

3 調査研究

3・1 報 文

1) LC/MS/MS を用いたクワズイモ中シュウ酸の

迅速分析法の検討

西名武士 村川 弘 宇梶徳史 濱本 愛
松本理世 増永ミキ 野田康平

要旨

食中毒の原因を迅速に特定するため、試料に 10%塩酸又は水を加え、ろ過後 LC/MS/MS を用いて定量するクワズイモ中シュウ酸の迅速分析法の検討を行った。また、上記分析法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に基づく妥当性評価試験を行ったところ、目標値を満たす良好な結果が得られた。

キーワード：LC/MS/MS，クワズイモ，シュウ酸，食中毒

はじめに

クワズイモは、四国南部から 中国南部，東南アジアの亜熱帯地域に分布しているサトイモ目サトイモ科クワズイモ属の常緑性多年草である。また，クワズイモは，不溶性のシュウ酸カルシウムを多量に含んでおり，喫食した場合，この針状結晶が粘膜に刺さり，口腔粘膜に激しい炎症を起こすなどの中毒症状を発症すると考えられている^{1, 2)}。

クワズイモは，葉及び葉柄の様子がサトイモとよく似ていることから，誤って喫食することによる食中毒事例が後を絶たず，過去10年間で40人以上の中毒患者が発生している¹⁾。このため，食中毒の原因食材としてクワズイモの分析が必要となるケースは多く，本県においても，平成27年9月に，クワズイモをサトイモと誤認して味噌汁として喫食したことによる食中毒事例が発生し，その対応が求められた。

クワズイモが原因と疑われる食中毒の発生時には，食品残品の確認により，形態形質から原因の特定が可能なこともあるが，クワズイモが調理過程を経て原型をとどめていないことも想定される。この場合，顕微鏡観察によるシュウ酸カルシウムの針状結晶の確認が

有効だが，サトイモ科の植物にはシュウ酸カルシウムの針状結晶が存在することがあり，これのみでは原因の特定は困難であると考えられる。なお，クワズイモは他のサトイモ科の植物に比べ不溶性シュウ酸の含有量が多く，また，そのほとんどがシュウ酸カルシウムとして存在している³⁾。このため，理化学試験により不溶性シュウ酸の含有量を明らかにすることは，食中毒の原因の特定において重要であると考えられる。

クワズイモ中の不溶性シュウ酸の分析は，シュウ酸の分析によって不溶性シュウ酸濃度を推定する手法が多く用いられ，シュウ酸の分析法としては，酵素法⁴⁾，高速液体クロマトグラフ法^{5, 6)}，ガスクロマトグラフ法⁶⁾，イオンクロマトグラフ法³⁾，キャピラリー電気泳動法⁷⁾などが報告されている。なお，これらの手法は，用いられる測定機器の性質上，迅速性，感度及び選択性の面で問題があることが多い。

そこで，今回，クワズイモが原因と疑われる食中毒の発生時に，迅速に原因の特定が可能な分析法の開発を目的に，高感度，かつ，高選択性のLC/MS/MSを用いたクワズイモ中シュウ酸の迅速分析法の検討を行った。また，本法について，「食品中に残留する農薬等

に関する試験法の妥当性評価ガイドライン⁸⁾（以下「ガイドライン」という。）に基づく妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試薬等

1.1 標準品

シュウ酸：シュウ酸二水和物（和光純薬工業製特級）
シュウ酸カルシウム：シュウ酸カルシウム一水和物（和光純薬工業製特級）

1.2 その他の試薬等

アセトニトリル：和光純薬工業製（HPLC 用）
塩酸：関東化学製（有害金属測定用）
水：精製水
ガラスロート：IWAKI 製 11G2
ろ過フィルター：Agilent 製 (Econofltr PTFE, 0.2 μ m)
バイアル：GL Sciences 製(ポリプロピレン製, 1.5mL)

