシリドコロの地下部 (地下茎と根) を凍結後、ドライアイス存在下フードプロセッサーを用いて凍結粉碎し、アトロピンとスコポラミンの含有量を **B.2.5 試験溶液の調製** に従い抽出・精製し、LC-MS/MS により測定した (アトロピン: 245 mg/kg、スコポラミン: 7.0 mg/kg)。これを 300 g 量り採り、別途粉碎したきんぴらごぼう 435 g と混和した後、上記と同様に凍結粉碎したものを均一化試料とした。

模擬試料②：

上記のハシリドコロの地上部 (葉と茎) を凍結後、フードプロセッサーで粉碎し、アトロピンとスコポラミンの含有量を **B.2.5 試験溶液の調製** に従い抽出・精製し、LC-MS/MS により測定した (アトロピン: 225 mg/kg、スコポラミン: 27.6 mg/kg)。これを 200 g 量り採り、別途粉碎したナスのミートソース 700 g と混和した後、常温でフードプロセッサーを用いて粉碎したものを均一化試料とした。

2.8 標準添加法による模擬試料の値付け

あらかじめ絶対検量線法により求められた模擬試料中のアトロピンとスコポラミンの濃度 ($x\text{ mg/kg}$) をもとに、試料中の添加濃度が 0、 $0.5x$ 、 x 、 $1.5x$ 、 $2x$ 、 $2.5x$ 、 $3x$ と 7 濃度になるようにアトロピンとスコポラミンを模擬試料に添加した。**B.2.5 試験溶液の調製** に従い抽出・精製し、LC-MS/MS により分析した。毒成分の添加量に対するピーク面積をプロットしたデータを最小二乗法により直線回帰し、その x 切片から抽出液中の毒成分の濃度を求め

た。また、x 切片の標準偏差に係数として 2.571 を乗じることにより、95%信頼限界を求めて不確かさとした。

2.9 均一性試験、安定性試験

模擬試料①及び②をそれぞれ 25 g ずつ量り採り、24 個のポリエチレン製容器に取り分けた。このうち 6 個の容器をランダムに選択し、1 容器につき 2 本ずつ分析用試料を定量した。Thompson らの報告¹⁾に従い、ANOVA により求めた容器間の標準偏差 s_s と Horwitz の式から求めた σ_p をもとに均一性を評価した。

機関 A において、実施期間（令和 5 年 10 月 2 日～12 月 28 日）の前後において、模擬試料①及び②のアトロピン、スコポラミンを 2 併行で定量し、模擬試料に含まれる測定対象化合物の実施期間中の安定性を評価した。

2.10 ブランク試験

機関 A において、模擬試料①の調製に用いたきんぴらごぼうと模擬試料②の調製に用いたナスのミートソースを、**B.2.5 試験溶液の調製**により抽出・精製し、LC-MS/MS により分析して、妨害ピークの有無を確かめた。

2.11 試験室間共同試験

実施期間は令和 5 年 10 月 2 日～12 月 28 日の約 3 か月間とした。10 月 2 日に模擬試料①及び②を 10 機関に配布して、12 月 28 日までにアトロピンとスコポラミンを 2 併行で定量したデータを収集した。前処理操作フローが同一であった 10 機関と、さらに LC-MS/MS の機種以外の分析条件まで同一の 6 機関のデータについて、Cochran 検定と Grubbs 検定により外れ

値を棄却した上で、回収率 (%)、併行精度 ($RSD_r\%$) 及び室間精度 ($RSD_R\%$) を求めた。回収率は **B.2.8 標準添加法による模擬試料の値付け**で求めた真の値の推定値に対する定量値の平均値の百分率とした。HorRat 値は室間精度 ($RSD_R\%$) と Horwitz の式から予測される室間精度の ($PRSD_R\%$) の比とした。これらの 4 つのパラメーターを **B.2.10 ブランク試験**により求めた選択性ととも、農林水産省の分析法の妥当性確認に関するガイドライン²⁾（以下、農水省のガイドライン）に従って評価した。

LC-MS/MS の機種以外の分析条件が同一であった 6 機関のうち 3 機関は、内部標準補正を行った結果についても報告があったため、内部標準補正の有無による定量値の比較も行った。

C. D. 研究結果及び考察

1. 有毒きのこの毒成分一斉分析法 2

1.1 LC-MS/MS 測定条件の最適化

1.1.1 分離条件

四級アミンのムスカリンと AQC 誘導体化合物 4 成分を同時に分析するため、分析カラムは高極性の成分の保持に優れた Phenomenex 社の Luna Omega Polar C18 を選択した。標準溶液のクロマトグラムにおいて、ムスカリンとその他の AQC 誘導体化合物のピーク形状は良好であった（図 1）。

各種きのこの添加回収試験のクロマトグラムにおいて、イボテン酸、ムシモール、プロパルギルグリシンの 3 成分は、いずれのきのこにおいても夾雑ピークのパター

ンが類似していた。夾雑成分は測定対象の 3 成分に近接しており、定量を妨害するおそれがあったため、分離度が 1.5 以上になるようにグラジエント条件を最適化した (表 1-1 及び図 2)。

1.1.2 質量分析条件

各 AQC 試薬誘導体化物のプロダクトイオンスキャンの結果、誘導体化試薬由来の m/z 171、116 のイオンが共通して検出された。これらのプロダクトイオンについて、

B.1.7 イオン化及び SRM 条件の最適化に示した手順を実行した結果、いずれの誘導体化物も DP は 90 V となり、CE は m/z 171 で 30 V、 m/z 116 で 70 V となった。通常トリプル四重極の MS/MS 測定においては、SRM 条件を測定対象化合物ごとに最適化する必要があるが、本分析法においては、共通するプロダクトイオンで同一のパラメーターを設定できたため、他の機関に導入する際の条件設定の労力を大幅に削減することが可能である。

1.1.3 機器分析の測定感度

測定対象とした 5 成分の検量線を図 3 に示した。相関係数 (r) はいずれの化合物も 0.995 以上となり、直線性は良好であった。

検出限界付近の測定対象化合物を繰り返し測定して、その標準偏差と検量線の傾きから機器の定量限界を求めたところ、ムスカリンは 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、イボテン酸は 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ムシモール、プロパルギルグリシン及びア ril グリシンは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となり、十分な測定感度を有していることが確認できた。

1.2 試験溶液の調製

試験溶液の調製においては、AQC 誘導体化物の安定性を確認した上で、テングタケ (*Amanita pantherina*) を用いて、イボテン酸とムシモールを定量することにより、AQC 試薬濃度の最適化、抽出回数 of 検討、除タンパクに用いた TCA の有無による誘導体化効率の検証などを行い、Scheme 1 の前処理操作フローを構築した。

