

# 健康危機管理対応模擬訓練における 自然毒（アトロピン及びスコポラミン）の分析

保健科学課 微量分析担当・食品化学担当

## 1 はじめに

地方衛生研究所全国協議会地域保健総合推進事業の一環として、毎年九州ブロック内の地方衛生研究所を対象に未知試料を用いた模擬訓練が実施され、福岡市保健環境研究所も参加している。本訓練は、健康危機事案発生時における検査体制の整備を目的としており、健康被害発生時に病因物質を推定し、定性及び定量を行うものである。

当所では、令和6年11月5日から令和6年度模擬訓練を実施、所長以下検査担当職員が参加した。福岡市保健環境研究所危機管理対応要綱に基づき、危機対策調整会議を開催し、事務局が作成したシナリオをもとに情報収集を行った。患者症状等からトロパンアルカロイド食中毒によるものと推定、当所における自然毒一斉分析法<sup>1)</sup>による試験溶液の調製方法に準じ、LC-MS/MSによる定量試験及び添加回収試験、並びにLC-QTOF-MSによる定性試験を実施した。定性試験の結果、チョウセンアサガオ由来の毒成分であるアトロピン及びスコポラミンを検出、模擬訓練での患者情報を元に計算した中毒濃度と定量値を比較したので報告する。

## 2 分析方法

### 2.1 試料

模擬検体：模擬訓練事務局作製の未知試料（カレー）

添加回収用ブランク試料：市販のインスタントカレー

### 2.2 試薬等

標準品：東京化成工業社製のアトロピン及びスコポラミン臭化水素酸塩三水和物を用いた。

標準原液：標準品2 mgをメタノールで20 mLにメスアップし100 µg/mLとした。

メタノール：関東化学社製 LC-MS用

標準溶液：標準原液を水及びメタノール（1:9）混液で適宜希釈した。

検量線用標準溶液：標準溶液をメタノール（1:9）で希釈し、0.5～50 ng/mLの溶液を調製した。

ギ酸アンモニウム：富士フィルム和光純薬工業社製 1 mol/L ギ酸アンモニウム水溶液 HPLC用

水：前処理は蒸留水製造装置で処理した水、移動相及び標準

溶液は超純水製造装置で処理した水を使用した。

蒸留水製造装置：ADVANTEC社製 RFD240NC

超純水製造装置：ADVANTEC社製 RFU666HA

遠心分離器：TOMY社製 CAX-571

メンブレンフィルター：ADVANTEC社製 DISMIC 13HP PTFE（0.2 µm）

### 2.3 装置

LC-MS/MS：LC部；Agilent社製 1260 InfinityII, MS部；Agilent社製 6470 TripleQuad

LC-QTOF-MS：LC部；AB SCIEX社製 ExionLC AC, TOF-MS部；AB SCIEX社製 X500R QTOF System

### 2.4 測定条件

LC-MS/MSの測定条件を表1に、測定イオンを表2に示す。また、LC-QTOF-MSの測定条件を表3に示す。

表1 LC-MS/MSの測定条件

測定機器	LC部：1260 Infinity II MS部：Agilent 6470 TripleQuad
分析カラム	Imtakt製 Scherzo SM-C18 (100 mm×2 mm, 3 µm)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 µL
カラム温度	40 °C
移動相	A液：10mMギ酸アンモニウム B液：メタノール
グラジエント条件	B液：1%（0 min）→99%（8 min）→99%（18 min） →1%（18.01 min）→1%（21 min）
測定モード	MRM
イオン化モード	ESI（+）
Gas Temp(°C)	300
Gas Flow(l/min)	10
Nebulizer(psi)	50
Sheath Gas Heater	400
Sheath Gas Flow	12
Capillary(V)	4000

表2 LC-MS/MSの測定イオン

	Prec Ion	Prod Ion	Frag(V)	CE(V)
Atropine	290.2	124.1	142	28
Atropine	290.2	93.1	142	36
Atropine	290.2	77.1	142	72
Atropine	290.2	51.1	142	128
	Prec Ion	Prod Ion	Frag(V)	CE(V)
Scopolamine	304.2	156.1	110	16
Scopolamine	304.2	138.1	110	24
Scopolamine	304.2	121.1	110	24
Scopolamine	304.2	110.0	110	36
Scopolamine	304.2	103.0	110	50
Scopolamine	304.2	98.0	110	28
Scopolamine	304.2	79.1	110	44

