

ナツメグ過剰摂取による食中毒を想定した エレミシン分析法

矢野智也・常松順子・増田栞・小出石千明・大木望・佐藤秀樹

福岡市保健環境研究所保健科学課

Analysis Method of Elemicin Assuming that Overconsumption of Nutmeg will Induce Food Poisoning

Tomoya YANO, Junko TSUNEMATSU, Shiori MASUDA,
Chiaki ODEISHI, Nozomi OKI and Hideki SATO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

ナツメグは、ハンバーグやコロッケなどに香辛料として使用されており、過剰摂取により食中毒を起こすことが知られている。

LC-MS/MS を用い、福岡市保健環境研究所の自然毒一斉分析法を参考に、マッシュポテトにエレミシンを添加した試料を用いて分析法を検討したが、回収率が 53.6%であった。回収率低下の原因として水及びメタノール (1:9) 混液とヘキサンの液液分配時に、エレミシンの一部がヘキサン層に移行したことが考えられた。そこで、抽出溶媒をメタノールのみとした結果、回収率が 86.5%に向上した。分析法の検証のため、市販のレトルトカレーを用いた添加回収試験 (n=5) を行った結果、回収率は 67.7%, 併行精度は 8.1RSD%であった。また、GC-MS/MS 及び LC-QTOFMS でエレミシンの特徴的なピークを確認できた。

Key Words : ナツメグ nutmeg, エレミシン elemicin, 過剰摂取 overconsumption
高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

1 はじめに

ナツメグは、ハンバーグやコロッケなどに香辛料として使用されているが、過剰摂取による食中毒事例も報告されている。わが国でも、幻覚・興奮作用を求めて自ら大量摂取し中毒に至った症例が報告されているが、依然食中毒の病因物質としての認知度は低く、分析法の報告も少ない¹⁾。

また、福岡市保健環境研究所では、LC-QTOFMS を用いた植物性自然毒一斉分析法²⁾ (以下、「自然毒一斉分析法」とする。) を確立しているが、ナツメグ中の病因物質であるエレミシンは対象成分に含まれていない。

今回、ナツメグ過剰摂取による食中毒に対応するために、ナツメグ中の精油成分であるエレミシンについて、抽出溶媒として水及びメタノール (1:9) 混液を使用した自然毒一斉分析法に準じた方法で分析可能か検討を行った。しかし、当該分析法では十分な回収率が得られなかったため、回収率改善を目的として、LC-MS/MS によ

るエレミシン分析法について検討した結果を報告する。併せて、分析法検証のため行った脂質や香辛料などの夾雑物の多い加工食品である市販のレトルトカレーを用いた性能評価試験結果並びに GC-MS/MS 及び LC-QTOFMS を用いた定性試験結果も報告する。

2 実験方法

2.1 試料

2.1.1 前処理法検討用試料

ナツメグ入りのマッシュポテトを用いた。なお、本試料は、令和5年度地方衛生研究所九州ブロック模擬訓練 (以下、「模擬訓練」とする。) で当所が調製したものである。

2.1.2 性能評価試験用試料

脂質や香辛料などの夾雑物の多い加工食品である市販のレトルトカレーを調製し用いた。

2.1.3 定性確認用試料

エレミシンが添加されたマッシュポテトを用いた。なお、本試料は模擬訓練事務局が、乾燥ポテトにナツメグ、エレミシン及び水を添加し、エレミシン濃度が 150 µg/g となるよう調製したものである。