1.3 内部標準の選択

本分析法は、抽出・精製・誘導体化及び LC-MS/MS 測定と定量に影響を及ぼす要因が数多くあるため、適切な内部標準を選択した上で、補正を行うことが重要となる。

当初、安定同位体標識されたアミノ酸類を内部標準として検討したが、シイタケを用いた添加回収試験において、回収率の低下や回収率の変動が見られた。この原因として、シイタケに多量に含まれるアミノ酸が影響している可能性が考えられた。

安定同位体標識されたアミノ酸は確かに天然には存在しないが、非標識体のアミノ酸がきのこに多量に含まれている場合、これらも AQC 試薬により誘導体化され、LC-MS/MS 測定において同じ保持時間に出現し、強いイオン化抑制を引き起こす原因となると考えられた。そのため、特にきのこを試料とする際は、多量に含まれるアミノ酸の安定同位体標識体を用いると、その非標識体の影響により、強いイオン化抑制を受けて回収率が低下あるいは変動すると考えられた。

今回内部標準として採用した *O*-Methyl-D-tyrosine (MTY) は、非天然型のアミノ酸であること、クロマトグラムで保持時間が大きく、他のアミノ酸とピーク

が重ならないという 2 つの理由で採用した。試料前処理の最初に加えて、誘導体化まで含めた前処理操作における回収率の変動を補正することができるほか、クロマトグラフィーにおける保持時間の変動の指標ともなるため有効であった。

1.4 添加回収試験

7 種の市販きのこを用いた添加回収試験（添加濃度：1 mg/kg、n=3）の結果を表 3-1 に示した。ブナシメジのイボテン酸、エノキタケのムシモール、ツクリタケのムシモール及びアシルグリシンを除き、70-120%の範囲内であった。全てのきのこ毒成分で回収率は 50-150%の範囲内であり、相対標準偏差は 5%以内であったことから、きのこ中に 1 mg/kg の濃度で含まれる毒成分を誤りなく識別することが可能であった。

回収率低下の要因を検証するため、誘導体化直後のブランク試料の溶液に、100 ng/mL の誘導体化溶媒標準溶液を 100 μ L 加えて、10 ng/mL のマトリックス標準溶液を調製して定量した（表 3-2）。マトリックス標準の溶媒標準に対する比は、回収率と同様の値となったことから、回収率低下の要因は主に LC-MS/MS 測定におけるイオン化抑制であることが分かった。ツクリタケのアシルグリシンについては、マトリックス標準の溶媒標準に対する比が 81.7%であったのに対して、回収率は 54.4%となった。LC-MS/MS 測定以外にも回収率低下の要因があると考えられたが、原因は特定できなかった。

2. 有毒植物の模擬調理試料を用いた試験室間共同試験（アトロピン、スコポラミン）

2.1 試験に用いた模擬試料

チョウセンアサガオ類（キダチチョウセンアサガオ類を含む）はナス科の植物で、観賞用として栽培されることも多く、葉は食用のモロヘイヤ、つぼみや未成熟果はオクラ、種子はゴマ、根はゴボウと間違われやすいため、一年を通して食中毒が報告されている。その中でも、わが国で食中毒の頻度が最も多いのは、家庭の庭で栽培していたチョウセンアサガオ類の根をゴボウと誤認して発生する「きんぴらごぼう」を原因とする事例である。また、特殊な事例としては、チョウセンアサガオに接木したナスを用いた「ミートソース」を喫食した事例も報告されている。今回、これらの事例を参考に、きんぴらごぼうをマトリックスとする模擬試料①と、ナスのミートソースをマトリックスとする模擬試料②を調製して試験室間共同試験を実施した。

過去のチョウセンアサガオ類の食中毒事例において、残品から検出されるアトロピン及びスコポラミンの濃度は数 10～数 100 mg/kg に達することもあるが、この濃度を反映した模擬試料を、標準試薬の添加によって調製するには莫大な費用がかかる。そこで今回は、アトロピン、スコポラミンを多量に含むハシリドコロを使用して模擬試料を調製した（B.2.7 模擬試料の調製）。

有毒植物の実試料を用いたことで、模擬試料の値付けが問題となった。今回は模擬試料に含まれるアトロピンとスコポラミンの含有量を、標準添加法により不確かさとともに推定する方法で値付けを行った（B.2.8 標準添加法による模擬試料の値

付け)。その結果、模擬試料①のアトロピンは 107 ± 13 mg/kg、スコポラミンは 2.76 ± 0.38 mg/kg となった。模擬試料②のアトロピンは 58.7 ± 11.4 mg/kg、スコポラミンは 6.27 ± 0.77 mg/kg となった。妥当性確認のパラメーターである回収率は、これらの値に対する定量値の百分率を算出することで求めた。

2.2 模擬試料の均一性と安定性

模擬試料①、②に含まれる、アトロピン、スコポラミンの容器間の標準偏差 s_s を ANOVA により算出し、**C. D. 2.1 試験に用いた模擬試料**で求めた各試料の真値の推定値を、Horwitz の式に代入して σ_p を算出して比較した。いずれの試料も、アトロピン、スコポラミンの両方で $s_s < 0.3 \sigma_p$ となり、十分に均一であることが確かめられた。

安定性試験の結果、模擬試料①の実施期間前後の比は、アトロピンが 91.2%、スコポラミンが 96.2% となった。同様に模擬試料②の比は、アトロピンが 94.6%、スコポラミンが 101.1% となった。模擬試料①、②ともに、アトロピンで実施期間中に値が下がる傾向が見られたため、以降の考察においてその影響を加味することとした。

2.3 有毒植物毒成分の妥当性確認

機関 A において実施したブランク試験は、模擬試料①、②ともに、アトロピン、スコポラミンのクロマトグラムに定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった。

2.3.1 10 機関による試験室間共同試験

前処理操作フローが同一であった 10 機関の LC-MS/MS 測定条件を表 2-3 に示し

た。使用した LC-MS/MS はメーカーやスペックが異なり、イオン化や測定感度に大きな違いがあると推測された。分析カラムは、いずれの機関も C18 のカラムを使用しているが、メーカーや長さ、粒子径などに違いが見られる。移動相については、A 液の添加剤にギ酸アンモニウムではなく酢酸アンモニウム、B 液にアセトニトリルではなくメタノールを使用した機関（機関 G）や UPLC カラムを使用してグラジエント条件を変更した機関（機関 C）があった。

