

[ノート]

チョウセンアサガオの中毒事例における LC/MS を用いた アトロピンおよびスコポラミンの分析

吉岡 直樹* 秋山 由美 松岡 智郁 祭原 ゆかり 三橋 隆夫

Determination of Atropine and Scopolamine by LC/MS in *Datura* Poisoning

Naoki YOSHIOKA*, Yumi AKIYAMA, Tomofumi MATSUOKA,
Yukari SAIHARA and Takao MITSUHASHI

*Life Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental
Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

Two patients took “burdock roots” grown in their garden. After eating, they were admitted to hospital with a complaint of vertigo. The symptoms were mydriasis, tachycardia, and visual hallucinations. Then, we analyzed “burdock roots” they took. The root was extracted with diethyl ether and ammonia solution, and the extract was analyzed by LC/MS. The concentrations of atropine and scopolamine were 425 µg/g and 4.57 µg/g, respectively. The compounds were further confirmed within 1 ppm error by measuring accurate mass using LC/TOF-MS. The result showed that the patients mistook *Datura* roots for burdock roots.

I はじめに

2008年1月に兵庫県丹波市内において、チョウセンアサガオの誤食が原因と思われる食中毒が発生した。当該患者（2名）が、自宅畑で「ゴボウ」として採取した植物の根を調理、喫食したところ、めまい、瞳孔散大、幻視等の症状を呈したため、医療機関を受診した。その後、患者からの聞き取り調査により、収穫したゴボウ畑近辺の花壇に以前「チョウセンアサガオ」を植えていたことが判明し、症状と併せて、チョウセンアサガオによる食中毒と推定された。

そこで、研究センターでチョウセンアサガオの確認試験を行った。装置として、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) および液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計 (LC/TOF-MS) を用いて分析条件を検討し、含有成分であるアトロピンおよびスコポラ

ミンを測定した。その結果、両成分の含有が確認されたので報告する。

II 方法

1. 試料

患者らが喫食した「ゴボウ」様根茎の残品が無かったため、同品と同じ場所から採取した根茎（検体1）を試料とした。また、自宅畑で栽培しているゴボウ（検体2）を対照品とした (Fig.1)。



Sample No.1

Sample No.2
(Reference, Burdock root)

Fig.1 Root samples which the patients took by mistake.

健康科学部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所
健康科学部 吉岡 直樹

2. 試薬および試液

硫酸アトロピン水和物 ($C_{17}H_{23}NO_3$) $_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ は和光純薬工業(株)製特級を用い、臭化水素酸スコポラミン $C_{17}H_{21}NO_4 \cdot HBr \cdot nH_2O$ (換算値 $n=1.3$) は和光純薬工業(株)製生薬試験用を用いた。ジエチルエーテルは残留農薬・PCB試験用、メタノールは高速液体クロマトグラフ用を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

3. HPLCによる定量分析

3.1 LC/MSによる測定条件

装置: Agilent 1100 Series LC + MSD (SL)

カラム: Inertsil ODS-3 (150 mm×3.0 mm, 5 μm)

移動相: メタノール-10mM酢酸アンモニウム (25:75)

流量: 0.4 mL/min, カラム温度: 40°C,

注入量: 5 μL

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI(Positive, 2500 V)

ネブライザ圧力: 50 psi, 乾燥ガス: 10 L/min (350°C)

フラグメンター電圧: 100 V, 200 V

スキャン範囲: m/z 50-400

3.2 LC/TOF-MSによる測定条件

装置: Agilent 1200 Series LC + 6210 TOF-MSD

カラム: Inertsil ODS-3 (150 mm×3.0 mm, 5 μm)

移動相: メタノール-10mM酢酸アンモニウム (25:75)

流量: 0.4 mL/min, カラム温度: 40°C,

注入量: 5 μL

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI(Positive, 4000 V)

ネブライザ圧力: 50 psi, 乾燥ガス: 10 L/min (350°C)

