

HILIC-MS/MS によるヒガンバナ科植物中の リコリンおよびガラントミンの分析

坂本智徳, 赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

Determination of Lycorine and Galanthamine in *Amaryllidaceae* by HILIC-MS/MS

Tomonori SAKAMOTO, Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

HILIC-MS/MS によるヒガンバナ科植物中のリコリンおよびガラントミンの分析法を検討した。ギ酸含有メタノールを用いて試料中のリコリンおよびガラントミンを抽出し、スルホニルプロピルシリカゲルミニカラムを用いて抽出液を精製した。HILIC カラムを用いた LC-MS/MS により試験溶液中のリコリンおよびガラントミンを測定し、試料中の含有量を定量した。試料における定量限界は 0.2 µg/g であり、スイセンの葉、鱗茎およびヒガンバナの鱗茎での添加回収試験の回収率は 74.8~119.3%と良好な結果であった。また、妨害ピークやテーリングは見られず、良好なクロマトグラムが得られた。

Key Words : スイセン *narcissus*, ヒガンバナ *lycoris radiata*, リコリン *lycorine*, ガラントミン *galanthamine*, 親水性相互作用クロマトグラフィー HILIC, 高速液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置 LC-MS/MS

1 はじめに

リコリンおよびガラントミンは、植物アルカロイドの一種であり、スイセンやヒガンバナをはじめとするヒガンバナ科植物の全草に含まれている。これらのアルカロイドを摂取すると、嘔吐や下痢といった症状を呈する¹⁾。

近年、食用と誤って採取した野草による食中毒が全国で発生しているが、その原因植物のうちスイセンは葉がニラやアサツキに、鱗茎がノビルやタマネギに類似していることから、誤食した事例が報告されている (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>) 。

リコリンの分析法は、TLC 法²⁾、HPLC 法³⁾ および LC-MS/MS 法⁴⁾ 等が報告されている。このうち TLC 法および HPLC 法は感度、選択性に劣るという問題がある。リコリンは高極性の塩基性物質であるため ODS カラムに保持されにくく、残存シラノールによるテーリングの

ため十分な定量性が得られない。そこで、高極性物質の保持に優れる HILIC カラムを用いた LC-MS/MS による、リコリンおよびガラントミンの分析法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

スイセン (葉および鱗茎), ヒガンバナ (鱗茎)

2.2 試薬

リコリン標準品: リコリン塩酸塩 (Sigma Aldrich 社製, M.W. 323.8) を使用した。

ガラントミン標準品: ガラントミン臭化水素酸塩 (TOCRIS bioscience 社製, M.W. 368.27) を使用した。

スルホンプロピルシリカゲルミニカラム (PRS) : ジーエルサイエンス社製 InertSep PRS(500 mg/6 mL)を用いた。予めメタノール 5mL でコンディショニングして使用した。

アセトニトリル : HPLC 用を使用した。

その他の試薬 : 特級試薬を使用した。

1%ギ酸含有メタノール : ギ酸 1 mL をメタノールで溶解し 100 mL に定容した。

0.1%ギ酸含有メタノール : ギ酸 1 mL をメタノールで溶解し 1,000 mL に定容した。

5%アンモニア水含有メタノール : アンモニア水 (28%) 5 mL をメタノールで溶解し 100 mL に定容した。

2.3 標準溶液

リコリン標準原液 (1,000 µg/mL) : リコリン標準品 11.3 mg を 10 mL 容メスフラスコに採りメタノールで溶解し 10 mL に定容した。

ガラントミン標準原液 1,000 µg/mL : ガラントミン標準品 12.8 mg を 10 mL 容メスフラスコに採りメタノールで溶解し 10 mL に定容した。

混合標準溶液 (10 µg/mL) : リコリン標準原液およびガラントミン標準原液をそれぞれ 1 mL ずつ 100 mL 容メスフラスコに採り 0.1%ギ酸含有メタノールで 100 mL に定容した。