10機関による試験室間共同試験の結果を表4-1及び表4-2に示した。Cochran検定とGrubbs検定による外れ値検定で棄却されたデータはなかった。回収率は2つの模擬試料において、アトロピン、スコポラミンともに80%以上となった。併行精度、室間精度は農水省のガイドラインに適合していた。HorRat値も全て2以下となった。

模擬試料①のアトロピンは83.2%で、農水省のガイドラインのクライテリア 90%を下回った。安定性試験で見られたアトロピンの減少の影響とも考えられるが、模擬試料②のアトロピンの回収率の結果と比較して6.1%低くなったことから、ゴボウとハシリドコロの根茎からの抽出効率が低いことが影響した可能性が考えられた。

その他、併行精度、室間精度ともに農水省のガイドラインに適合していた。ただし、模擬試料①のアトロピンのHorRat値は1.6となり、分析法の再現性はあるものの、分析値のばらつきは通常予想され

るより大きい結果となった²⁾。

以上、前処理操作フローが同一であった10機関の結果は、模擬試料①のアトロピンの回収率がやや小さく、HorRat値がやや大きい結果となったが、その他の結果は良好で、本分析法の前処理操作の汎用性が示唆される結果となった。

2.3.2 6 機関による試験室間共同試験

LC-MS/MS の機種以外の分析条件まで同一の6機関のLC-MS/MS測定条件を表2-4に示した。使用したLC-MS/MSはメーカーやスペックが異なるものの、分析カラムは、参考法として示したRestek社製のRaptor C18, 2.1×150 mm, 2.7 μmを用い、移動相、グラジエント条件とも同じであったことから、各機関のクロマトグラフィーにおける分離は同等であると考えられた。

6機関による試験室間共同試験の結果を表5-1及び表5-2に示した。Cochran検定とGrubbs検定による外れ値検定で棄却されたデータはなかった。回収率は2つの模擬試料において、アトロピン、スコポラミンともに80%以上となった。併行精度、室間精度は農水省のガイドラインに適合していた。また、HorRat値も全て2以下となった。

模擬試料①のアトロピンの回収率は88.0%となり、農水省のガイドラインのクライテリア90%をわずかに下回った。一方で、別途実施した模擬試料①のブランク試料への添加回収率(添加濃度:10 mg/kg)やマトリックス標準溶液(試料中10 mg/kg相当)の溶媒標準に対する比は、それぞれ97.9%、99.4%と良好であった。

この結果についても、10機関の試験室間共同試験の結果と同様に、安定性試験で見られたアトロピンの減少の影響とも考えられたが、模擬試料②のアトロピンの回収率の結果と比較して5.2%低かったことから、抽出時の損失が原因と考えられた。

本分析法は、食中毒時に適用可能な分析法として迅速性を重視し、あえて1回のみの抽出としているため、ゴボウやハシリドコロの根茎など、水分が少なく抽出が難しい実試料においては、抽出率が低下する可能性がある。そのため、試料の性状によっては、Scheme 1に示す有毒きのこの分析法2の抽出法を参考に、2回抽出を行うことで成分の回収率を向上させることが必要となるかもしれない。しかし今回の結果から、本分析法は食中毒の対応には十分な真度と精度を有する汎用性の高い分析法であることが示された。

2.3.3 3 機関による試験室間共同試験

本分析法は、内部標準補正を行わなくても、絶対検量線で良好な結果が得られるが、分析法の品質を保証する観点から適切な内部標準が求められていた。

今回、3機関のデータについて内部標準補正の有無による定量値の比較を行ったところ、スコポラミン-d3をLC-MS/MS測定時の内部標準として用いて補正した定量値は、アトロピン、スコポラミンともに内部標準補正なしの結果と比較して差はなかった(表6-1及び6-2)。以前検討したカフェイン-d9は、繰り返し測定の標準偏差が大きく、内部標準補正した測定対象化合物の定量値もばらつくという欠点があったが、今回用いたスコポラミン-d3は、

繰り返し測定の標準偏差も小さく、一斉分析の他の成分の内部標準としても使用可能であることが示唆された。

スコポラミン-d3 のプロダクトイオンは最も測定感度が高い m/z 141 ではなく m/z 159 を選択した。 m/z 141 を用いると、ハシリドコロの地下部を定量すると、夾雑成分の影響を受けて内部標準のピーク面積が 20%ほど大きくなり、結果として内部標準補正した定量値が 20%ほど低くなったため m/z 159 を選択した。

E. 結論

AQC プレカラム誘導体化 LC-MS/MS 法による有毒きのこの毒成分一斉分析法 2 により、7 種の市販きのこを用いて、高極性のきのこ毒 5 成分の 1 mg/kg の濃度における添加回収試験を行った結果、回収率は 50-150%の範囲内、相対標準偏差は 5%以内であった。本分析法は 1 mg/kg の毒成分を誤りなく識別することが可能な分析法であることが確かめられた。また本分析法は、LC-MS/MS の SRM 条件の設定が容易な上、市販の誘導体化試薬を用いているため汎用性が高い。今後、添加回収試験による妥当性確認を行った上で、クサウラベニタケやテングタケを用いた模擬試料を調製して試験室間共同試験を実施することで分析法の汎用性を検証する予定である。

有毒植物の実試料としてハシリドコロを用い、きんぴらごぼうとナスのミートソースの 2 つの模擬調理試料を調製して、試験室間共同試験による有毒植物の毒成分一斉分析法の妥当性確認を行った。前処理

操作フローが同一であった 10 機関と、さらに LC-MS/MS の機種以外の分析条件まで同一の 6 機関の結果は、2 つの模擬試料のアトロピン、スコポラミンともに回収率が 80%以上と良好な結果となった。併行精度及び室間精度は農水省のガイドラインに適合していた。HorRat 値も全て 2 以下となり、分析法の再現性が実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 南谷臣昭、谷口賢、友澤潤子、太田康介、高橋正幸、登田美桜：LC-MS/MS による有毒植物の毒成分一斉分析法、第 119 回日本食品衛生学会学術講演会、東京都、2023 年 10 月

3. 行政関係者向け説明会

- 1) 竹内浩、友澤潤子、野村千枝、山口瑞香、南谷臣昭、岩附綾子、谷口賢、吉岡直樹、吉村英基、阿部尚仁、鈴木敏之、登田美桜：わが国の主な有毒キノコの多成分分析法（第 2 報）、第 60 回全国衛生化学技術協議会年会、福島市、2023 年 11 月
- 2) 南谷臣昭、遠藤利加：食中毒残品を想定した模擬調理試料中のアトロピン、スコポラミンの定量、令和 5 年度地方衛生研究所全国協議会東海・北陸支部衛生化学部会、金沢市、2024 年 2 月