1.3 標準原液

シュウ酸二水和物を秤量後、水に溶解して 1000mg/L の標準原液を調製した。

1.4 標準溶液

標準原液を 10, 50, 100, 250 及び 500 μ g/L になるように、75%アセトニトリル溶液で希釈したものを用いた。

2 試料

2.1 検討用試料

サトイモをフードプロセッサーで細切したものを用いた。

2.2 妥当性評価試験用試料

過去のクワズイモ食中毒事例において検出されたシュウ酸濃度を参考に、上記 2.1 で示した試料に、シュウ酸又はシュウ酸カルシウムの標準品を 2500 μ g/g とするよう添加し、30 分間放置したものを用いた。

3 LC/MS/MS 測定条件

LC：Nexera X2（島津製作所社製）

- ・注入量：5 μ L
- ・分離カラム：Merck 社製 ZIC®-pHILIC (2.1 \times 50mm, 5 μ m)
- ・カラムオープン温度：60 $^{\circ}$ C
- ・移動相：10mM 酢酸アンモニウム含有水アセトニトリル溶液 (25:75)
- ・流量：0.6mL/min

MS/MS：TRIPLEQUAD5500(ABSCIEX 社製)

- ・イオン化法：ESI(negative)

- ・イオン化条件：CUR(20psi),CAD(7psi),TEM(650 $^{\circ}$ C), GAS1(80psi),GAS2(70psi),IS(-4500V),EP(-10V)
- ・分析モード：MRM（測定条件は表 1 のとおり。）

4 検討用分析法

4.1 不溶性シュウ酸の算出法

総シュウ酸（不溶性シュウ酸塩及び可溶性シュウ酸塩由来のシュウ酸）及び可溶性シュウ酸（可溶性シュウ酸塩由来のシュウ酸）の濃度から、不溶性シュウ酸（ \equiv シュウ酸カルシウム）を算出することとした。

$$\text{不溶性シュウ酸} = \text{総シュウ酸} - \text{可溶性シュウ酸}$$

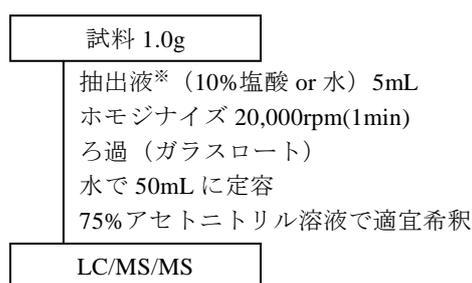
4.2 前処理法

小坂ら³⁾の報告を参考に、総シュウ酸と可溶性シュウ酸を個別に抽出する下記前処理法を考案し、分析法の検討を行った。

2 で調製した試料 1.0g に抽出液 5mL を加えてホモジナイズし、ガラスロートを用いてろ過後、水で 50mL に定容する。これを 75%アセトニトリル溶液で適宜希釈する。なお、抽出液は、総シュウ酸の場合は 10%塩酸を用い（以下「総シュウ酸系」という。）、可溶性シュウ酸の場合は水を用いる（以下「可溶性シュウ酸系」という。）（図 1）。

表 1 MS/MS 測定条件

Compound	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
oxalic acid	89.0	60.8	-45	-12
	89.0	45.0	-40	-12
	89.0	35.0	-40	-12



※総シュウ酸の場合は 10%塩酸、可溶性シュウ酸の場合は水を用いる。

図 1 前処理フロー

結果及び考察

1 測定条件の検討

まず、MS 部の測定条件を決定するため、シュウ酸標準溶液 50 μ g/L をインフュージョンにより直接 MS 部に導入し、イオン化条件を検討した。その結果、ESI 法、ネガティブモードで [M-H]⁻の脱プロトン化イオンが出現し、表 1 に示す条件が最適となった。

次に、HPLC のカラム及び移動相条件の検討を行った。シュウ酸は低分子量高極性化合物 (図 2) であり、HPLC 分析で広く用いられる逆相クロマトグラフィーではカラムでの保持は困難である。なお、近年、シュウ酸を親水性相互作用クロマトグラフィー (以下「HILIC」という。) を用いて分析する手法が報告⁹⁾¹⁰⁾されている。また、当所では、過去に、HILIC カラムを用いたヒスタミン等の低分子量高極性化合物の分析法を報告^{11~13)}していることから、これらを参考に Merck 社製 ZIC-pHILIC を用い、移動相条件の検討を行った。