2.2 標準品・試薬等

標準品：富士フィルム和光純薬社製エレミシンを用いた。

標準溶液：標準品 1 g を、アセトニトリル（富士フィルム和光純薬社製 LC/MS 用）1 mL に溶解し、適宜希釈して使用した。

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

アセトニトリル：富士フィルム和光純薬社製 LC/MS 用を用いた。

メタノール：富士フィルム和光純薬社製 HPLC 用を用いた。

n-ヘキサン：富士フィルム和光純薬社製残留農薬試験用を用いた。

2.3 装置・器具等

ホモジナイザー：IKA 社製 T18 digital UL-TRA-TURR AX®

振とう機：タイテック社製 RECIPRO SHAKER SR-2w

遠心機：久保田製作所社製フロア型冷却遠心機 S700FR

50 mL PP 遠沈管：Eppendorf 社製 Conical Tubes 50 mLamber

0.2 µm フィルター：Agilent Technologies Syringe Filter PTFE-HI 13 mm, 0.2 µm

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

LC-QTOFMS：LC 部は AB SCIEX 社製 ExionLC AC, TOF-MS 部は AB SCIEX 社製 X500R QTOF System

GC-MS/MS：GC 部は島津製作所社製 GC-2010 Plus, MS 部は島津製作所社製 TQ8050

2.4 測定条件

LC-MS/MS の測定条件及び対象化合物の測定イオン等を表 1 に示す。

LC 条件は、自然毒一斉分析法を参考に、分析カラムに Scherzo SM-C18 を用い、移動相に 10 mM 酢酸アンモニウム及びメタノールを用いたグラジエント分析とした。

MS/MS 条件は、Agilent Masshunter Optimizer を用いて MRM 条件を最適化し、強度の高い MS/MS トランジ

ション、フラグメンター電圧及び CE の組み合わせを測定条件として選定した。

表 1 LC-MS/MS の測定条件

測定機器	LC部：1260InfinityII MS部：Agilent 6470TripleQuad				
分析カラム	Intakt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酢酸アンモニウム 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				
SheathGasHeater	400				
SheathGasFlow	12				
Capillary(V)	4000				
	Prec Ion	Prod Ion	Frag(V)	CE(V)	
Elemicin	209.1	168	80	13	定量イオン
Elemicin	209.1	153	80	21	確認イオン①
Elemicin	209.1	125	80	30	確認イオン②
Elemicin	209.1	110	80	30	確認イオン③
Elemicin	209.1	93	80	30	確認イオン④

2.5 前処理法の検討

精油成分であるエレミシンはヘキサン移行性が考えられたため、自然毒一斉分析法に準じた前処理法による試験法と、メタノール抽出での前処理法による試験法について、各々繰返し試験を 3 併行で実施し、回収率を比較した。併せて、エレミシンのヘキサン移行性確認試験を 3 併行で実施した。

2.5.1 試験用試料の調製

マッシュポテトの重量に対し、ナツメグの重量が 5% になるように市販のナツメグパウダーを添加したブランク試料 1.0 g に、エレミシン 1000 ng/mL を 100 µL 添加し、エレミシン濃度が 100 µg/g となるよう調製した。

2.5.2 自然毒一斉分析法に準じた前処理法

分析フローを図 1 に示す。試料 1 g に水及びメタノール (1:9) 混液を 10 mL 加えたのち、脱脂を目的として n-ヘキサンを 10 mL 加えた。10000 rpm で 1 分間ホモジナイズし、1928 ×g で 5 分間遠心分離を行い、液液分配したのち、下層（水及びメタノール (1:9) 混液層）を 5A ろ紙でろ過した。残渣を 50 mL PP 遠沈管に回収後、水及びメタノール (1:9) 混液を 10 mL 加え、再度 10000 rpm で 1 分間ホモジナイズし、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 50 mL に定容したものを抽出液とし、抽出液を 0.2 µm フィルターでろ過し、試験溶液とした。試験溶液は必要に応じメタノールで希釈した。

2.5.3 メタノール抽出での前処理法

分析フローを図 2 に示す。試料 1 g にメタノールを

10 mL 加えたのち， 10000 rpm で 1 分間ホモジナイズし， 1928 ×g で 5 分間遠心分離を行い， 5A ろ紙でろ過した．残渣を 50 mL PP 遠沈管に回収後， メタノールを 10 mL 加え， 再度 10000 rpm で 1 分間ホモジナイズし， 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 50 mL に定容したものを抽出液とし，抽出液を 0.2 μm フィルターでろ過し，試験溶液とした．試験溶液は必要に応じメタノールで希釈した．

2.5.4 エレミシンのヘキサン移行性の確認試験

分析フローを図 3 に示す．エレミシン 150 μg/mL を水及びメタノール（1:9）混液：ヘキサン＝10 mL：10 mL で混合した溶液に 1.0 mL 添加し， 1 分間ホモジナイズした後，メタノール層にエレミシンがどれくらい含まれているか LC-MS/MS で測定した．