4. 市民向け発表会

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

H. 参考文献

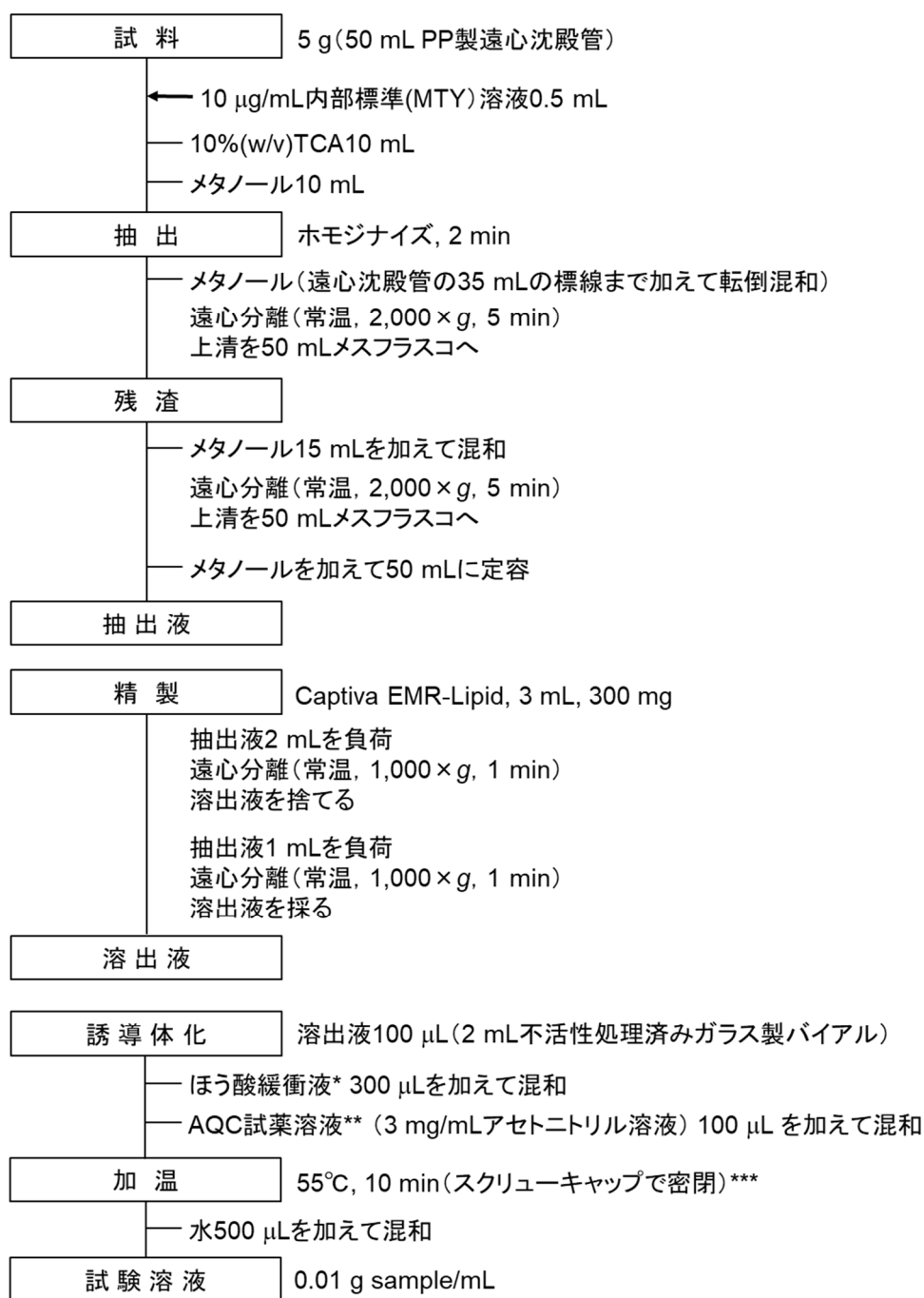
- 1) Thompson, M. and Wood, R. *J. AOAC Int.* 76, 924-940 (1993)
- 2) 分析法の妥当性確認に関するガイドライン、農林水産省、令和元年10月

表 1-1 きのご毒の LC-MS/MS 測定条件 (分析条件 2)

LC	Exion LC AD (Sciex)	
MS/MS	Triple Quad 5500+ · QTRAP Activated (Sciex)	
Column	Luna Omega Polar C18 (2.1×150 mm, 1.6 μm) (Phenomenex)	
Mobile phase	Solvent A	0.1% Formic acid
	Solvent B	0.1% Formic acid in acetonitrile
Gradient method	% of solvent B	2%(0 min)→10%(1 min) →30%(11 min)→95%(11.1-13 min) →2%(13.1-18 min)
Flow rate (mL/min)	0.4	
Column temperature (°C)	35	
Injection volume (μL)	5	
Parameter \ Porarity	ESI(+)	
Curtain gas (psi)	30	
Collision gas (psi)	9	
Ion Spray Voltage(V)	5000	
Temperature (°C)	600	
Ion Source Gas1 (psi)	60	
Ion Source Gas2 (psi)	60	

表 1-2 きのご毒の SRM トランジション (分析条件 2)

No.	Compound name	RT (min)	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	Muscarin	2.2	174	57	51	31	6
			174	43	51	49	10
2	Ibotenic acid	3.4	329	171	90	30	10
			329	116	90	70	10
3	Muscimol	4.1	285	171	90	30	10
			285	116	90	70	10
4	Propargylglycine	4.9	284	171	90	30	10
			284	116	90	70	10
5	Allylglycine	5.8	286	171	90	30	10
			286	116	90	70	10
IS	MTY (Internal standard)	9.2	366.1	171	90	30	10
			366.1	116	90	70	10



*APDSタグワコー用ほう酸緩衝液(富士フィルム和光純薬, 019-23151)を使用

**AccQ・Tag™ Ultra Derivatization Kit (Waters, Part#. 186003836)を使用

AccQTag™ Ultra-2A (Reagent powder, 3 mg)にAccQTag™ Ultra-2B アセトニトリル100%を1 mL入れて1分間超音波で溶解

***バイアルをアルミブロックに入れて加熱

Scheme 1 有毒きのこの毒成分一斉分析法 2 前処理操作フロー

表 2-1 有毒植物の LC-MS/MS 測定条件 (機関 A)