フラグメンター電圧: 100 V

スキャン範囲: m/z 50-950

リファレンスマス: 121.0509および922.0098

4. 試験溶液の調製

第十五改正日本薬局方 ロートコン定量法¹⁾を参考にした。ブレンダーで細切した試料2 gを50 mL共栓遠沈管に入れ、10%アンモニア水15 mLおよびジエチルエーテル25 mLを加えた。15分間激しく振とうした後、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取した。残留物にジエチルエーテル25 mLを加え、上記と同様に更に2回抽出し、全抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターでジエチルエーテルを留去した。残留物をメタノールに溶解し、全量を2 mLとしたものを、HPLC用試験溶液とした。

III 結果および考察

1. LC/MSによる分析

1.1 分析条件の検討

チョウセンアサガオには有毒なアルカロイド成分としてアトロピンおよびスコポラミンが含まれている。それらの構造式を Fig.2 に示した。両化合物のHPLC分析においては、分離カラムとして ODS^{2-9, 11, 13)} や Phenyl¹⁰⁾, HILIC¹²⁾等を用いた分析例が報告されている。本報では分離カラムとして一般的な ODS を用いた。なお、ODS の場合、カラムへの保持を高めるためにイオンペア試薬を使用している例^{2, 4, 9, 13)}もあるが、本報の移動相条件ではイオンペア試薬を用いなくても分析に支障がなかった。

また、検出器としては、UV^{2, 3, 5-9)}、蛍光(誘導体化)⁴⁾、MS^{10, 11)}、MS/MS^{12, 13)}を使用した例が報告されている。UV は、妨害物質の影響を受けやすいこと、また蛍光は煩雑な誘導体化が必要なことから、今回は妨害が少なく高感度なMS検出器を用いることにした。

MS検出器のイオン化については、アトロピンおよびスコポラミンは正イオンモードでイオン化可能であった。フラグメンター電圧100 Vでは、それぞれプロトン付加分子イオン(m/z 290.1 および 304.1)が検出され、電圧200Vではトロパン骨格部分と推定されるフラグメントイオン(m/z 124.1 および 138.1)も検出された。

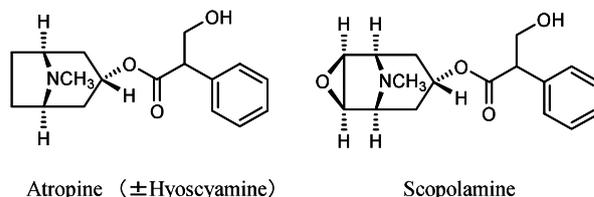


Fig.2 Chemical structures of atropine and scopolamine.

1.2 分析結果

Fig.3 に、アトロピン標準溶液と検体1からの抽出イオンクロマトグラム(EIC)およびマススペクトルを示した。また Fig.4 には、スコポラミン標準溶液と検体1からのEICおよびマススペクトルを示した。

検体1から検出されたピークは、保持時間およびマススペクトルが両標準物質のものと一致した。フラグメンター電圧100 Vで検出されたプロトン付加分子イオンのピーク面積により定量した結果、検体1からアトロピン 425 μg/g、スコポラミン 4.57 μg/g (共に2試行の平均値)が検出された。一方、対