表3 LC-QTOF-MSの測定条件

測定機器	LC部: Sciex Exion LC AC MS部: Sciex X500R
分析カラム	Imtakt製 Scherzo SM-C18 (100 mm×2 mm, 3 μm)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 μL
カラム温度	40 °C
移動相	A液: 10mMギ酸アンモニウム B液: メタノール
グラジエント条件	B液: 1% (0 min) →99% (8 min) →99% (18 min) →1% (18.01 min) →1% (21 min)
測定モード	SWATH
イオン化モード	ESI (+)
カーテンガス流量	30psi
ヒーター温度	550°C
ネプライザガス流量	50°C
ターボガス流量	60°C
イオンスプレー電圧	5500V
Decustering potential	80V
Collision energy	5V
TOFMSスキャン範囲	m/z 50-1100
TOFMS/MSスキャン範囲	m/z 20-1100

## 2.5 試験溶液の調製

LC-MS/MSでの定量分析フローを図1に示す。試験溶液の調製は3併行で実施した。試料1gに水及びメタノール(1:9)混液を10mL加えたのち、10000rpmで1分間ホモジナイズし、1928×gで5分間遠心分離を行ったものを5Aろ紙でろ過した。残渣を50mL PP遠沈管に回収後、水及びメタノール(1:9)混液を10mL加え、振とう5分間、1928×gで5分間遠心分離を行い、5Aろ紙でろ過した。ろ液を合わせ50mLに定容したものを抽出液とし、水及びメタノール(1:9)混液で20倍希釈した抽出液を0.2μmフィルターでろ過し、試験溶液とした。

LC-QTOF-MSの定性分析は、上記抽出液を水及びメタノール(1:9)混液で2倍希釈後、0.2μmフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

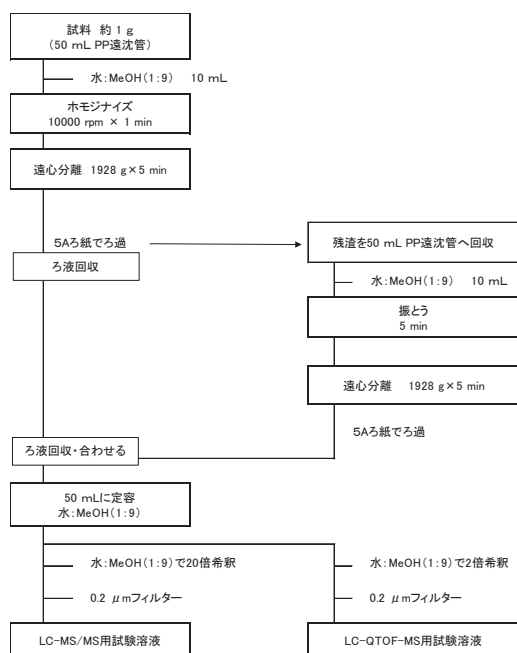


図1 試験溶液調製のフローチャート

## 2.6 検量線の作成及び定量

検量線用標準溶液をLC-MS/MSで分析して得られたMRMのクロマトグラムのピーク面積による絶対検量線法で定量した。

また、2.1に示したブランク試料を用いて調製した試験溶液について、試験溶液900μLに100ng/mL検量線用標準溶液を100μL添加し、10ng/mLマトリックス添加標準溶液とした。同濃度の検量線用標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めてマトリックス効果を算出した。

## 2.7 添加回収試験

模擬検体がカレーであったことから、性質の類似した市販のインスタントカレーをブランク試料とし、ブランク試料1gに、50μg/mLの標準溶液を100μL添加し、30分間静置したものを添加回収試料とした。前処理は2.5の方法を用い3併行で実施した。

## 3 分析結果

### 3.1 検量線の直線性

検量線は、1000倍希釈相当となる試験溶液でおおよその濃度を確認した後、検量線用標準溶液を使用し、2, 5, 10, 15, 20ng/mLの5点で定量した。アトロピン及びスコポラミンどちらの検量線についても、決定係数は0.99以上であった(図2)。