LC		Exion LC AD (Sciex)
MS/MS		Triple Quad 5500+ · QTRAP Activated (Sciex)
Column		Raptor C18 (2.1×150 mm, 2.7 μm) (Restek)
Mobile phase	Solvent A	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid
	Solvent B	Acetonitrile
Gradient method	% of solvent B	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)
Flow rate (mL/min)		0.3
Column temperature (°C)		40
Injection volume (μL)		5
Parameter\Porarity		ESI(+)
Curtain gas (psi)		30
Collission gas (psi)		9
Ion Spray Voltage(V)		5000
Temperature (°C)		300
Ion Source Gas1 (psi)		60
Ion Source Gas2 (psi)		60

表 2-2 有毒植物 (トロパンアルカロイド) の SRM トランジション条件 (機関 A)

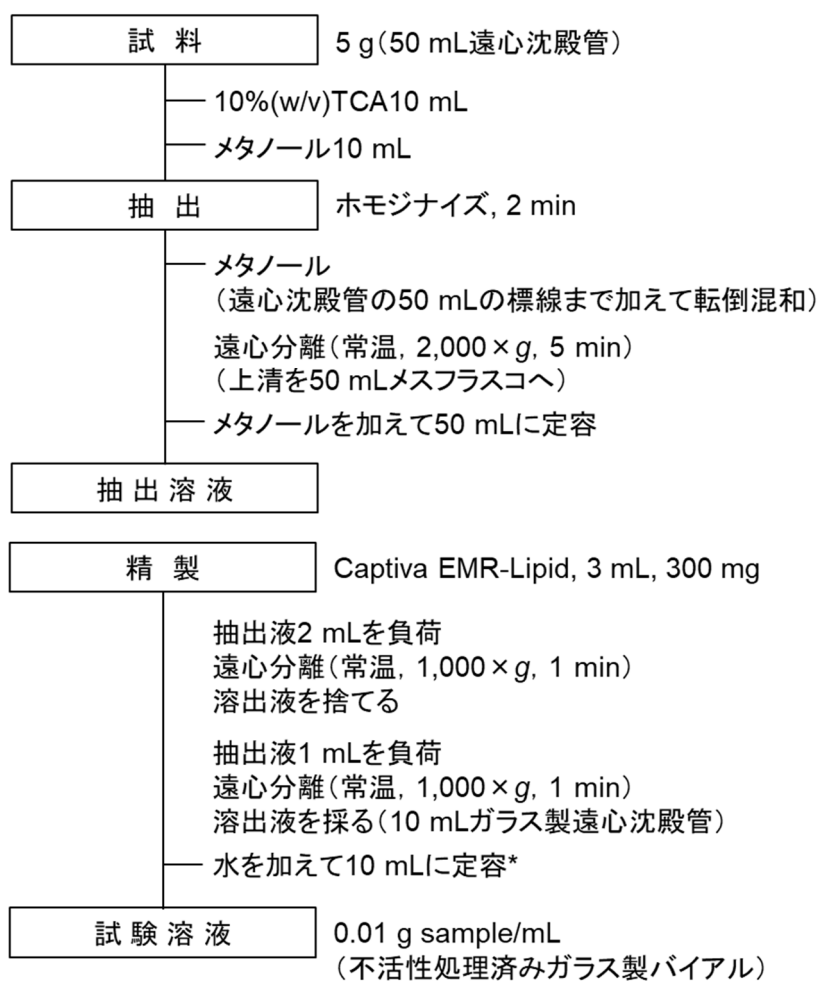
No.	Compound name	RT (min)	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	Scopolamine	3.4	304.0	138.0	87	26	10
			304.0	156.0	87	21	10
2	Atropine	3.9	290.2	124.2	110	30	5
			290.2	93.0	110	35	7
IS	Scopolamine-d3 (Internal standard)	3.4	307.2	159.1	94	23	14

表 2-3 10 機関による試験室間共同試験の LC-MS/MS 測定条件

Laboratory		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
LC	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Agilent	Shimadzu	Waters	Waters	Agilent	Shimadzu	Sciex	Shimadzu
	Instrument	Exion LC AD	Nexera X2	1260 Infinity II	Prominence 20A	ACQUITY UPLC H-Class	ACQUITY UPLC H-Class	1260 Infinity	LC-40D XR	Exion LC AD	Prominence 20A
MS/MS	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Agilent	Sciex	Waters	Waters	Agilent	Shimadzu	Sciex	Sciex
	Instrument	Triple Quad 5500+	8050	6470 Triple Quad	3200QTRAP	Xevo TQ-XS	Xevo TQ-S micro	6460 Triple Quad	8045	Triple Quad 5500+	3200QTRAP
Column		Raptor C18	Raptor C18	ZORBAX Eclipse Plus C18	Raptor C18	Inertsil ODS-3	Raptor C18	Poroshell 120 EC-C18	Shim-pack Arata C18	Raptor C18	Raptor C18
		2.1×150 mm, 2.7 μm	2.1×150 mm, 2.7 μm	2.1×100 mm, 1.8 μm	2.1×150 mm, 2.7 μm	2.1×100 mm, 3 μm	2.1×150 mm, 2.7 μm	2.1×100 mm, 2.2 μm	2.0×100 mm, 2.2 μm	2.1×150 mm, 2.7 μm	2.1×150 mm, 2.7 μm
Mobile phase	Solvent A	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium acetate solution containing 0.1% formic acid	10 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid
	Solvent B	Acetonitrile	Acetonitrile	Acetonitrile	Acetonitrile	Acetonitrile	Acetonitrile	Methanol	1% Formic acid in acetonitrile	Acetonitrile	Acetonitrile
Gradient method	% of solvent B	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	5%(0 min)→90%(10 min, 3 min hold) →5%(15 min) →5%(25 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→60%(5 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)
Flow rate (mL/min)		0.3									
Column temperature (°C)		40									
Injection volume (μL)		5									
Precursor ion (m/z)	Atropine	290									
	Scopolamine	304									
Quantifier ion (m/z)	Atropine	124									
	Scopolamine	138									