その結果、シュウ酸は、水:アセトニトリル (25:75) 及び酢酸アンモニウム 10~200mM 程度の存在下で良好な保持が得られるが、脱プロトン化イオンをモニターしているため、酢酸アンモニウム濃度が上昇するとイオン化抑制により感度が低下する傾向を示した。また、モニターしているイオンの範囲が 35~89m/z と比較的小さく、ベースライン変動の影響を受けやすいため、グラジエント分析では測定が困難であった。このことから、保持と感度を両立させるため、移動相は 10mM 酢酸アンモニウム含有水アセトニトリル (25:75) 溶液を用い、イソクラテック分析を行うこととした。本条件で測定したシュウ酸のクロマトグラフを図 3 に示す。

なお、シュウ酸のピークはテーリングが大きかったため、測定再現性を確認するため繰り返し測定 (500µg/L, n=5) による評価を行った。また、定量範囲を確認するため、シュウ酸の各濃度の混合標準液 (10, 50, 100, 250 及び 500µg/L) を本条件で測定し、得られた検量線の相関係数及び定量限界に対応する濃度 (10µg/L, 以下「下限値」という。) から得られるピークの S/N 比を求めた。これらの結果を表 2 及び図 4 に示す。

表 2 に示すとおり、保持時間の変動 (RSD%) は 0.21%、ピーク面積の変動 (RSD%) は 0.22% であり、食中毒の原因検索分析に用いる測定条件としては十分な再現性が得られた。なお、測定範囲 10~500µg/L において良好な相関 (r=1.0000) 及び直線性が得られ、また、下限値の S/N 比がガイドラインに示されている定量限界の指標値 (S/N 比 ≥ 10) を満たしていることから、10~500µg/L の範囲で定量が可能であることが確認できた。

表 2 測定再現性等の評価結果

Compound	Rtime		Area		Correlation coefficient (r)	Signal/Noise ratio
	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)		
Oxalic acid	4.05	0.21	4.3E+05	0.22	1.0000	26.4

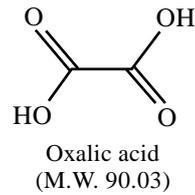


図 2 シュウ酸の構造式

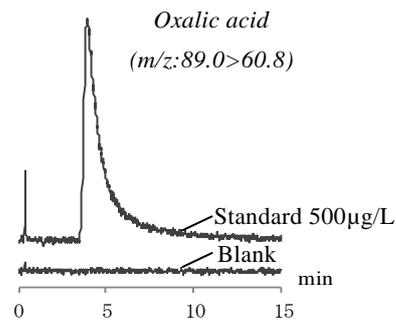


図 3 シュウ酸のクロマトグラフ

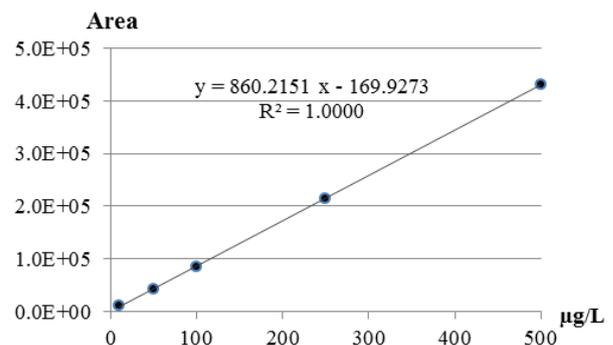


図 4 シュウ酸の検量線

2 希釈倍率の検討

LC/MS/MS を用いた分析では、試験溶液中の夾雑物の影響により、目的成分のイオン化抑制又はイオン化促進 (以下「マトリックス効果」という。) が起こり、その測定強度が変動するため、精製操作を行わない前処理法においては定量分析の障害となり易い。したがって、今回用いる前処理法も、精製操作を行わない簡易なものであることから、マトリックス効果による定量障害が懸念された。