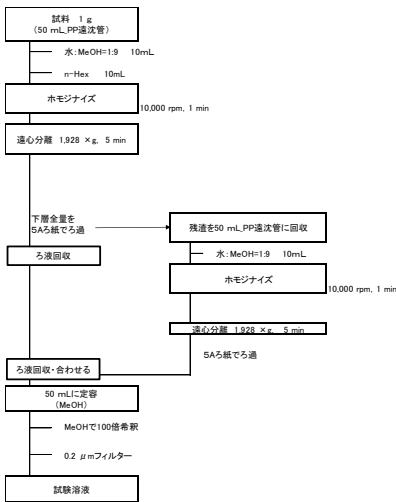


図 1 自然毒一斉分析法に準じた前処理法フロー

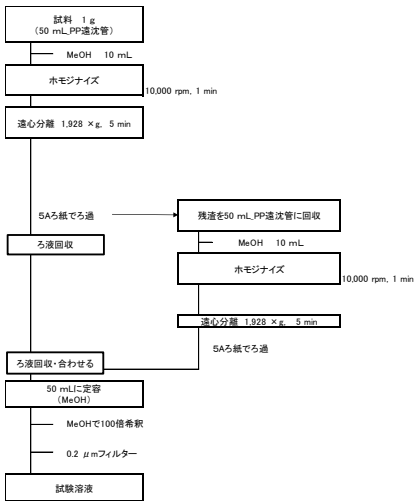


図 2 メタノール抽出での前処理法フロー

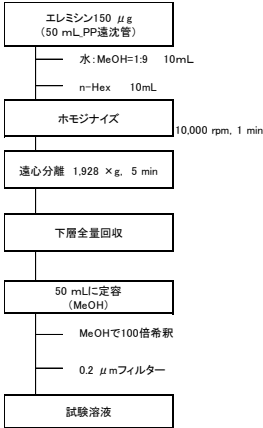


図 3 エレミシンのヘキサン移行性確認試験フロー

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．

2.7 マトリックス効果の確認

2.5.1 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，メタノールで 10 倍及び 100 倍希釈した溶液並びに希釈しない原液の試験溶液各 900 μL に 1000 ng/mL 検量線用標準溶液を 100 μL 添加し， 100 ng/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．

2.8 性能評価試験

2.8.1 試験用試料の調製

性能評価試験用試料として，市販のレトルトカレー 1.0 g にエレミシン 1000 μg/mL を 100 μL 添加し，エレミシン濃度が 100 μg/g となるよう調製したものをを用いた．

なお，ナツメグ 1 g あたりのエレミシン含有量は 3.5 mg/g であり³⁾，ナツメグの中毒量 5 g～15 g¹⁾ から換算したエレミシンの中毒量は 17.5 mg～52.5 mg となる．一般的なレトルトカレー 180 g がエレミシン濃度 100 μg/g となるように添加すると，カレー中のエレミシン量が 18 mg となり，上記中毒量の範囲に当てはまる．

2.8.2 性能評価試験

レトルトカレー及び 2.8.1 の方法で処理した性能評価試験用試料について，2.5.3 に従ってそれぞれ試験溶液を調製し，レトルトカレーについては希釈なし，性能評価試験用試料については 100 倍希釈したものを LC-MS/MS で測定 (n=5) し，測定後，それぞれ定性及び定量を行った．本分析法の性能を厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡⁴⁾ に従い，選択性，回収

率，併行精度及び S/N 比で評価した。

2.9 他の分析機器での定性確認

定性確認用試料を用い，GC-MS/MS のスキャン分析及び LC-QTOFMS のターゲット分析を行った。それぞれの測定条件を表 2，表 3 に示す。

なお，GC-MS/MS でスキャン分析を行うにあたり，3 層固相ミニカラムを用いた加工食品中に高濃度に含まれる農薬の迅速分析法⁵⁾を参考に，サンプル 1 g を酢酸エチルで抽出後 10 mL に定容し，3 層固相カラムによる精製後，精製溶液 200 μ L 窒素乾固させ，アセトン：ヘキサン=1：1 溶液 50 μ L に転溶したものを定性分析用試料（5 倍希釈相当）として使用した。