表 2-4 6 機関による試験室間共同試験の LC-MS/MS 測定条件

Laboratory		A	B	D	F	I	J
LC	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Shimadzu	Waters	Sciex	Shimadzu
	Instrument	Exion LC AD	Nexera X2	Prominence 20A	ACQUITY UPLC H-Class	Exion LC AD	Prominence 20A
MS/MS	Manufacturer	Sciex	Shimadzu	Sciex	Waters	Sciex	Sciex
	Instrument	Triple Quad 5500+	8050	3200QTRAP	Xevo TQ-S micro	Triple Quad 5500+	3200QTRAP
Column		Raptor C18					
		2.1×150 mm, 2.7 μm					
Mobile phase	Solvent A	5 mM aqueous ammonium formate solution containing 0.1% formic acid					
	Solvent B	Acetonitrile					
Gradient method	% of solvent B	2%(0 min)→90%(11 min, 1 min hold) →2%(12.1 min) →2%(20 min)					
Flow rate (mL/min)		0.3					
Column temperature (°C)		40					
Injection volume (μL)		5					
Precursor ion (m/z)	Atropine	290					
	Scopolamine	304					
Quantifier ion (m/z)	Atropine	124					
	Scopolamine	138					



* 内部標準を入れる場合は 10 ng/mL の内部標準溶液をHPLCのオートサンプラーで5 μL共注入
(共注入の機能が無いHPLCの場合は定容前に100 ng/mLの内部標準溶液を1 mL添加)

Scheme 2 有毒植物毒成分一斉分析法 前処理操作フロー

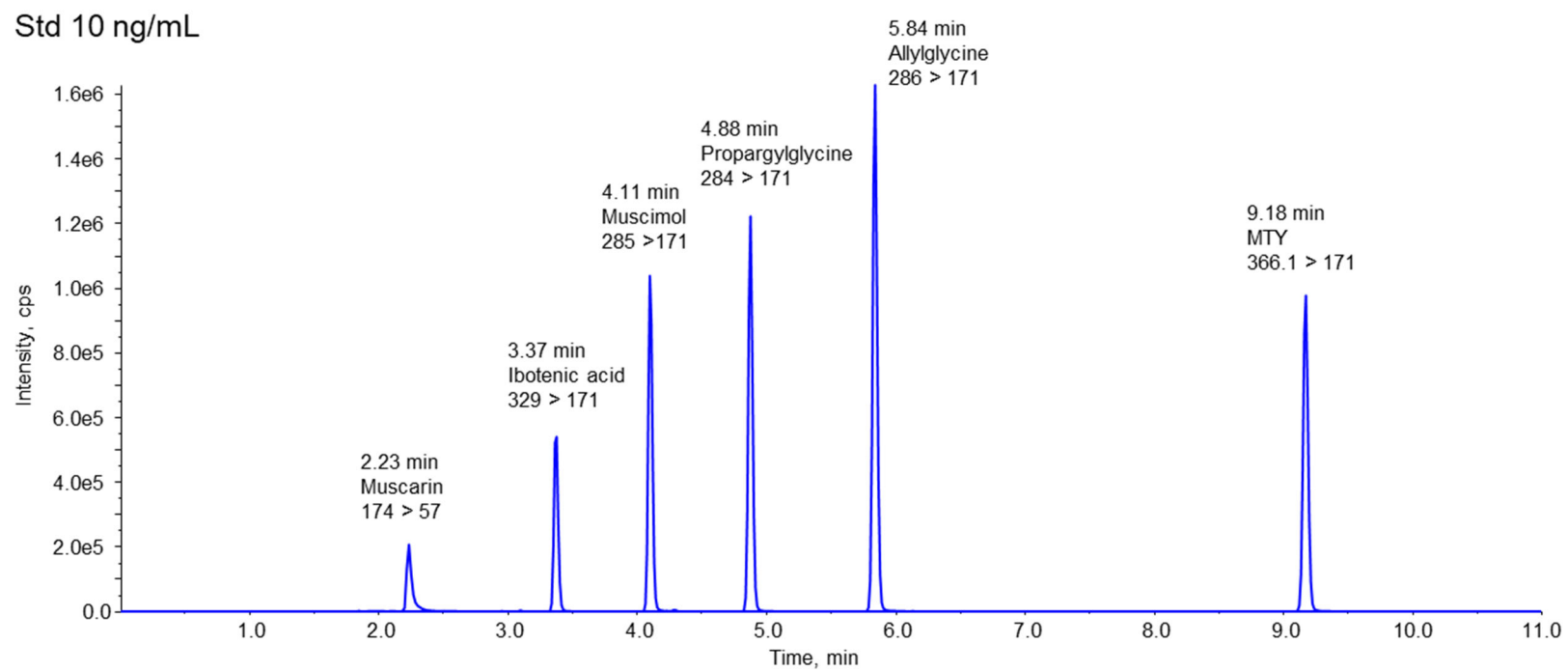
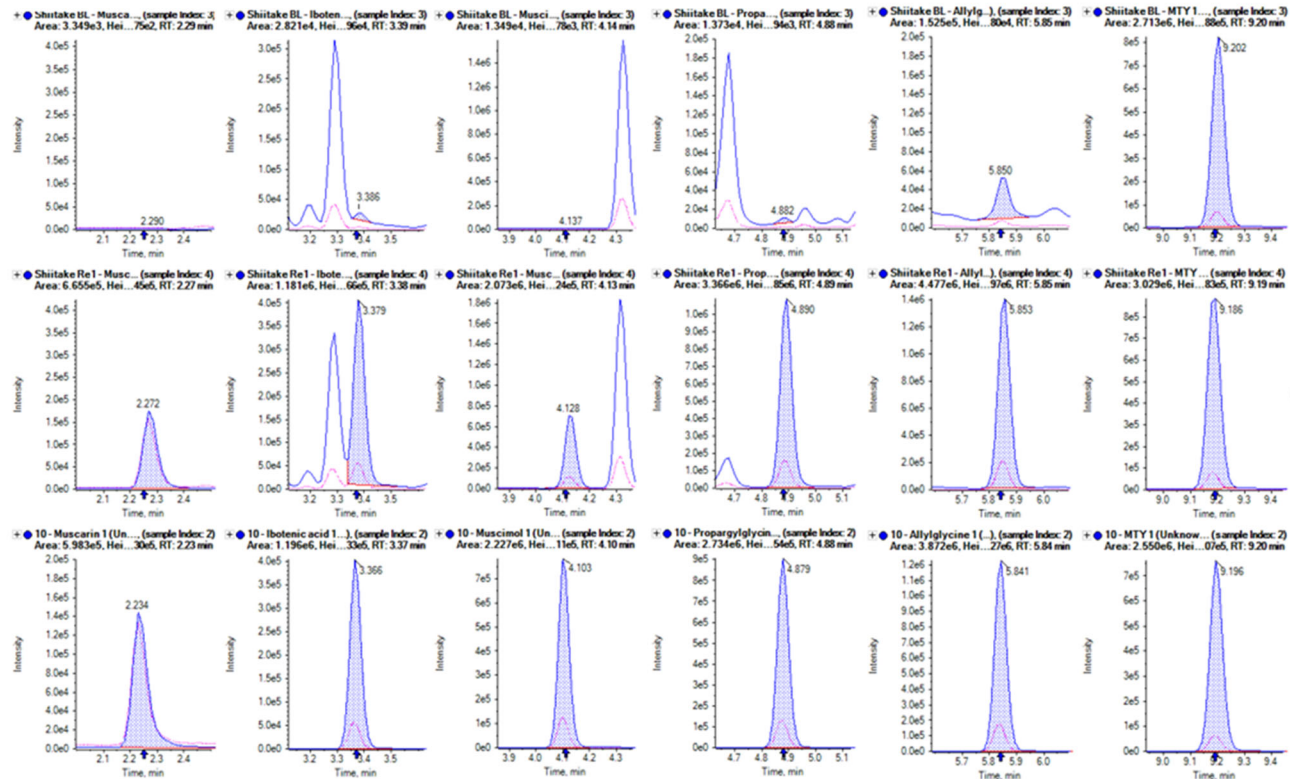