なお、マトリックス効果による定量障害を防止する手法として、マトリックス一致標準溶液を用いたマトリックス検量線による定量法が知られているが、目的物質の濃度が既知のマトリックス用検体の確保が必要

であるため、食中毒の原因検索分析法としては現実的ではない。

一方で、一般的にマトリックス効果は、試験溶液中のマトリックス量が多いほど大きくなるため、試験溶液の希釈により試料由来のマトリックス効果を低減することができると考えられた。

そこで、クワズイモと同科のサトイモを用い、5.2 前処理法中の希釈段階において、希釈倍率を変化（最終希釈倍率として 500, 1,000, 2,000, 5,000, 10,000, 20,000 倍）させ、マトリックス効果の検証を行い、最適な希釈倍率の検索を行うこととした。

なお、前処理は、総シュウ酸系では抽出液に 10%塩酸を用い、また、可溶性シュウ酸系では抽出液に水を用いるため、この抽出溶媒の違いによって LC/MS/MS に注入する試験溶液の組成が異なることになる。したがって、試料由来のマトリックス効果の他に、抽出溶媒由来のマトリックス効果の検証も必要であると考えられた。このため、各系のサトイモ抽出液を 1mL 分取し、シュウ酸濃度 250 μ g/L となるように標準溶液を添加したもの（以下「マトリックス標準」という。）と、別途同操作を行ったブランクに、同様に標準溶液を添加したもの（以下「ブランク標準」という。）をそれぞれ LC/MS/MS にて測定し、ピーク面積の比（%、以下「強度比」という。）を算出することにより、試料由来及び抽出溶媒由来のマトリックス効果の検証を行うこととした。マトリックス標準とブランク標準の関係を表 3 に、それぞれの強度比を図 5 に示す。

まず、試料由来のマトリックス効果を検証するため、抽出系ごとにマトリックス標準（総シュウ酸系：TM、可溶性シュウ酸系：SM）とブランク標準（総シュウ酸系：T、可溶性シュウ酸系：S）を比較した。その結果、それぞれ 500 倍及び 1,000 倍希釈では、TM/T 及び SM/S が 110~120% 程度となり、正のマトリックス効果が見られた。なお、2,000 倍希釈以上では強度比はほぼ 100% となり、マトリックス効果は無視できると考えられた。

次に、抽出溶媒由来のマトリックス効果を検証するため、T と S を比較したところ、500 倍から 5,000 倍希釈では、T/S が 50%~80% 程度となり、負のマトリックス効果が見られた。なお、希釈倍率 10,000 倍以上では強度比はほぼ 100% となり、マトリックス効果は無視できると考えられた。

さらに、試料と抽出溶媒由来双方のマトリックス効果を検証するため、TM と S を比較したところ、上記抽出溶媒由来のマトリックス効果と同様の傾向が見られた。

以上により、今回の前処理法では、希釈倍率が低い

場合は試料由来及び溶媒抽出由来のマトリックス効果があり、特に比較的溶媒由来のマトリックス効果が大きいことが明らかになった。一方で、希釈倍率を 10,000 倍以上にすると、その影響は無視でき、マトリックス検量線によらない定量が可能であることが示唆された。このことから、前処理に際しては、検出感度を考慮し、10,000 希釈を採用することとした。

また、S は、標準原液を単に 75%アセトニトリルで希釈したものと溶媒組成が等しいことから、75%アセトニトリルで希釈した標準溶液を用いることにより、総シュウ酸及び可溶性シュウ酸の定量が可能であると考えられた。

なお、試料を 10,000 倍希釈した場合の定量下限値は、クワズイモ中のシュウ酸濃度として 100 μ g/g となる。これは、過去のクワズイモ食中毒事例において検出された総シュウ酸濃度が 1,000~5,000 μ g/g 程度^{3, 5, 7)}であることから、その数 10 分の 1 であり、クワズイモを対象とした分析法としては十分と考えられる。