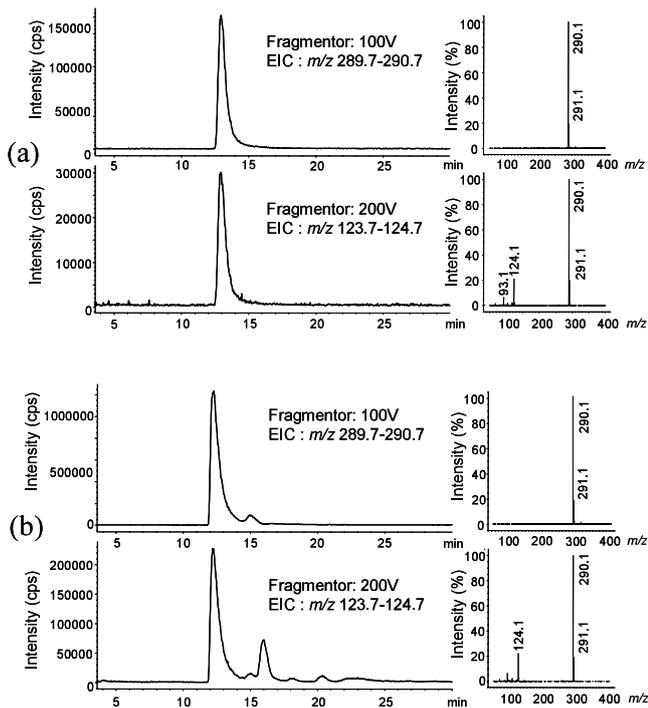


Fig.3 Extracted ion chromatograms and mass spectra of atropine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/MS.

照品である検体 2 からは、両化合物は検出されなかった。この際のアトロピンおよびスコポラミンの検出下限は、いずれも 0.2 µg/g 未満であった。

1.3 添加回収試験

対照品のゴボウにアトロピンおよびスコポラミンを 5 µg/g 相当添加し、添加回収試験を行った (3 試行)。その結果、回収率はアトロピン、スコポラミンそれぞれ、99.3±4.6 %、84.6±2.8 %と良好な値であった。

2. LC/TOF-MS による分析

2.1 分析条件の検討

LC/TOF-MS では、検出されたピークの精密質量測定が可能である。本分析で使用した装置では、リファレンスマスを常時導入することにより 3 ppm 以内の質量誤差が確保されている。したがって EIC の抽出質量範囲を 0.02 u 幅程度に狭く設定することで、ピークを選択性を上げ、目的成分を妨害成分から離することが可能である。

そこで検体 1 について LC/TOF-MS を用いて再分析を行った。HPLC カラムおよび移動相は、LC/MS と同じ条件を用いた。

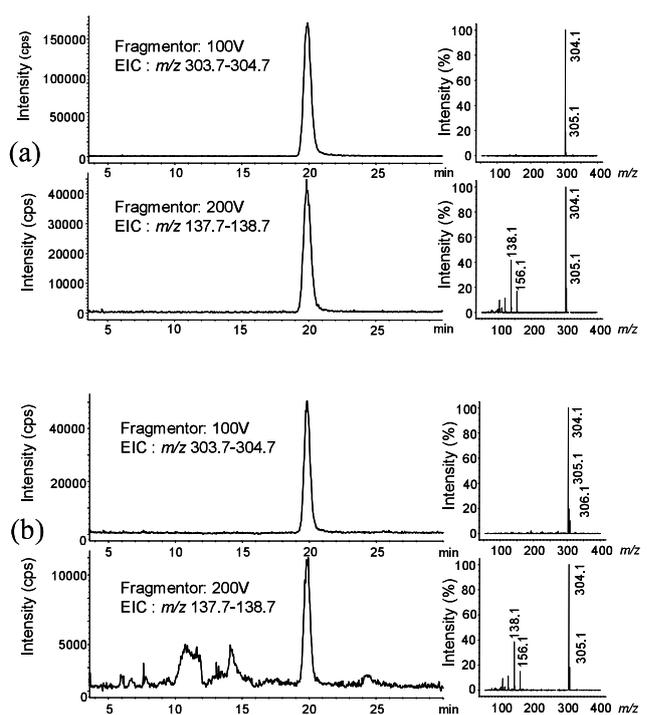


Fig.4 Extracted ion chromatograms and mass spectra of scopolamine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/MS.