図1 有毒きのこの毒成分一斉分析法2 Scheduled SRM クロマトグラム (定量トランジション)

Quantifier ——— blue line
 Qualifier ——— pink line



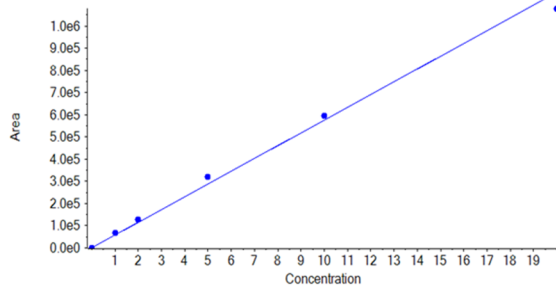
Muscarin Ibotenic acid Muscimol Propargylglycine Allylglycine MTY

Quantifier	<i>m/z</i> 174>57	<i>m/z</i> 329>171	<i>m/z</i> 285>171	<i>m/z</i> 284>171	<i>m/z</i> 286>171	<i>m/z</i> 366.1>171
Qualifier	<i>m/z</i> 174>43	<i>m/z</i> 329>116	<i>m/z</i> 285>116	<i>m/z</i> 284>116	<i>m/z</i> 286>116	<i>m/z</i> 366.1>116

図2 有毒きのこの毒成分一斉分析法2 SRMクロマトグラム
 (上段: シイタケ BL、中段: シイタケ添加 1 mg/kg、下段: 標準溶液 10 ng/mL)

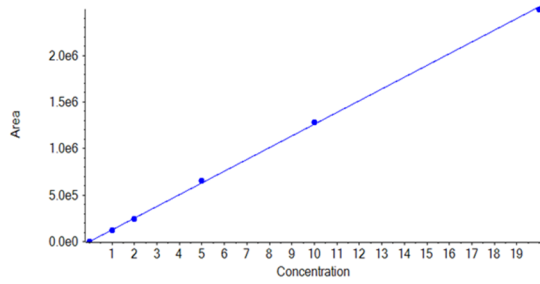
Muscarin

$y = 5.75571e4 x + 622.74822$ ($r = 0.99728$)



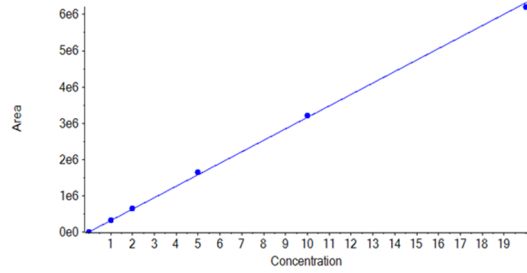
Ibotenic acid

$y = 1.26144e5 x + 286.12952$ ($r = 0.99983$)



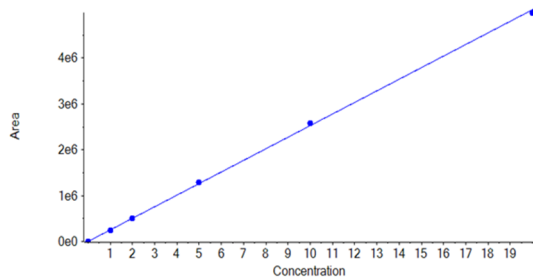
Propargylglycine

$y = 3.16179e5 x + 465.16286$ ($r = 0.99975$)



Muscimol

$y = 2.52687e5 x + 995.56784$ ($r = 0.99984$)



Allylglycine

$y = 4.32567e5 x + 886.26009$ ($r = 0.99970$)

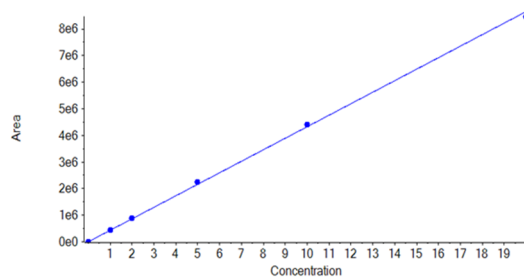


図3 有毒きのこの毒成分一斉分析法2 検量線 (内部標準補正なし)

表 3-1 添加回収試験の結果（添加濃度：1 mg/kg、n=3）

Compound name	Shiitake		Bunashimeji		Nameko		Hiratake		Maitake		Enokitake		Tsukuritake	
	Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)	Mean(%)	RSD(%)
Muscarin	110	2.65	102	0.86	112	2.37	111	0.78	110	1.12	103	0.39	103	1.57
Ibotenic acid	80.8	0.52	65.5	1.41	90.6	2.39	95.6	2.52	86.4	3.86	91.4	1.12	73.9	2.88
Muscimol	77.8	0.36	92.8	2.17	84.4	2.53	85.7	1.04	85.8	3.83	54.3	0.37	54.7	1.97
Propargylglycine	104	0.90	106	1.36	102	1.92	104	1.84	85.8	2.74	103	1.89	83.4	2.20
Allylglycine	96.8	1.53	101	2.22	92.6	1.90	95.5	4.22	87.1	3.30	91.1	1.07	54.4	1.59

表 3-2 マトリックス標準溶液の溶媒標準溶液に対する比（試料中 1 mg/k 相当、n=1） (%)