表 3 希釈倍率検討用標準液一覧

Name	Type		Extraction
	Oxalic acid	Sample	
TM	Total	Matrix	10% HCl
T	Total	Blank	10% HCl
SM	Soluble	Matrix	H ₂ O
S	Soluble	Blank	H ₂ O

Concentration of oxalic acid : 250 μ g/L
Solvent composition : 75% ACN

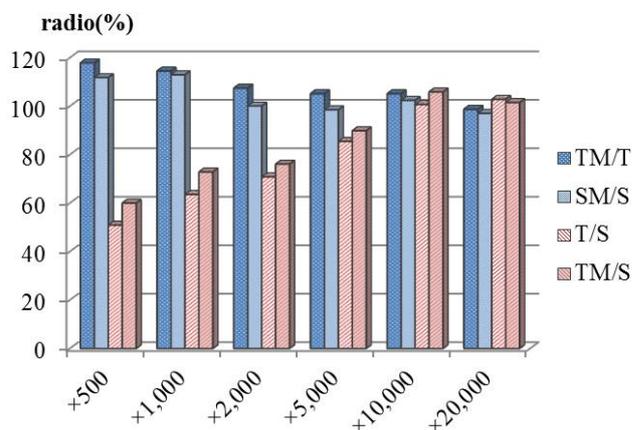


図 5 マトリックス効果の検証 (n=1)

以上の検討結果を踏まえ、クワズイモ中シュウ酸の迅速分析法（以下「本法」という。）を作成した（図 6）。

試料 1.0g
抽出液* (10%塩酸 or 水) 5mL ホモジナイズ 20,000rpm(1min) ろ過 (ガラスロート) 水で 50mL に定容 75%アセトニトリル溶液で 200 倍希釈 (最終希釈倍率 10,000 倍) ろ過 (フィルター)
LC/MS/MS

※総シュウ酸系：10%塩酸 可溶性シュウ酸系：水

図 6 分析法フロー

3 妥当性評価試験

本法について、2.2 妥当性評価試験用試料を用いて、ガイドラインに基づき、分析者 5 名、2 併行での添加回収試験を実施し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。なお、添加回収試験において添加する標準品は、不溶性シュウ酸としてシュウ酸カルシウムを、可溶性シュウ酸としてシュウ酸を用い、それぞれを添加した試料について、総シュウ酸及び可溶性シュウ酸の定量を行った。また、試料に用いたサトイモにも、不溶性シュウ酸及び可溶性シュウ酸が含まれているため、真度等の算出に当たっては、それらの値を減算した値を用いた。その結果を表 4 に示す。

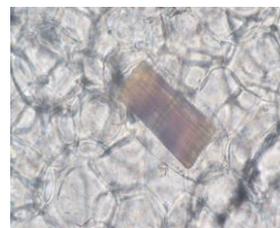
表 4 に示すとおり、総シュウ酸系においてシュウ酸カルシウムを添加した場合には、真度 (87.8%)、併行精度 (2.2%) 及び室内精度 (3.0%)、シュウ酸を添加した場合には、真度 (87.2%)、併行精度 (3.0%) 及び室内精度 (3.0%) となり、双方ともガイドラインに示される添加濃度 0.1mg/kg<の目標値 (真度：70～120%，併行精度：10%>，室内精度：15%>) を満たす良好な結果が得られた。このことから、総シュウ酸系では、総シュウ酸(不溶性シュウ酸+可溶性シュウ酸)

シュウ酸カルシウムを添加した場合には、真度 (0.0%) となり、可溶性シュウ酸系では不溶性シュウ酸は抽出されなかった。このことから、可溶性シュウ酸系では、可溶性シュウ酸を選択的に分析することが可能であると考えられる。