LC-QTOFMS のターゲット分析については，2.5.3 に示したメタノール抽出での前処理方法により調製したものを 100 倍希釈し定性分析用試料として使用した。また，ライブラリ登録用試料として 0.5 ng/mL の標準液を使用した。

表 2 GC-MS/MS の測定条件

測定機器	GC部:GC-2010 Plus LC部:GC-MS TQ8050
分析カラム	名前:SH-Rxi-5Sil MS 膜厚:0.25 μ m 長さ:30.0 m 内径0.25 mm ID
カラム温度 (昇温条件)	105.0℃ (3分)-10℃/分-130.0℃-4℃/分-200.0℃-8℃/分-290.0℃ (6分)-10℃/分-300.0℃ (3分)
注入口温度	250℃
検出器温度	230℃
注入方式	スプリットレス
キャリアーガス	1.40 mL/分
注入量	2 μ L

表 3 LC-QTOFMS の測定条件

測定機器	LC部：ExionLC AC MS部：X500R QTOF System
分析カラム	Imtakt製 scherzo SM-C18 (100 mm×2 mm, 3 μ m)
流速	0.4 mL/min
注入量	5 μ L
カラム温度	40℃
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	data-dependent acquisition (当該機種)のIDA)
イオン化モード	ESI (+)
Ionspray- voltage(V)	5500
Temperature(℃)	500
TOF-MSスキャン範囲	TOF-MSm/z 50～2,000 TOF-MSMSm/z30～1,000
コリジョン電圧	TOF-MS:5 V TOF-MSMS:35±15 V

3 結果及び考察

3.1 前処理法の検討結果

3.1.1 自然毒一斉分析法に準じた前処理法

2.5.2 に従い前処理を行った試料①～③について，当所の自然毒一斉分析法に準じ，水及びメタノール（1:9）混液を 10 mL 加えたのち，脱脂を目的として n-ヘキサンを 10 mL 加えたところ，回収率が 49.5～55.9%，平均値 53.6%となった。結果を表 4 に示す。なお，ブランク試料にもナツメグが含まれるため前処理法検討用試料①～③のピーク面積値についてはブランク試料のピーク面積値を差し引いた値とし，回収率を求めた。

3.1.2 メタノール抽出での前処理法

2.5.3 に従い前処理を行った試料④～⑥について，抽出溶媒をメタノールのみとし，LC-MS/MS で測定したところ，回収率は 84.3～91.0%，平均値 86.5%となった。結果を表 5 に示す。なお，ブランク試料にもナツメグが含まれるため前処理法検討用試料④～⑥のピーク面積値についてはブランク試料のピーク面積値を差し引いた値とし，回収率を求めた。

3.1.3 エレミシンのヘキサン移行性の確認試験

エレミシンを添加した試料⑦～⑨のヘキサン層への移行性について，2.5.4 に従い確認した結果を表 6 に示す。全てのサンプルで回収率は 50%を超えたが，ヘキサン層へエレミシンが移行することも推測できた。

以上の結果から，エレミシンの食中毒については過剰摂取が問題となるため，定量を正確に行うために，回収率が 80%以上であったメタノール抽出法での前処理を行うこととした。

