

## 4) ツキヨタケ中毒成分イルジン S の分析

### - イルジン S の単離精製 -

吉元 秀和 飛野 敏明 濱田 寛尚 村川 弘

#### はじめに

平成 18 年から平成 22 年までの 5 年間において、キノコによる食中毒は全国で発生件数 299 件、患者数 921 名であり<sup>1)</sup>、自然毒による食中毒の中で最も多い。特に平成 22 年は、誤食による食中毒が例年以上に発生した。この年は幸い本県での被害は確認されなかったものの、過去の発生状況も踏まえ、健康危機管理上、注視する必要がある。

毒キノコによる食中毒のなかでも、発生頻度が比較的高いものに、ツキヨタケによる食中毒がある。先に示した過去 5 年間のキノコによる食中毒のうち、ツキヨタケによる食中毒は、全国で 87 件、患者数 310 名、九州で 4 件、患者数 7 名、本県で 2 件、患者数 3 名である<sup>1)</sup>。ツキヨタケはシタケやヒラタケなどと誤認されやすく、喫食後 30 分から 3 時間で、嘔吐、腹痛、下痢などの症状を呈する<sup>2)</sup>。ツキヨタケの有毒成分としてイルジン S (図 1) が挙げられるが、これは、標準品として市販されていない。以上を踏まえ、今回イルジン S の確認条件を整えるとともに単離分取について検討したので報告する。

#### 調査方法

##### 1 試料

ツキヨタケ (平成 19 年 10 月に本県にて発生した食中毒において、有症者が採取した当該品の残り (152.6g) をいただき試験に供した。)

##### 2 装置及び分析条件

1) LC/MS/MS (高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計)

・ LC: Waters 社製 Waters2795

分析カラム: GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3 (3.0 × 100mm, 4µm), 注入量: 5µl, カラム温度: 40℃, 移動相: 水: メタノール: 0.5%ギ酸 = 67:30:3 (イソクラティック), 流速: 0.2mL/min

・ MSMS: Waters 社製 Quattro Premier

イオン化法: ESI, 分析モード: MRM (ポジティブ), 定量イオン: 265[M+H]<sup>+</sup>>247, 確認イオン: 265[M+H]<sup>+</sup>>95, Capillary 電圧: 3.45kV,

Source Temperature: 120℃, Desolvation Temperature: 400℃, Cone Gass Flow: 50L/h, Desolvation Gass Flow: 1000L/h

なお、標準品が市販されていないため、定量イオン、確認イオンについては、笠原ら、小坂らの報告<sup>3), 4)</sup>を参考に設定した。

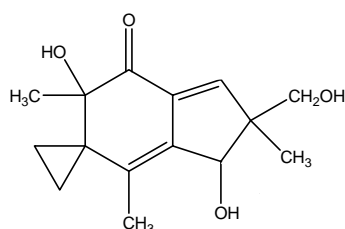


図 1. イルジン S の構造 (Mw=264)

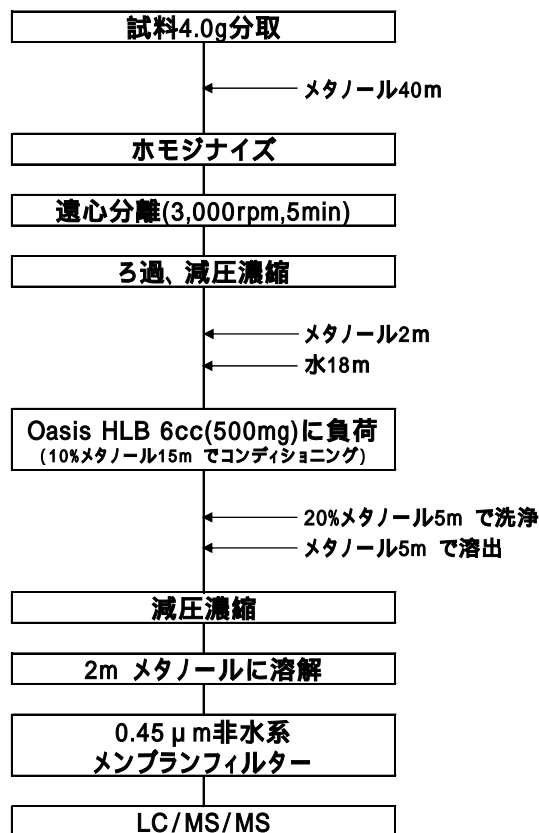


図 2 LC/MS/MS 分析法フロー

2) GPC (ゲルろ過クロマトグラフィー)