2.4 装置

高速液体クロマトグラフ : Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

タンデム質量分析装置 : AB SCIEX 社製 API2000 を使用した。

2.5 測定条件

LC-MS/MS 条件を表 1 に示した。

2.6 試験溶液の調製

細切試料約 1 g を正確に秤量し、1%ギ酸含有メタノールを加え 10 mL に定容し、15 分間超音波処理したのち 3,000 rpm、15 分間遠心分離を行った。上清 200 µL を分取し、メタノールで 25 倍に希釈したのち PRS に全量負荷した。PRS をメタノール 5 mL で洗浄し、5%アンモニア水含有メタノール 5 mL でリコリンおよびガラントミンを溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで減圧乾固し、0.1%ギ酸含有メタノール 2 mL で残渣を溶解したのち試験溶液とした。

スクリーニング試験においては、遠心分離した上清を 0.1%ギ酸含有メタノールで 100 倍に希釈して試験溶液とした。

2.7 定量

混合標準溶液を 0.1%ギ酸含有メタノールで希釈し、2 ~ 1,000 ng/mL の範囲で標準溶液を数点調製し、LC-MS/MS で測定した。標準溶液および試験溶液のクロマトグラムのピーク面積から、絶対検量線法により試験溶液中のリコリンおよびガラントミンを定量した。

表 1 LC-MS/MS 条件

Column	SeQuant ZIC-HILIC		
	100×2 mm i.d., 3.5 µm		
Column temp.(°C)	25		
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 0.1% Formic acid		
Flow rate(mL/min)	0.2		
Gradient profile			
Time(min)	0	7	10
B(%)	10	65	65
Post time(min)	20		
Injection volume(µL)	5		
Ionization	ESI, Positive		
Ionspray voltage(V)	5,500		
Turbo gas temp.(°C)	500		
Dwell time(msec)	100		
Monitor ions			
Lycorine			
Q1/Q3(m/z)	288/147*	288/119	288/91
DP(V)	51	51	51
CE(eV)	39	53	69
Galanthamine			
Q1/Q3(m/z)	288/213*	288/231	288/198
DP(V)	31	31	31
CE(eV)	33	25	41

*: Ion for quantification

3 結果および考察

3.1 MS/MS 条件の検討

イオン化モードは、極性物質のイオン化に適した ESI を選択し、感度および選択性に優れる MRM モードを用いて測定した。いずれのアルカロイドも、プロトンが付加した分子をプレカーサイオンとしてプロダクトイオンをモニターし、コリジョンエネルギー等の条件を最適化した。プロダクトイオンのうち最も S/N 比が大きいものを定量イオンとして、その他を確認イオンとして設定した。

3.2 LC条件の検討

図1に示すように、リコリンおよびガラントアミンは構造中に三級アミンを有する高極性物質である。そのため、従来のODSカラムを用いたLC条件では保持が弱く、テーリングのために十分な定量性が得られなかった。

酸性の移動相を用いることで、シリカ系充填剤のシラノールの解離による塩基性物質のテーリングは抑制される。しかし、塩基性物質はプロトン付加によりイオン化するため、逆相カラムでは保持されにくくなる。そこで、極性物質の保持に有効な、HILICモードによる分析条件を検討した。

分離カラムにはSeQuant社製ZIC-HILICを、移動相にはアセトニトリルおよび0.1%ギ酸水溶液を用いた。その結果、良好なピーク形状が得られ（シンメトリー係数1.1）、検量線は2~1,000 ng/mLの範囲で相関係数0.997以上、定量下限(S/N=10)は2 ng/mLであった。