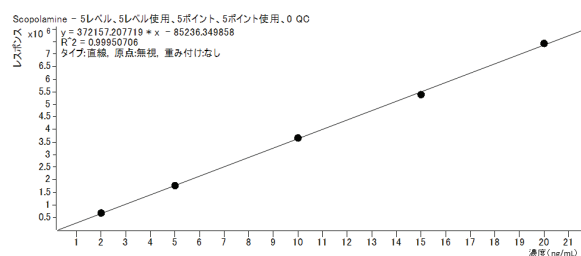
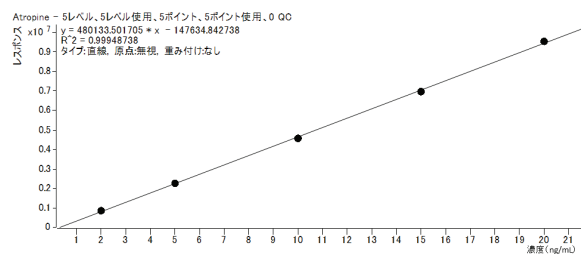


図2 検量線(上図:アトロピン, 下図:スコポラミン)

### 3.2 添加回収試験

アトロピンではプロダクトイオン124.1を定量イオンとし、スコポラミンではプロダクトイオン138.1を定量イオンとして回収率を算出した。その際、(a)マトリックス添加標準溶液10ng/mLと(b)標準溶液10ng/mLのピーク面積値の比を求め

た (計算式:  $\text{ピーク面積比} = a \div b \times 100 (\%)$ ) とし、105% となり、マトリックスによる測定結果への影響は少ないと判断し、標準溶液にて定量を行った (図 3)。併せて、併行精度の確認も行った。

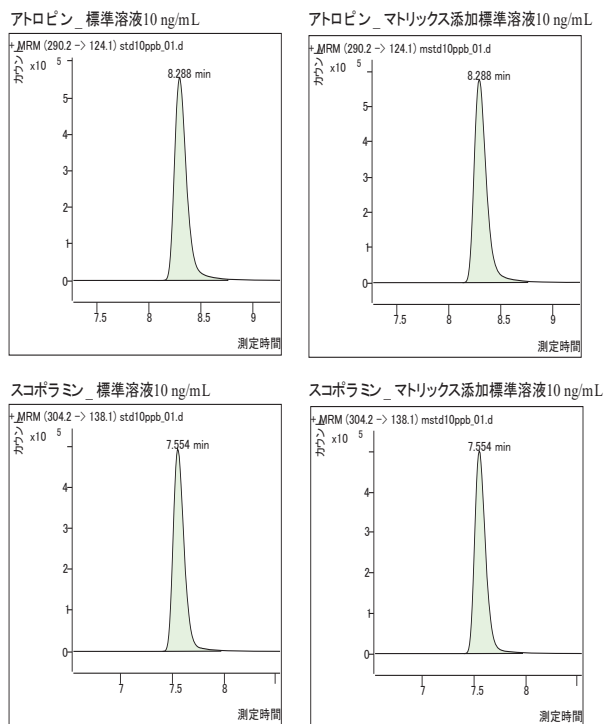


図3 標準溶液とマトリックス標準溶液の比較

### 3.3 アトロピン分析結果

標準溶液、模擬検体及び添加回収試料のクロマトグラムを図4に示す。

模擬検体の定量値は6.12  $\mu\text{g/g}$  となり、添加回収試料の回収率は113%となった。また、併行精度は3.49 RSD%となった。

### 3.4 スコポラミン分析結果

標準溶液、模擬検体及び添加回収試料のクロマトグラムを図5に示す。

模擬検体の定量値は9.28  $\mu\text{g/g}$  となり、添加回収試料の回収率は111%となった。また、併行精度は2.38 RSD%となった。

### 3.5 LC-QTOF-MSによる定性試験結果

LC-QTOF-MSのノンターゲット分析結果を図6、図7に示す。

保持時間2.70分にアトロピンのピーク、2.50分にスコポラミンのピークが確認できた。

LC-QTOF-MSのスキュン分析で得られた精密質量は、解析ソフトが示す理論値と一致しており、プロダクトイオンスペクトルはライブラリサーチ結果と一致していた。

## 4 中毒量の考察

模擬訓練検体に含まれていたアトロピン及びスコポラミンについて、模擬訓練での患者情報を元に計算した中毒濃度と比較し、中毒症状を呈する量が含まれているか確認を行った (表4)。各毒性成分の中毒量について、国立保健医療科学院健康被害危機管理事例データベース No.20002 チョウセンアサガオの誤食による食中毒について (<https://h-crisis.niph.go.jp/archives/186961/>) を参考に、それぞれ70  $\mu\text{g/kg}$ 、14  $\mu\text{g/kg}$  と設定したところ、各毒性成分の中毒量から算出した中毒濃度はアトロピンで平均18.28  $\mu\text{g/g}$ 、スコポラミンで平均3.66  $\mu\text{g/g}$  となった。また、各毒性成分の定量値と中毒濃度を比較したところ、アトロピンは中毒濃度を下回っていたが、スコポラミンは中毒濃度を約2.5倍上回っており、模擬検体には中毒症状を呈する量の毒性成分が含まれていると考えられた。