ポンプ: 島津社製 LC-10AT, GPC カラム: Shodex

EV-2000, 移動相:シクロヘキサン:酢酸エチル=7:3 (イソクラティック),流速:4ml/min,画分:17.3~20.0分(画分量:10ml)

3)HPLC-PDA (PDA:フォトダイオードアレイ検出器)

・HPLC:島津社製 LC-10A

分析カラム: GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3 (3.0×100,4μm),注入量:20μl,カラム温度:40,移動相:水:メタノール=7:3 (イソクラティック),流速:0.8ml/min

・PDA:島津社製 SPD-M10A

測定波長:200~800nm

### 3 確認条件設定における前処理

笠原らの方法<sup>3)</sup>に準拠して,操作を行った(図2)。

### 4 単離分取

図7のとおり,抽出操作を行い,GPCにて分画,HPLC-PDAにて相対純度を測定した。

## 結果及び考察

### 1 確認条件の設定

質量分析計の最適なコーン電圧(CV)及びコリジョンエネルギー(CE)を確認するため,まずはじめにSIRモードで,CVを5~40Vと変化させ,イルジンSのプロトン付加体の質量電荷比(m/z):265の感度を比較した。その結果,10Vが最も感度が良かった(図3)。次に,MRMモードを用い,m/z:265をプレカーサーイオンとし,CEについても同様に確認したところ,プロダクトイオン247では5eVが,95では15eVが最も感度が良かった(図4,5)。

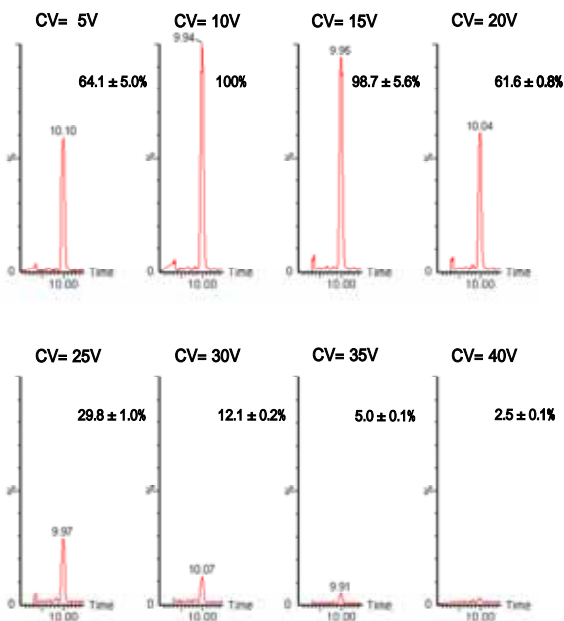


図3 最適CV確認(n=3)

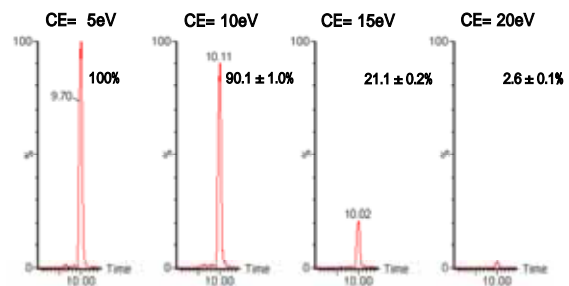


図4 定量イオン(265>247)最適CE確認(n=3)