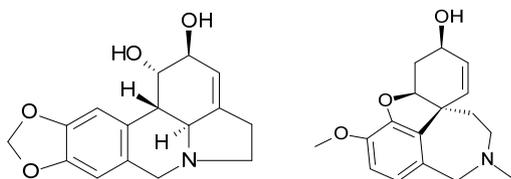


図1 リコリン(左)およびガラントアミン(右)の分子構造

3.3 抽出法および精製法の検討

メタノールを用いた抽出法では、スイセンからリコリンを100%抽出するために4回抽出操作を行う必要がある⁴⁾。リコリンは三級アミンを有するため、酸性条件下では三級アミンがプロトン化し溶解性が向上する。そこで、抽出液を酸性のメタノールとして抽出率の向上を検討した。

抽出液のギ酸濃度と抽出率との関係を図2に示す。1%ギ酸含有メタノールを用いた場合に、1回の抽出率が

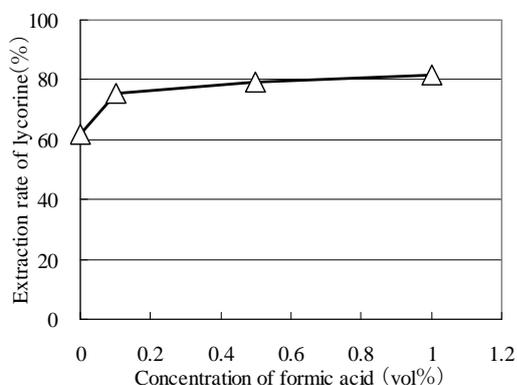


図2 リコリンの抽出率と抽出液のギ酸濃度との関係

82%となったため、以後の分析で抽出液として用いた。

迅速に分析を行うため、抽出液を直接または0.1%ギ酸含有メタノールで希釈してLC-MS/MSに注入し、イオン化阻害の有無を検討した。抽出液を100倍以上に希釈することでイオン化阻害は見られなくなったため、スクリーニング法として採用した。

また、試料中の色素等による機器の汚染を低減するため、塩基性物質の保持に有効な強カチオン交換カラムであるPRSを用いた抽出液の精製法を検討した。抽出液を直接PRSに負荷したところ、鱗茎の抽出液においてミニカラムが詰まり、途中で通液が不可能となった。そこで、抽出液をメタノールで25倍に希釈したのち負荷することとした。その結果、良好な通液性が維持され色素を除去することができた。また、図3に示すように、クロマトグラムにおいて妨害ピークは見られなかった。

3.4 採取した植物に含まれるリコリンおよびガラントアミンの定量

検討したカラム精製法を用いて、スイセンおよびヒガンバナに含まれるリコリンおよびガラントアミンの定量を行った結果を表2に示す。全ての試料からリコリンを3.1~150 µg/gの範囲で検出し、葉に比べ鱗茎が高濃度であった。スイセン1検体およびヒガンバナ1検体からガラントアミンを14~130 µg/gの範囲で検出したが、スイセン2検体からは検出せず、種の違いによるものと考えられた。

表2 試料の分析結果

Sample	Lycorine (µg/g)	Galanthamine (µg/g)
Narcissus 1 (leaf)	41	N.D.
Narcissus 1 (bulb)	79	N.D.
Narcissus 2 (leaf)	3.1	N.D.
Narcissus 2 (bulb)	160	N.D.
Narcissus 3 (leaf)	24	14
Narcissus 3 (bulb)	150	130
Lycoris radiata(bulb)	150	19

N.D.: not detected (<0.2)

3.5 添加回収試験

リコリンおよびガラントアミンを検出した試料を用いて、スクリーニング法およびカラム精製法により添加回収試験(100 µg 添加, n=3)を行った結果を表3に示す。スクリーニング法はカラム精製法に比べて標準偏差が大きくなったが、平均回収率は74.8~119.3%であり、食中毒や健康危機管理時に適用できるものと考えられた。

表 3 添加回収試験の結果(n=3)