## 5 まとめ

当所の自然毒一斉分析法に準じた試験法を用いた結果、アトロピン及びスコポラミンの定性、定量結果を求めることができた。1000倍希釈した試験溶液を使用したことが、マトリックス効果低減に繋がり、良好な結果となったと考えられる。

また、今回の模擬訓練検体がカレーであり、ブランク試料として活用できるインスタントカレーを保管していたため、スムーズに精度管理を実施し、結果を求めることができた。しかし、実際の危機管理事案発生時にはブランク試料を入手することが困難であると考えられるため、可能な限り多種類のブランク試料を保存しておく必要があると考えた。

## 文献

- 1) 佐藤秀樹, 他: LC-TOF-MSによる植物性自然毒の迅速一斉分析法の確立, 食品衛生学雑誌, 65 (1), 7~14, 2024

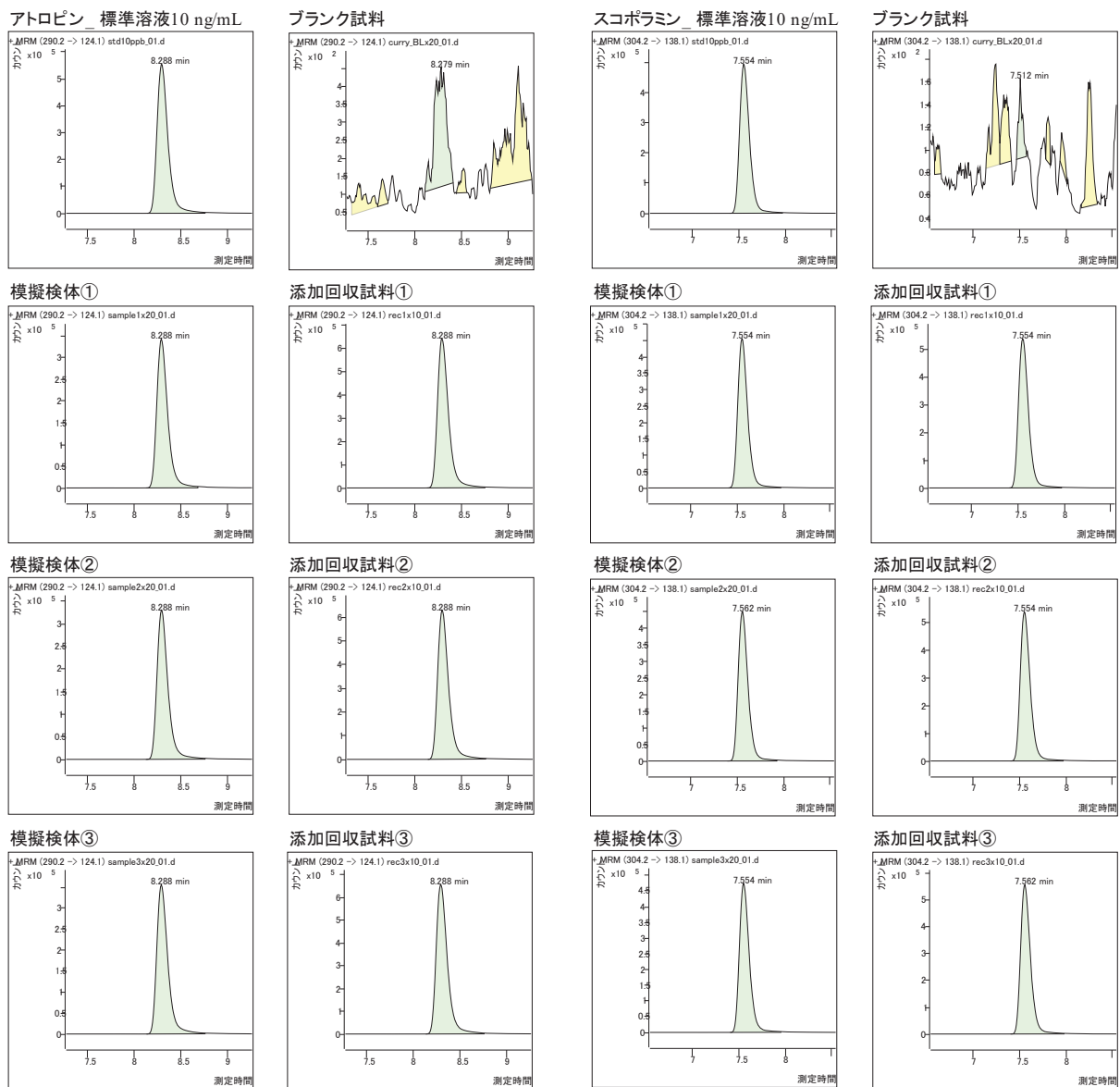


図4 標準溶液、模擬検体及び添加回収試験のクロマトグラム (アトロピン)

図5 溶媒標準液、模擬検体及び添加回収試験のクロマトグラム (スコポラミン)

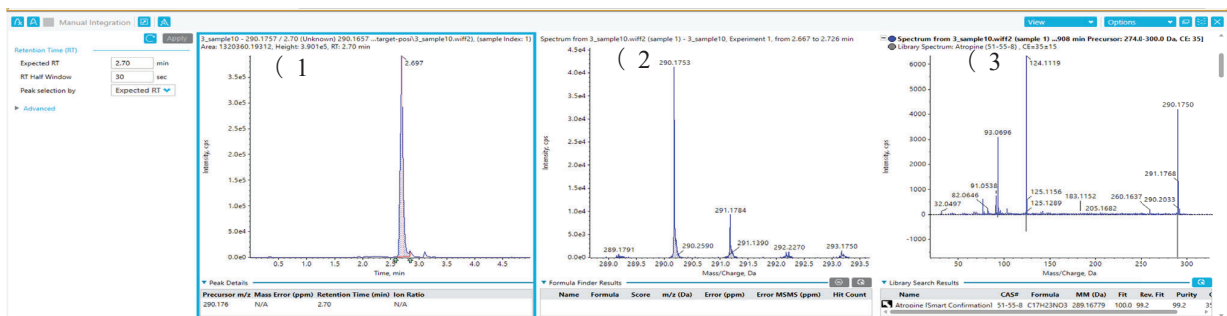


図6 LC-QTOF-MSによるノンターゲット分析結果 (アトロピン10倍希釈)  
(1) 抽出イオンクロマトグラム, (2) MSスペクトル, (3) MS/MSスペクトル

