

LC/MS/MS による α -ソラニンおよび α -チャコニンの 高感度分析法の検討

西川 徹、川口 喜之、村上 正文

Study of High Sensitivity Analysis for α -Soranine and α -Chaconine Using Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry .

Toru NISHIKAWA, Yoshiyuki KAWAGUCHI, Masafumi MURAKAMI

Key words: α -soranine, α -chaconine, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)

キーワード: α -ソラニン、 α -チャコニン、高速液体クロマトグラフータンデム質量分析

はじめに

長崎県においてバレイシヨは主要な農産物の1つであるが、バレイシヨは下痢・嘔吐・発熱・痙攣などの食中毒起因物質である α -ソラニン及び α -チャコニンなどに代表されるグリコアルカロイドを含んでおり、他県において集団食中毒事例も報告されている^{1~3)}。こうした事例を踏まえ、健康危機管理の観点からバレイシヨ中グリコアルカロイドに対する高感度分析法を検討することは重要である。

グリコアルカロイドの分析法はGC法やHPLC法による方法が汎用されているが、GC法は誘導体化の前処理が必要で操作が煩雑であり、またHPLCは現在最も普及している方法であるが、グリコアルカロイドの検出には210nmの波長を使用するため他の成分により定量が困難となる問題がある。

そこでバレイシヨ中に含まれるグリコアルカロイドは95%が α -ソラニン及び α -チャコニンであることから、この2成分について、液体クロマトグラフータンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた分析法を検討したので報告する。

調査方法

1 試料及び試薬

α -ソラニン及び α -チャコニン標準品はSigma社製を使用した。各標準溶液は標準品10mgを正確に精秤し、メタノールで溶解させて100mlとした。この標準原液を適宜移動相で希釈して検量線作成に使用した。

Sep-Pak Plus C18 (360mg, Waters社製) はあら

かじめ、メタノール 5ml、蒸留水 10ml でコンディショニングを行い、使用した。

メタノールやアセトニトリル、蒸留水は関東化学㈱の高速液体クロマトグラフ用を使用し、その他の試薬は特級品を用いた。

馬鈴薯は長崎県産のものを選び、皮を取り除いた部分を分析に用いた。

2 分析条件

(1) 高速液体クロマトグラフ

HPLC: 島津製作所製 LC-10AVP システム

分析カラム: 東ソー(株)社製 TSK-gel Super ODS (2.0mm i.d. × 100mm、粒子径 2 μ m)

カラム温度: 室温

移動相は A 液に 0.02%ギ酸溶液、B 液にアセトニトリルを用い、流速を 0.2 ml / min でグラジエント分析を行なった。試料注入量は 1 μ l とした。

グラジエント条件

| Time(min) | A 液 | B 液 |
|-----------|-----|-----|
| 0 | 80 | 20 |
| 10 | 70 | 30 |
| 12 | 70 | 30 |
| 12.1 | 80 | 20 |
| 18 | 80 | 20 |

(2) 質量分析装置

Applide Biosystems 社製 API2000

イオン化法:ESIポジティブモード
 イオンスプレー電圧:4.5kV
 イオンソース温度:500°C

α -ソラニン及び α -チャコニンの質量分析条件について、イオン化条件はインフュージョンポンプを用いて設定し、イオン源条件については30%アセトニトリル溶液によるFIAより設定した(Table.1)。

Table1. ESI-MS/MS parameters

| | soranine | chaconine |
|------------------------|----------|-----------|
| Declustering Potential | 151 | 146 |
| Collision energy | 111 | 111 |
| Monitor ion Q1 | 868.7 | 852.7 |
| Monitor ion Q3 | 98.2 | 98.2 |

3 分析方法

衛生試験法注解(2005)に準じた。皮をむいたバレイショ5gを50ml遠沈管に入れ、メタノール30mlを加えてホモジナイズを行い、3,000rpmで5分間遠心分離した。遠心後、上清をメタノールで50mlに定容した。