Compound name	Shiitake	Bunashimeji	Nameko	Hiratake	Maitake	Enokitake	Tsukuritake
Muscarin	103	89.2	107	118	109	105	100
Ibotenic acid	101	70.0	95.3	101	97.1	91.3	49.5
Muscimol	84.7	97.0	89.5	96.6	94.5	52.2	59.4
Propargylglycine	116	111	105	114	96.9	101	94.9
Allylglycine	112	106	97.2	107	102	92.3	81.7

表 4-1 10 機関による試験室間共同試験の結果-アトロピン

Laboratory	模擬試料① きんびらごぼう		模擬試料② ナスのミートソース	
	A	108	110	57.6
B	91.9	89.4	52.4	56.1
C	76.2	75.3	49.8	51.0
D	90.3	84.2	53.9	54.0
E	78.4	76.3	43.6	43.8
F	103	107	63.5	65.7
G	81.4	82.9	50.1	49.4
H	91.4	88.1	52.8	51.1
I	96.3	93.9	51.4	50.8
J	80.1	76.1	46.3	44.9
Mean (mg/kg)	89.0		52.4	
Mean recovery (%)	83.2		89.3	
Outlier (Cochran parameters)	0		0	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0	
Repeatability relative SD [RSD _r , %]	2.5		2.4	
Reproducibility relative SD [RSD _R , %]	12.9		11.7	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD _R , %]	8.1		8.8	
HorRat	1.6		1.3	

表 4-2 10 機関による試験室間共同試験の結果-スコポラミン

Laboratory	模擬試料① きんびらごぼう		模擬試料② ナスのミートソース	
	A	2.68	2.51	5.65
B	2.28	2.23	5.17	5.11
C	1.97	1.96	5.53	5.53
D	2.16	1.94	4.82	4.52
E	2.15	2.23	5.11	5.49
F	2.49	2.38	5.54	5.55
G	1.83	1.87	4.80	4.77
H	2.27	2.27	5.58	5.44
I	2.54	2.48	5.43	5.57
J	2.09	1.97	4.94	4.75
Mean (mg/kg)	2.21		5.25	
Mean recovery (%)	80.2		83.8	
Outlier (Cochran parameters)	0		0	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0	
Repeatability relative SD [RSD _r , %]	3.5		2.4	
Reproducibility relative SD [RSD _R , %]	11.4		7.3	
Predicted reproducibility relative SD [PRSD _R , %]	14.2		12.5	
HorRat	0.8		0.6	

表 5-1 6 機関による試験室間共同試験の結果-アトロピン

Laboratory	模擬試料① きんびらごぼう		模擬試料② ナスのミートソース	
	A	108	110	57.6
B	91.9	89.4	52.4	56.1
D	90.3	84.2	53.9	54.0
F	103	107	63.5	65.7
I	96.3	93.9	51.4	50.8
J	80.1	76.1	46.3	44.9
Mean (mg/kg)	94.2		54.7	
Mean recovery (%)	88.0		93.2	
Outlier (Cochran parameters)	0		0	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0	
Repeatability relative SD [RSDr, %]	2.8		2.7	
Reproducibility relative SD [RSDR, %]	12.3		12.0	
Predicted reproducibility relative SD [PRSDR, %]	8.1		8.8	
HorRat	1.5		1.4	

表 5-2 6 機関による試験室間共同試験の結果-スコポラミン

Laboratory	模擬試料① きんびらごぼう		模擬試料② ナスのミートソース	
	A	2.68	2.51	5.65
B	2.28	2.23	5.17	5.11
D	2.16	1.94	4.82	4.52
F	2.49	2.38	5.54	5.55
I	2.54	2.48	5.43	5.57
J	2.09	1.97	4.94	4.75
Mean (mg/kg)	2.31		5.24	
Mean recovery (%)	83.8		83.5	
Outlier (Cochran parameters)	0		0	
Outlier (single Grubbs parameters)	0		0	
Outlier (paired Grubbs parameters)	0		0	
Repeatability relative SD [RSDr, %]	4.2		2.2	
Reproducibility relative SD [RSDR, %]	10.7		8.1	
Predicted reproducibility relative SD [PRSDR, %]	14.1		12.5	
HorRat	0.8		0.7	

表 6-1 3 機関による試験室間共同試験の結果-アトロピン/内標補正の有無の比較

Laboratory	模擬試料① きんぴらごぼう				模擬試料② ナスのミートソース			
	IS(-)		IS(+)		IS(-)		IS(+)	
A	108	110	105	107	57.6	59.8	56.2	57.2
B	91.9	89.4	90.3	87.0	52.4	56.1	52.7	56.5
I	96.3	93.9	94.4	94.2	51.4	50.8	52.9	49.6
Mean (mg/kg)	98.2		96.3		54.7		54.2	
Mean recovery (%)	91.8		90.0		93.2		92.3	
Repeatability relative SD [RSDr, %]	1.6		1.6		3.2		3.9	
Reproducibility relative SD [RSDR, %]	9.7		9.3		7.4		5.8	
Predicted reproducibility relative SD [PRSDr, %]	8.0		8.0		8.8		8.8	
HorRat	1.2		1.2		0.8		0.7	

表 6-2 3 機関による試験室間共同試験の結果-スコポラミン/内標補正の有無の比較

Laboratory	模擬試料① きんぴらごぼう				模擬試料② ナスのミートソース			
	IS(-)		IS(+)		IS(-)		IS(+)	
A	2.68	2.51	2.57	2.41	5.65	5.77	5.54	5.48
B	2.28	2.23	2.26	2.22	5.17	5.11	5.12	5.09
I	2.54	2.48	2.81	2.66	5.43	5.57	5.66	5.50
Mean (mg/kg)	2.45		2.49		5.45		5.40	
Mean recovery (%)	88.9		90.2		86.9		86.1	
Repeatability relative SD [RSDr, %]	3.2		3.7		1.5		1.3	
Reproducibility relative SD [RSDR, %]	7.5		10.3		5.4		4.8	
Predicted reproducibility relative SD [PRSDr, %]	14.0		13.9		12.4		12.4	
HorRat	0.5		0.7		0.4		0.4	

表 7 試験室間共同試験のクライテリア (農水省のガイドラインから作成)

Matrix	きんぴらごぼう、ナスのミートソース			
	Unit	Recovery(%)	RSDR(%)	RSDr(%)
Recovery Repeatability Reproducibility	≧ 100 mg/kg	90~107	≦ 16	≦ 5.3
	≧ 10 mg/kg	80~110	≦ 22	≦ 7.3
	≧ 1 mg/kg	80~110	≦ 32	≦ 11
	HorRat value ≦ 2			