Method	Recovery \pm S.D.(%)			
	Dilution(screening)		Clean-up	
	Lycorine	Galanthamine	Lycorine	Galanthamine
Narcissus(leaf)	95.8 \pm 7.1	95.8 \pm 7.2	104.9 \pm 9.0	84.0 \pm 6.3
Narcissus(bulb)	74.8 \pm 18.9	108.5 \pm 3.6	102.2 \pm 9.3	81.6 \pm 4.9
Lycoris radiata(bulb)	119.3 \pm 10.0	95.5 \pm 8.6	103.6 \pm 6.6	95.7 \pm 4.1

Lycorine
 m/z 288/147

Galanthamine
 m/z 288/213

4 まとめ

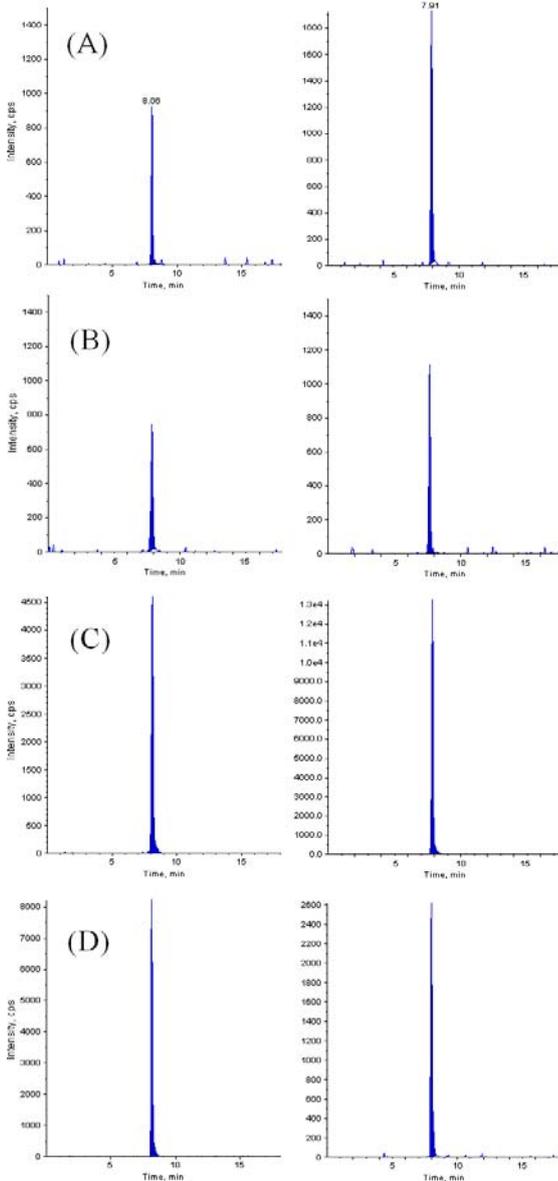


図 3 LC-MS/MS クロマトグラム

(A): 標準溶液(10 ng/mL), (B): スイセン葉抽出液,
(C): スイセン鱗茎抽出液, (D): ヒガンバナ鱗茎抽出液

HILIC-MS/MS によるリコリンおよびガラントミンの分析法を検討した. 1%ギ酸含有メタノールを用いて超音波処理を行うことで, 1回の抽出で80%以上の抽出率が得られた. 強カチオン交換カラムであるスルホニルプロピルシリカゲルミニカラムを用いて抽出液を精製し, HILICカラムを用いたLC-MS/MSにより試験溶液中の含有量を測定した. 定量下限はスクリーニング法で2 μ g/g, カラム精製法で0.2 μ g/gであった.

本法は迅速かつ感度も十分であり, 食中毒や健康危機管理時に有用なものと考えられる.

文献

- 1) 内藤裕史: 中毒百科—事例・病態・治療—, 311~312, 南江堂, 1991.
- 2) 全国自然毒中毒研修会抄録集, 61~65, 2008.
- 3) Citoglu, G. S., Yilmaz, B. S., Bahadir, O.: Chemistry of Natural Compounds, 44, 826-828, 2008.
- 4) 上田泰人, 伊藤光男, 田中敏嗣: 神戸市環境保健研究所, 60~61, 2008.