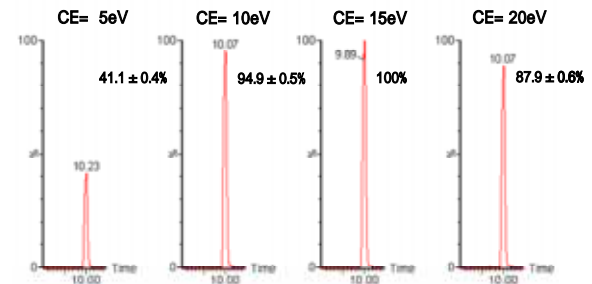


図5 確認イオン(265>95)最適CE確認(n=3)

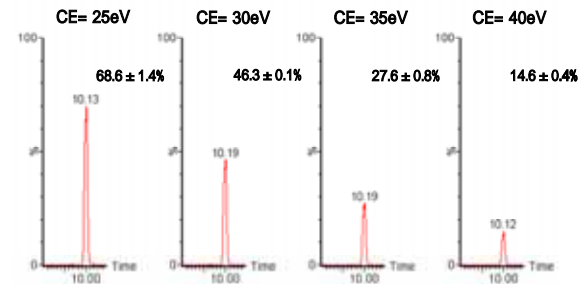


図6 確認イオン(265>95)最適CE確認(n=3)

このことから,m/z:265,247,95をそれぞれ定量用,確認用とし,CV,CEを表1のとおりに設定した。なお,プロダクトイオン247はCE=25~40eVの範囲において検出されなかった。

表1 定量,確認イオンのCV,CE

	CV(V)	CE(eV)
定量イオン(265>247)	10	15
確認イオン(265>95)	10	5

### 2 単離分取

図2に示すように,イルジンS抽出の最終溶媒がメタノールであるため,GPC溶出液であるシクロヘキサン:酢酸エチル=7:3に置換した場合のイルジンSの損失の程度を確認した。メタノール抽出液2mlを窒素気流中で乾固した後,適量のシクロヘキサン:酢酸エチル=7:3を加え,ガラスウール(繊維径1μm,GLサイエンス社製)にてろ過後,濃縮乾固し,メタノール2mlに再溶解し,LC/MS/MSを用いて測定した。対照とし

て、シクロヘキサン：酢酸エチル=7:3 に置換してないものも測定し両者のピーク面積を比較した(図 6)。溶媒置換をしてないもののピーク面積を 1 とした場合、置換したもののピーク面積は  $1.00 \pm 0.03$  ( $n=3$ ) であり、溶媒の置換による損失はほとんどないことが確認された。

これにより、図 7 に示すとおり抽出操作を行い、GPC を用いて極大吸収波長 235nm, 320nm が確認された画分(図 8 の網掛部分)を分取した。

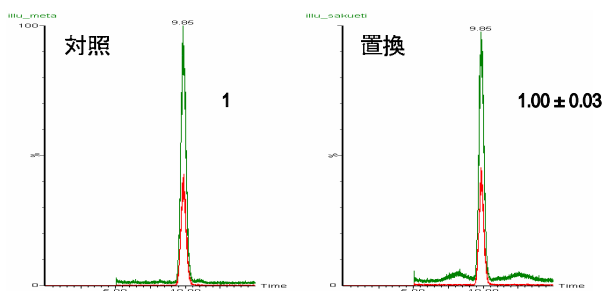


図 6 シクロヘキサン：酢酸エチル=7:3 に置換した場合のピーク面積比較(左：対照，右：置換)