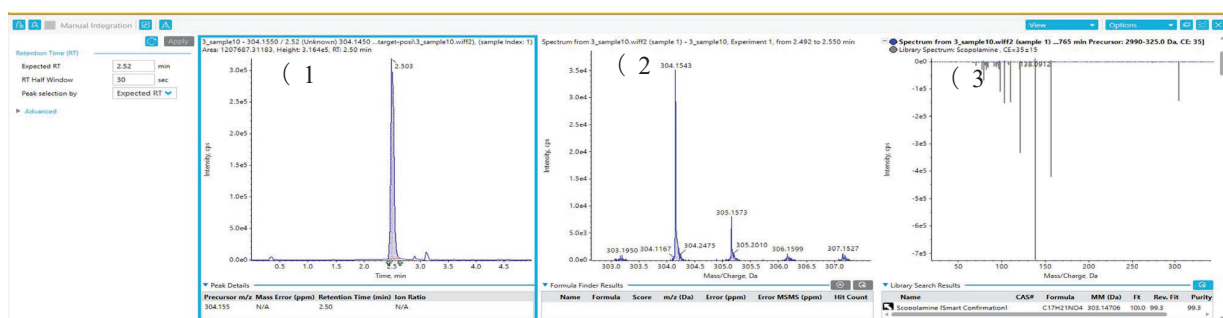


図7 LC-QTOF-MSによるノンターゲット分析結果（スコポラミン10倍希釈）  
 (1) 抽出イオンクロマトグラム, (2) MSスペクトル, (3) MS/MSスペクトル

表4 中毒濃度と定量値の比較

毒性成分	発症者	中毒量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$\times$	体重 ( $\text{kg}$ )	$\div$	喫食量 ( $\text{g}$ )	$=$	中毒濃度 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	定量値 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	濃度比
アトロピン	患者A			65		300		15.17 (平均)		
	患者B	70		60		200		21.00	6.12	0.33
	患者C			80		300		18.67		
スコポラミン	患者A			65		300		3.03 (平均)		
	患者B	14		60		200		4.20	9.28	2.54
	患者C			80		300		3.73		