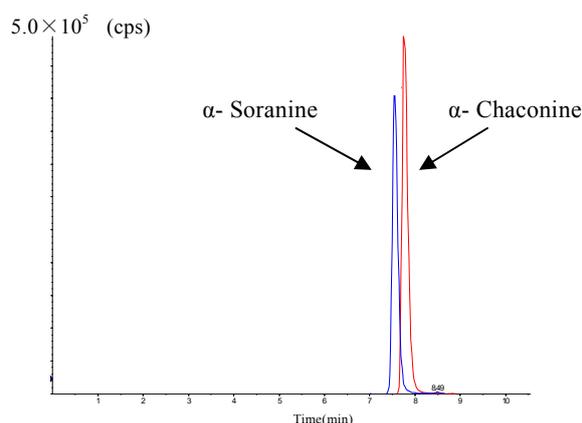
この1mlを蒸留水で5mlとし、あらかじめメタノール5ml及び蒸留水10mlでコンディショニングしたSep-Pak Plus C18(360mg)へ負荷し、10%メタノール5mlで洗浄後、メタノール15mlで溶出した。溶出液を減圧留去し、10%メタノールに溶解したものを0.2 μ mフィルターでろ過し試験溶液とした。

結果と考察

1 分析条件の検討

α -ソラニン及び α -チャコニンはステロイド系アルカロイドであるソラニジンにグルコースやガラクトース、ラムノースが結合している配糖体である。その極性からHPLC分析においてはアミノプロピル化学結合型シリカゲルカラムが汎用されているが、本研究ではセミマイクロ系ODSカラムによる分離を試みた。TSK-gel Super ODSやMightsil-RP18GP、Capcell-Pak MG IIなどのカラムを検討した結果、TSK-gel Super ODSが最も良好なピーク形状を示した。移動相は0.02%ギ酸溶液及びアセトニトリルを用いたグラジエント分析により、良好なクロマトグラムが得られた(Fig.1)。

イオン化にはESIによるMRM法の条件を検討した

Fig.1 Chromatogram of α -Soranine and α -Chaconine (1 μ g/ml) by LC/MS/MS.

ところ、ポジティブモードで高感度分析が可能であり、本法における定量下限値は α -ソラニンで0.2pg、 α -チャコニンで0.1 pgであった。

2 質量分析計によるスペクトル測定

α -ソラニン及び α -チャコニンの20 μ g/ml溶液を用いてプリカーサーイオンおよびプロダクトイオンを測定したときのスペクトルをFig.2に示す。それぞれのプレカーサーイオンとしては、 α -ソラニン及び α -チャコニン[M]にプロトン[H⁺]が付加した[M+H⁺]型(α -ソラニン m/z;868.7, α -チャコニン m/z;852.7)や、これからガラクトースやラムノースが脱離したイオン(m/z;706.6)、ソラニジンにグルコースのみが結合したイオン(m/z;560.4)、ソラニジンにプロトン[H⁺]が付加したイオン(m/z;398.4)が確認された。一方プロダクトイオンでは、ソラニジン骨格の窒素を含んだフラグメントイオン(m/z;98.2)が確認された。これらの特徴的なスペクトルは α -ソラニン及び α -チャコニンを定性する際のモニターイオンとして有効な情報である。

3 前処理法の検討

精製法については衛生試験法注解(2005)に準じて行なったところ、 α -ソラニン及び α -チャコニンの回収率はほぼ100%と良好であった。ただし、バレイショサンプル中のきょう雑物の影響により、40%メタノール溶液では α -ソラニン及び α -チャコニンが一部溶出する恐れを考慮し、洗浄は10%メタノールで行なった。また、Sep-Pak Plus C18(360mg)以外にもOasis HLB(60mg)を用いた精製についても検討したところ、Oasis HLB(60mg)においても良好に保持されたため、Oasis HLB(60mg)も精製に効果的であることがわかった。本精製法により、クロマトグラム上に妨害ピークは