なお、本法を用いて、本県でのクワズイモ食中毒発生時に搬入された検体(未調理クワズイモの根茎部分、図 7 及び 8 参照) を、分析 (n=5) したところ、不溶性シュウ酸として 1000µg/g (RSD%：3.4%)、可溶性シュウ酸として 330µg/g (RSD%：6.3%) が検出され、過去のクワズイモ食中毒事例の報告値と同等であったとともに、良好な再現性が得られた。



図 7 クワズイモ写真



(防御的針状結晶)



(非防御的針状結晶)

図 8 細胞の顕微鏡観察 (×400, 透過処理：組織切片に 2N-NaOH 水溶液 1mL を加え 2 時間浸漬¹⁴⁾)。

表 4 妥当性評価試験結果

Type	Extraction	Compound	Colocasia esculenta		
			Trueness (%) ^{*1}	RSDr (%) ^{*2}	RSDwr (%) ^{*3}
Total	10%HCl	Calcium oxalate	87.8	2.2	3.0
		Oxalic acid	87.2	3.0	3.0
Soluble	H ₂ O	Calcium oxalate	0.0	—	—
		Oxalic acid	94.6	2.6	3.4

*1 Mean recovery rates(%)

*2 RSD(%) of repeatability

*3 RSD(%) of within-laboratory repeatability(n=2×5)

の分析が可能であると考えられる。

また、可溶性シュウ酸系においてシュウ酸を添加した場合には、真度 (94.6%)、併行精度 (2.6%) 及び室内精度 (3.4%) となり良好な結果が得られたが、シ

まとめ

食中毒の迅速な原因特定に資するため、試料に 10% 塩酸又は水を加え、ろ過後 LC/MS/MS を用いて定量するクワズイモ中シュウ酸の迅速分析法の検討を行った。

また、本法について、サトイモを用いた妥当性評価試験を行ったところ、ガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られ、総シュウ酸及び可溶性シュウ酸の分析が可能であった。

本法は、マトリックス一致標準溶液を用いないため、突発的に発生する食中毒に対して対応が可能であり、また、使用する溶媒等が少なく分析にかかる費用も安価で、かつ、操作が簡便なため、その前処理時間も1検体当たり30分程度と短いことから、クワズイモを原因とする食中毒発生時の原因検索分析法として非常に有効な手法であると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル，http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/poison/（2016/7/1）。
- 2) 後藤哲久，佐藤吉朗，吉田充：食品危害要因その実態と検出法，（株）テクノシステム，343-349（2014）。
- 3) 小坂妙子，山本雄三，小野和則，武田攻：宮崎県衛生環境研究所年報，11，77-80（1999）。
- 4) 厚生労働省：平成12年3月30日付け厚生省生活衛生局食品化学課長通知，衛化第15号。
- 5) 熊野眞佐代，石飛栄二，石崎修造，八並誠：長崎県衛生公害研究所報，46，83-85（2000）。
- 6) 関口昭博，吉野功：群馬県産業技術センター研究報告，127，26-30（2013）。
- 7) 森岡浩文，樺山恭子，小玉義和：宮崎県衛生環境研究所年報，20，91-93（2008）。
- 8) 厚生労働省：平成22年12月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発1224第1号。
- 9) MERCK KGaA：“A Practical Guide to HILIC”，p.22（2008）。
- 10) GL Sciences：LC Technical Note，109，（2012）。
- 11) 吉田達雄，濱田寛尚，吉元秀和，飛野敏明，村川弘：熊本県保健環境科学研究所報，40，20-24（2010）。
- 12) Tatsuo Yoshida, Hirotoishi Hamada, Hiroshi Murakawa, Hidekazu Yoshimoto, Toshiaki Tobino, Kei Toda：ANALYTICAL SCIENCES，28，179-182（2012）。
- 13) 西名武士，飛野敏明，宇梶徳史，濱本愛，松本理世，増永ミキ，野田康平，村川弘：熊本県保健環境科学研究所報，44，38-47（2014）。
- 14) 田中政信，中島寿亀，森欣也：園芸学会雑誌，72，162-168（2003）。