2.2 分析結果

Fig.5, Fig.6 に、それぞれ LC/TOF-MS におけるアトロピン・スコポラミン標準溶液と検体 1 からの EIC およびマススペクトルを示した。

アトロピンのプロトン付加分子イオン ($C_{17}H_{24}NO_3$) の精密質量の理論値は 290.1756、スコポラミンのプロトン付加分子イオン ($C_{17}H_{22}NO_4$) の理論値は、304.1548 であり、EIC の質量範囲を、アトロピンで 290.1650~290.1850、スコポラミンで 304.1450~304.1650 に設定してイオンを選択した。

Fig.5, Fig.6 のマススペクトルより、検体 1 で検出されたピークの精密質量の実測値は 290.1759 および 304.1546 であった。この値とアトロピンおよびスコポラミンの精密質量理論値との質量誤差はそれぞれ、0.97 ppm、-0.93 ppm であり、アトロピン、スコポラミンの存在が高い信頼性で確認できた。また、EIC ピーク面積により定量計算した結果、アトロピン 469 µg/g、スコポラミン 5.68 µg/g となり、LC/MS での定量値とほぼ一致した。これより、アトロピンおよびスコポラミンの含有が再確認できた。

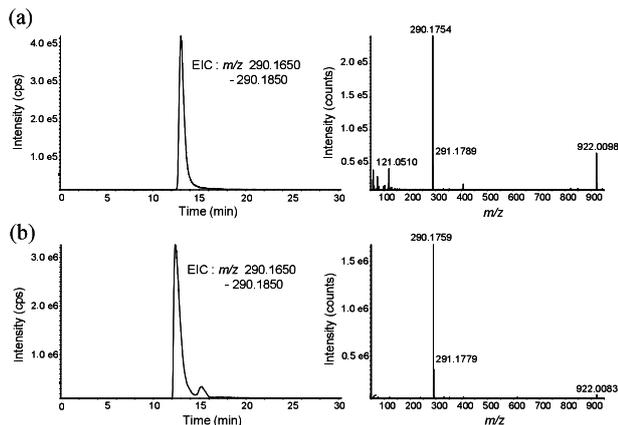


Fig.5 Extracted ion chromatograms and mass spectra of atropine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/TOF-MS.

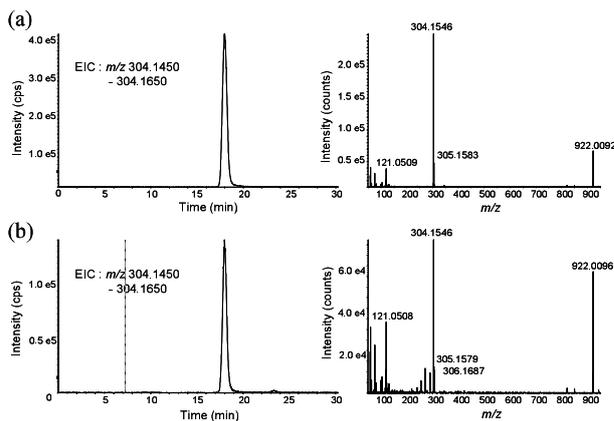


Fig.6 Extracted ion chromatograms and mass spectra of scopolamine standard (2 µg/mL) (a) and sample extract (b) by LC/TOF-MS.

IV まとめ

チョウセンアサガオは根茎がゴボウと類似し、誤食による食中毒事例がしばしば発生している^{3, 5, 6, 8, 10-15}。兵庫県内でも、1994年¹⁶、1996年(神戸市)¹⁷、2003年¹⁸にそれぞれモロヘイヤやゴボウ等と誤解したことによる食中毒事例が報告されている。

今回、チョウセンアサガオと推定される植物の根茎中のアトロピンおよびスコポラミンを、LC/MSを用いて分析し、アトロピン 425 µg/g、スコポラミン 4.57 µg/gを検出した。さらにLC/TOF-MSを用いて両化合物の存在を再確認した。

アトロピンのヒト経口中毒量は5~10 mg (硫酸アトロピンとして)と報告されており¹⁹、本事例の「ゴボウ」の場合、約10 g摂取すると中毒量に達すると推定された。またスコポラミンの経口中毒量は3~5 mgであり²⁰、約650 g摂取すると中毒量に達することになる。