表 4 自然毒一斉分析法に準じた前処理法での前処理法検討用試料の回収率

サンプル名	回収率 (%)
試料①	55.6
試料②	49.5
試料③	55.9

表 5 メタノール抽出での前処理法検討用試料の回収率

サンプル名	回収率 (%)
試料④	84.3
試料⑤	84.3
試料⑥	91.0

表 6 エレミシンのヘキサン移行性確認試験におけるメタノール層での回収率

サンプル名	回収率 (%)
試料⑦	58.7
試料⑧	62.1
試料⑨	61.4

3.2 検量線

検量線を図 4 に示す。5～50 ng/mL の範囲で直線性が確認でき、決定係数は 0.999 以上であった。

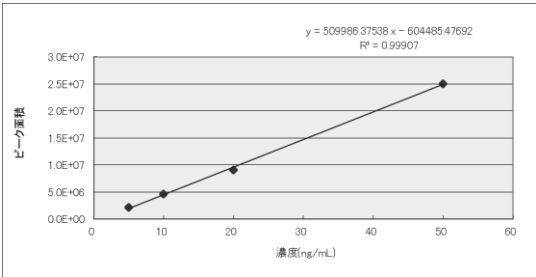


図 4 検量線

3.3 マトリックス効果の確認

ブランク試料にもエレミシンが含まれるため、ブランク試料から調製した試験溶液のピーク面積を差し引き算出したマトリックス効果は、10 倍希釈した場合 0.97、100 倍希釈した場合 1.07 であり、マトリックスによる測定結果への影響は認められなかった。

なお、エレミシン食中毒が過剰摂取によって発症するものであり、発症濃度及び検量線範囲を考慮すると、LC-MS/MS で測定するためには 10 倍希釈して測定することが前提となる。

3.4 性能評価試験の結果

市販のレトルトカレー及び 2.8.1 の方法で調整し 100 倍希釈した性能評価試験用試料①～⑤を用い、選択性、回収率、併行精度及び S/N 比を確認した。

レトルトカレーについては、スパイスに含まれるナツメグ含有のエレミシンとして、0.09 µg 程度確認できたが、100 倍希釈することを考えると、表 7 のとおり性能評価試験用の結果と比較しても微量であり無視できる程度であった。

3.4.1 選択性

クロマトグラムを図 5 に示す。選択性について、エレミシンのクロマトグラム (n=5) を確認したところ、妨害ピークは見られなかった。

3.4.2 回収率、併行精度及び S/N 比

回収率 (5 併行の平均) 及び併行精度の結果を表 7 に

示す。エレミシンの回収率は 67.7%，併行精度は 8.1RSD%であった。また、エレミシンのピークの S/N 比については図 5 のとおりすべて ≥ 1000 であった。

健康被害防止の観点から発出された事務連絡⁴⁾における性能評価の目標値は、回収率 (50%～200%)，併行精度 (RSD% < 30) 及び評価濃度 (回収率の評価で得られた成分のピークが S/N 比 ≥ 10) とされており、今回の結果はこの範囲内であった。

表 7 レトルトカレーを使用した性能評価試験の結果

サンプル	試料採取量 (g)	試料中含量 (µg)	回収率 (%)	回収率平均 (%)	RSD%
レトルトカレー	1.02	0.09176			
性能評価試験用試料①	1.03	65.82670	63.9	67.7	8.1
性能評価試験用試料②	1.01	71.04455	70.3		
性能評価試験用試料③	1.02	62.13284	60.9		
性能評価試験用試料④	1.03	75.60000	73.4		
性能評価試験用試料⑤	1.03	64.01893	62.2		

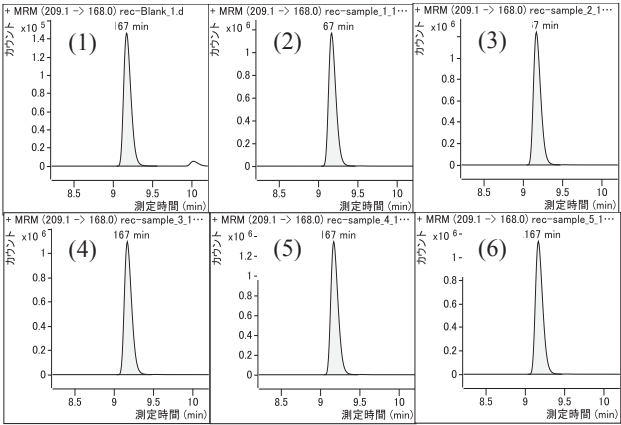


図 5 性能評価試験用試料中のエレミシンのクロマトグラム ((1) レトルトカレー (希釈なし) , (2) ～ (6) 添加回収試験用試料①～⑤ (100 倍希釈))

3.5 定性試験の結果

定性確認用試料を用い、GC-MS/MS のスキャン分析及び LC-QTOFMS のターゲット分析を行ったところ、ナツメグの代表成分であるエレミシン及びエレミシンと同様に過剰摂取により食中毒を起こすミリスチシンがクロマトグラム上でピークとして検出された。