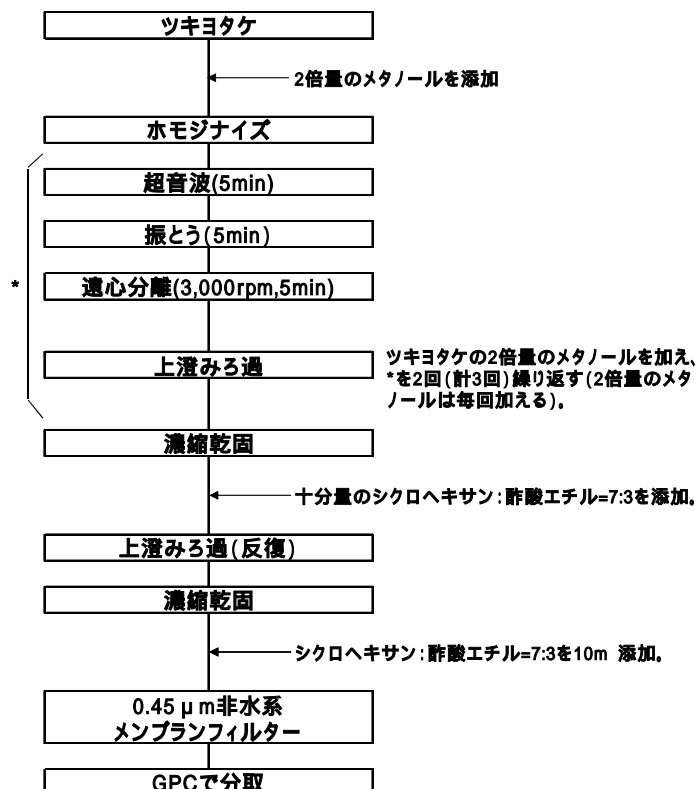


図 7 イルジン S 抽出フロー

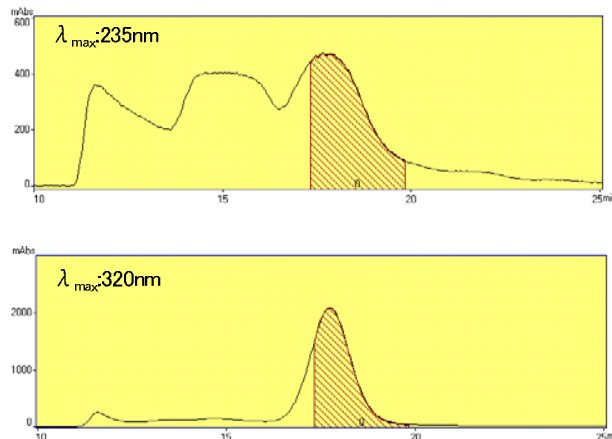


図 8 イルジン S の分取(上：235nm，下：320nm) 17.3~19.8分(画分量：10m)

### 3 純度確認

LC/MS/MS を用いた分析において、定量イオン及び確認イオンの保持時間が一致すること及び、マススキャンデータ(図 9)が笠原ら、小坂らの報告<sup>3),4)</sup>と一致していることから、分取した化合物はイルジン S であると判断した。

HPLC-PDA を用い、精製物のピーク面積と溶媒のみのピーク面積を測定し、面積百分率法による相対純度を求めた<sup>5)</sup>。波長は、極大吸収波長(235nm, 320nm)及び、その前後の夾雑ピークが見られる吸収波長 210nm, 254nm 及び 350nm (計 5 波長)を用いた。その結果、純度は 96.7~99.5%であり、平均  $97.9 \pm 1.1\%$ であった。

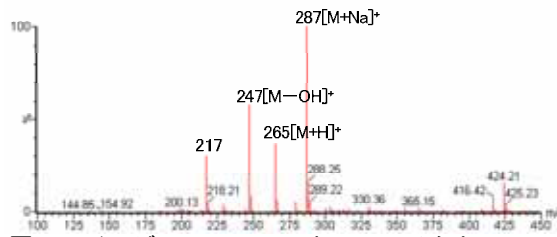


図 9 イルジン S のマススキャンスペクトル

### まとめ

今回、イルジン S の確認条件を設定し、さらに GPC を用いて簡易に、ツキヨタケから一定の純度を有するイルジン S を単離精製することができた。このことにより、ツキヨタケ中毒について、試験に対応可能な体制を整えることができた。

文献

- 1) 厚生労働省ホームページ  
( <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-3> )
- 2) 田島眞，豊田正武編：食品衛生学，95-98，同文書院，( 1998 ) .
- 3) 笠原義正，伊藤健：食品衛生学雑誌，50，167-172  
( 2009 ) .
- 4) 小坂妙子，浜田洋彦，中村公生：宮崎県衛生環境研究所報，16，62-64 ( 2004 ) .
- 5) 第 16 改正日本薬局方