今回の事例では、喫食残品は入手できなかったが、以上の結果から、チョウセンアサガオの誤食であることを確認できた。

謝辞

試料採取、情報収集して頂きました柏原健康福祉事務所および県生活衛生課の関係者の方々に深謝致します。

文献

- 1) 第十五改正日本薬局方 p.1278-1279, 厚生労働省(2006)
- 2) 宮武ノリエ, 重岡捨身, 寺島 潔, 長嶋真知子, 上原真一, 秋山和幸: 高速液体クロマトグラフィーによる胃腸薬中のヒョスチアミンの定量. 東京衛研年報, **41**, 47-50(1990)
- 3) 岡山明子, 青木喜也, 田原俊一郎, 氏家英司, 田中 健, 佐々木美智子: 雑煮に混入したトロパンアルカロイドの検出. 奈良県衛生研究所年報, **29**, 45-47(1995)
- 4) 高橋美佐子ら: 第33回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p.148-149(1996), 京都
- 5) 小阪妙子, 山本雄三, 小野和則, 武田 攻: チョウセンアサガオによる食中毒事例. 宮崎県衛生環境研究所年報, **10**, 115-119(1998)
- 6) 伊藤 健, 笠原義正, 齋藤一夫, 本間弘樹: チョウセンアサガオによる食中毒. 山形衛生所報, **33**, 18-22(2000)
- 7) 多田裕之, 白木康一, 吉田 勲, 中屋謙一, 飯沼宗和: 固相抽出によるハシリドコロ及びヒト血清中のアトロピン, スコポラミンの分析法. 岐阜県保健環境研究所報, **9**, 29-34(2001)
- 8) 北野隆一, 茶谷祐行, 小川隆男, 竹前道夫: 炊き込みご飯中に混入したトロパンアルカロイド類の検出. 京都府保環研年報, **47**, 52-55(2002)
- 9) 福田達男, 高橋美佐子, 荒金真佐子, 吉澤政夫, 鈴木幸子, 森本陽治, 安田一郎: 植物系ドラッグダ

- ツラシードの鑑定に関する研究. 東京健安研七
年報, 55, 61-66(2004)
- 10) Steenkamp, P.A., Harding, N.M., van Heerden
F.R. and van Wyk B.-E. : Fatal *Datura*
poisoning: identification of atropine and
scopolamine by high performance liquid
chromatography / photodiode array/mass
spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 145, 31-39
(2004)
 - 11) 横田洋一, 高橋 敏, 寺崎さち子, 田中彰雄, 村
上守一: チョウセンアサガオ属のアルカロイドの
分析について. 富山県薬事研究所年報, 34, 29-34
(2007)
 - 12) 山辺真一, 肥塚加奈江, 田邊英子, 北村雅美, 今
中雅章: LC/MS/MS による食品中のアトロピン,
スコポラミンの迅速定量. 岡山県環境保健センタ
ー年報, 31, 127-132(2007)
 - 13) 小西友彦ら: 第 94 回日本食品衛生学会学術講演
会講演要旨集, p. 52(2007), 静岡
 - 14) 松田貴美子, 森永睦子, 岡本 操, 宮崎修平, 石
丸 剛, 鈴木幸一郎, 通山 薫: 中毒分析が有用であ
ったチョウセンアサガオ中毒の一症例について.
臨床病理, 54, 1003-1007(2006)
 - 15) 仲村佳彦, 荒武憲司, 藤田あゆみ, 金村剛宗, 西
田武司, 田中 仁, 友尻茂樹: 定量分析が可能であ
ったチョウセンアサガオ中毒の 2 例. 中毒研究,
21, 177-181(2008)
 - 16) 兵庫県保健環境部生活衛生課: 兵庫県食中毒事
件録 平成 6 年 (1996)
 - 17) 兵庫県健康福祉部生活衛生課: 兵庫県食中毒事
件録 平成 8・9 年 (1999)
 - 18) 兵庫県健康生活部生活衛生課: 兵庫県食中毒事
件録 平成 15 年 (2004)
 - 19) 吉村正一郎, 早田道治, 山崎 太, 森 博美: 急性
中毒情報ファイル, p. 484, 廣川書店, 東京 (1996)
 - 20) 日本中毒情報センター: 急性中毒処置の手引,
p. 564-565, 薬業時報社, 東京 (1999)