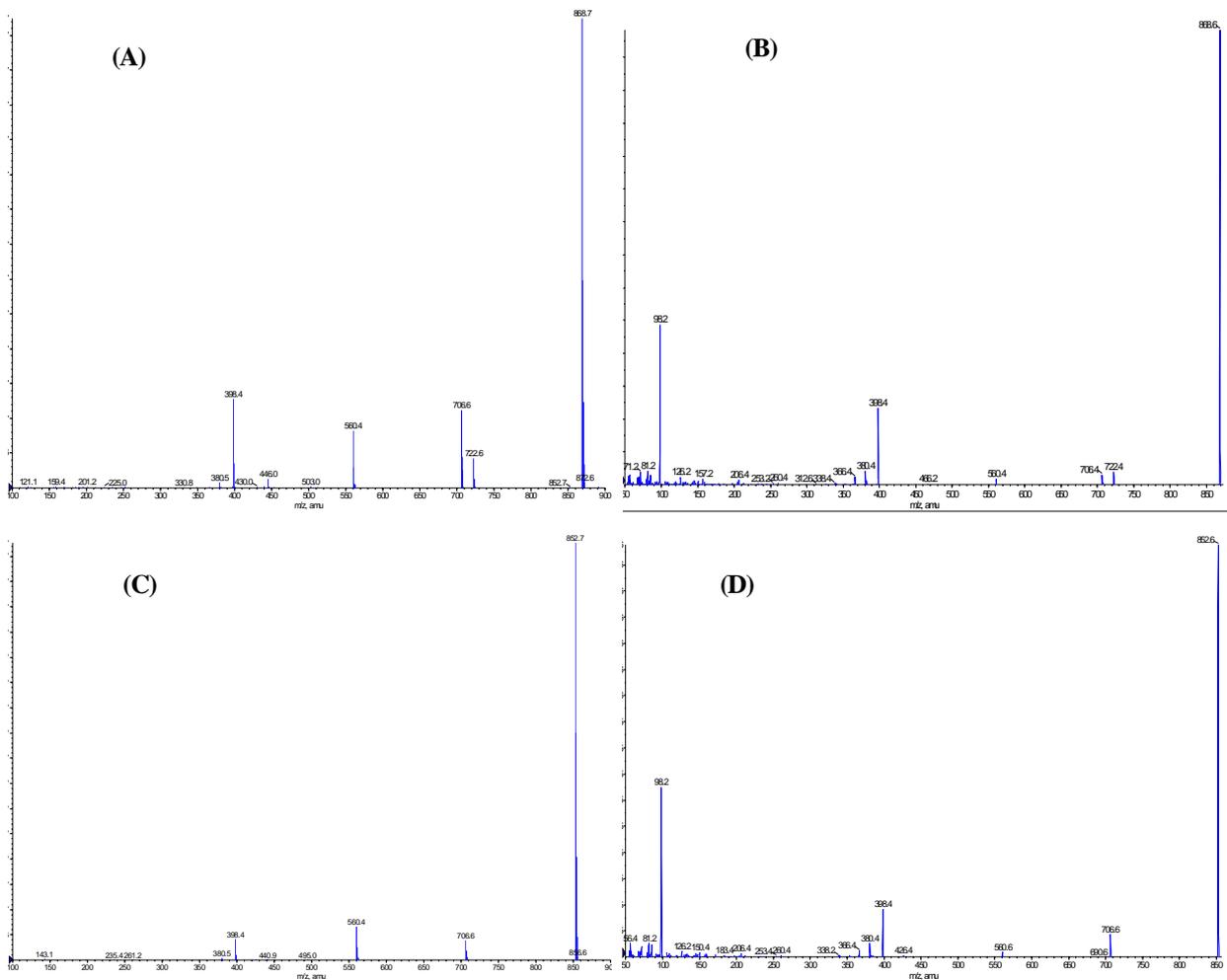


Fig.2 Mass spectra of α -Soranine and α -Chaconine (20 μ g/ml) by LC/MS/MS.

(A) The precursor ion of α -soranine; (B) The product ion of α -soranine; (C) The precursor ion of α -chaconine; (D) The product ion of α -chaconine

みられず、質量分析で問題となるイオンサプレッションなどのマトリックス効果もみられなかった。

4 バレイシヨ中の α -ソラニン及び α -チャコニン含量

皮をむいたバレイシヨ中の α -ソラニン及び α -チャコニン含量を本法により定量したところ、 α -ソラニンが約10mg/kg、 α -チャコニンが約23mg/kgであった

まとめ

LC/MS/MS を用いた分析により α -ソラニン及び α -チャコニンについて pg レベルでの検出が可能であった。またスキャン測定においても特徴的なフラグメントイオンを生成することから、 α -ソラニン及び α -チャコニンの定量および定性において LC/MS/MS による測定は有用であることが分かった。

参考文献

- 1) 岩崎久夫:バレイシヨによるソラニン中毒. 食品衛生学雑誌, **25**, 466~467, (1984)
- 2) 松井久仁子, 他:未熟なバレイシヨによる小学生のグリコアルカロイド中毒とその発症量および予防対策について, 食品衛生研究, **54**, 99~107, (2001)
- 3) 下井俊子, 他:各種ジャガイモ中のグリコアルカロイド含有量調査, 食品衛生学雑誌, **48**, 77~82, (2007)