定性確認用試料について、GC-MS/MS のスキャン分析結果を図 6 に示す。

TIC クロマトグラムにおいて、保持時間 11 分周辺にナツメグ含有成分であるエレミシン、ミリスチシンの大きなピークが確認できた。NIST 検索との一致率は図 7 に示すとおり、エレミシンで 90%，ミリスチシンで 92%であった。

また、LC-QTOFMS のターゲット分析結果を図 8 に示

す。保持時間 3.05 分にエレミシンのピークが確認できた。LC-QTOFMS スキャン分析で得られた同位体パターンは、解析ソフトが示す理論値のパターンと一致しており、プロダクトイオンスペクトルは当所で作成したライブラリ結果と一致していた。

4 まとめ

ナツメグに含まれるエレミシンに対し、LC-MS/MS を用いた分析法を検討し、メタノール抽出での前処理法を確立した。分析法の性能評価として、レトルトカレーを用いた添加回収試験（添加濃度 100 $\mu\text{g/g}$, $n=5$ ）を行っ

た結果、エレミシンの選択性は問題なく、回収率 67.7%, 併行精度は 8.1RSD%, S/N 比 ≥ 1000 となった。

また、定性分析においては、GC-MS/MS 及び LC-QTOFMS でエレミシンの特徴的なピークを確認できた。

ナツメグは、ハンバーグやカレー、ジャガイモ料理など、日常的に喫食する食品に使用されることが多いが、過剰摂取により食中毒が発生することの認知度が低い。ナツメグ過剰摂取による食中毒はいつ発生してもおかしくないため、今回の検討によって、突発事案発生時にも検査可能な体制を整備できた。

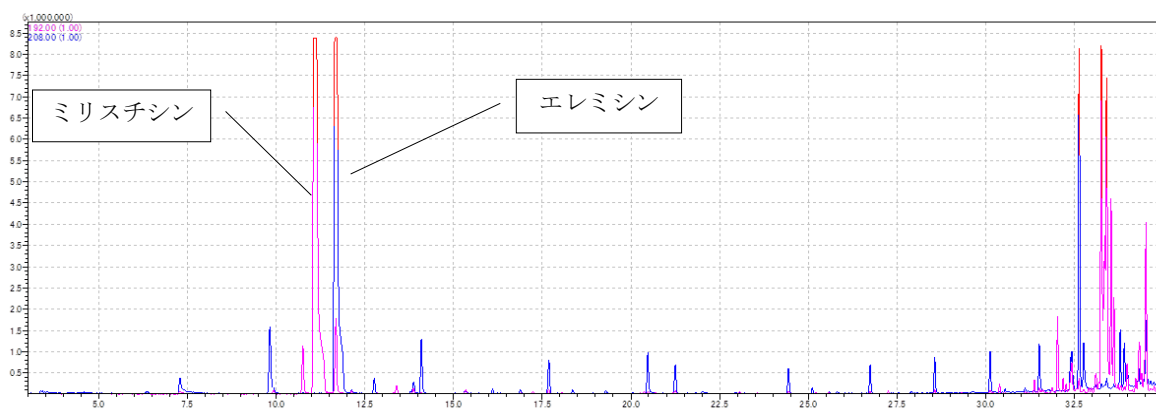


図6 GC-MS/MSによるスキャン分析結果 (TICクロマトグラム)

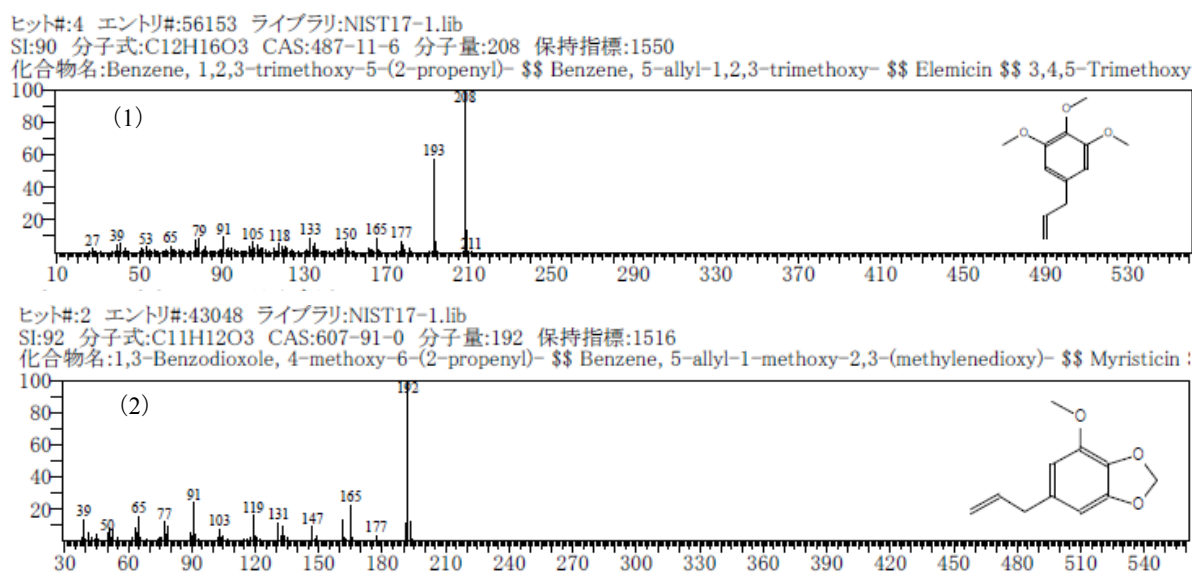


図7 GC-MS/MSによるライブラリ検索結果
 (1) エレミシン, (2) ミリスチシン

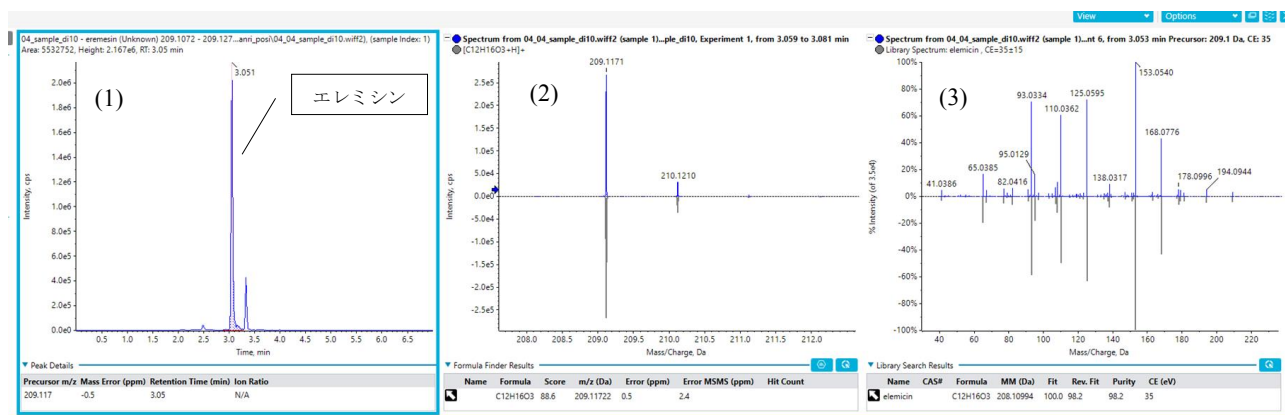


図8 LC-QTOFMSによるターゲット分析結果
((1) 抽出イオンクロマトグラム, (2) MS スペクトル, (3) MS/MS スペクトル)

文献

- 1) 藤岡隆太郎, 他: ナツメグ中毒の1例, 日救急医学会誌, 39 (2), 285~287, 2018
- 2) 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
- 3) Stafford, P.G., et al: Psychedelics Encyclopedia. Berkeley CA: Ronin Publishing, 292, 1992
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡: 加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について, 平成25年(2013年)3月26日
- 5) 矢野智也, 他: 3層固相ミニカラムを用いた加工食品中に高濃度に含まれる農薬の迅速分析法, 福岡市保健環境研究所報, 48, 60~68, 2023