

麦角アルカロイド一斉分析法開発



○佐野勇気¹、高橋洋武¹、橋田規¹、照井善光¹、望月直樹²

¹（一財）日本食品検査、² 横浜薬科大学

一般財団法人
日本食品検査

【背景・目的】

麦角とは、*C. purpurea*に代表される麦角菌種が産生する菌核で、ライ麦をはじめ、小麦、大麦、オート麦など多くの穀物に寄生する。この麦角中に含まれる麦角アルカロイド類はヒトの循環器系や神経系に毒性を示し、様々な健康被害を引き起こしてきた。代表的なものに、Ergometrine、Ergotamine、Ergosine、Ergocristine、ErgocryptineおよびErgocornine、並びにこれらのepimerである-inine類がある（図1）。EUでは2012年から、穀物、穀物飼料用の牧草、イネ科牧草および配合飼料等を対象にこの12分析種のモニタリングが実施され、2015年には特定の未加工穀類に対し、総量として0.5 g/kgの基準値が設定された。わが国においても今後汚染実態調査に乗り出す動きがあるため、それに先駆け我々はLC-MS/MSによる麦角アルカロイド類12種の一斉分析法を構築したところである¹⁾。

今回、本分析法を改良するために種々の検討を行った。UHPLCシステムを用いることで全ての分析種が5分間で溶出する高速一斉分析法を構築し、加えて理論段数の高いピークが得られたことにより高感度化が達成され、さらに低濃度での分析が可能となった。小麦及び大麦を対象に本分析法の性能評価を行ったので、その結果を報告する。

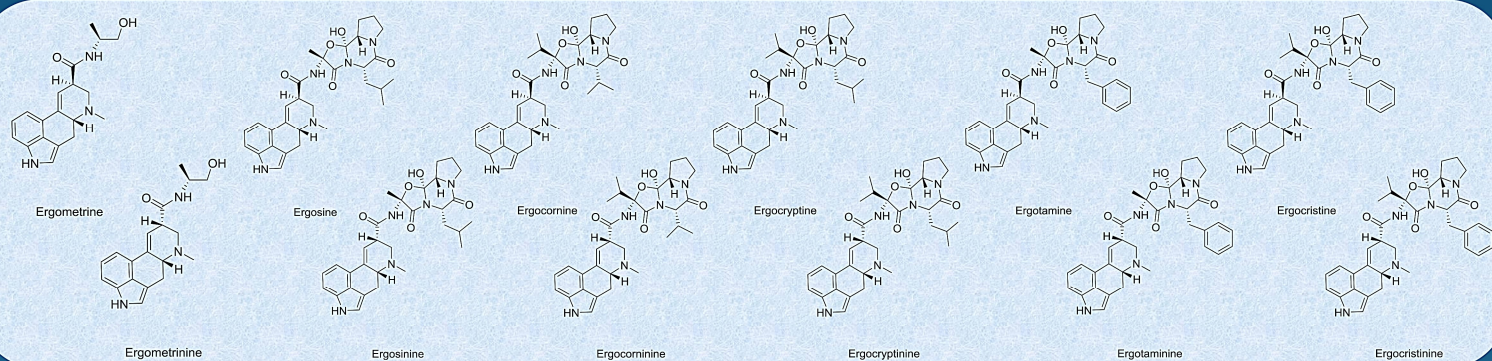


図1：麦角アルカロイド12種の構造式

【方法】

各種の検討により測定条件および前処理条件を下記のとおり設定し、本分析法の性能評価を実施した。試料には、予め選択性を評価したもの、すなわち各分析種の当該保持時間にピークが観測されない事を確認した小麦及び大麦を用意し、濃度が3 µg/kg相当となるように標準溶液を添加した。添加後ただちに抽出を開始し、調製した試験溶液をLC-MS/MS測定に供した。得られた分析結果から、真度、併行精度、室内精度及び検量線の直線性を評価した。分析点数は1人×n=5×2日間とした。

前処理方法

< Extraction >
Sample 5.00 g
Add ACN : 3 mmol/L ammonium carbonate (21:4) 25 mL
Shaking (60 min)
↓
< Purification >
Captiva EMR-Lipids (300 mg) (Agilent technologies)
Conditioning - Elution - Fill-up
↓
< Measurement >
LC-MS/MS

LC/MS 条件

- ・ LC : UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ Column : YMC-Triart C18 2.1 mm×100 mm, 1.9 µm (YMC)
- ・ Column temperature : 40 °C
- ・ Flow rate : 0.4 mL/min
- ・ Mobile phase
A : Acetonitrile
B : 3 mmol/L ammonium carbonate aq
- ・ MS : QTRAP®4500 LC-MS/MSシステム (SCIEX)
- ・ Ionization : ESI (+)
- ・ Measurement mode : SRM

Gradient Table

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	10	90
0.20	10	90
5.00	98	2
5.50	98	2
5.51	10	90
7.00	10	90

【結果・考察】

麦角アルカロイド12種の一斉分析から得られたクロマトグラムを図2に、各化合物の検量線を図3から図14に、小麦及び大麦に対する真度、併行精度、室内精度の結果を表1に示した。これは Official Methods Of Analysis Of AOAC INTERNATIONALに示された目標値を満たすものであり、良好な結果であると言える。

今回、充填剤の粒子径がサブ2 µmの分析カラムを用いることで、以前の条件と比較し、例えばErgometrineで約2倍のSN比を達成することが出来た。これにより、全ての分析種で最小濃度0.05 ng/mLからの検量線を作成することが可能となった。

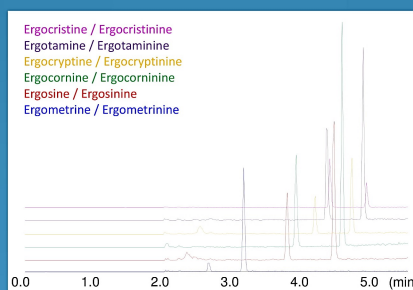


図2：麦角アルカロイド12種の一斉分析から得られたクロマトグラム

表1：小麦及び大麦に対する妥当性評価結果

化合物名	小麦			大麦		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Ergometrine	95.7	7.8	20.0	100.1	5.1	15.2
Ergometrinine	100.8	3.4	4.8	104.7	1.6	8.1
Ergosine	111.3	4.6	4.6	110.1	4.6	4.6
Ergosinine	99.9	2.4	5.5	93.8	2.0	2.0
Ergotamine	106.9	3.1	3.8	93.2	3.1	10.5
Ergotaminine	109.9	2.1	7.2	91.5	2.7	2.7
Ergocornine	107.3	5.6	9.0	110.3	3.5	3.5
Ergocorninine	105.3	4.0	10.6	107.8	5.1	5.1
Ergocryptine	101.8	4.8	5.7	105.9	3.2	6.8
Ergocryptinine	98.4	3.4	29.7	105.6	2.4	5.7
Ergocristine	102.1	4.0	4.0	95.2	4.5	4.5
Ergocristinine	96.0	7.9	21.6	97.8	8.3	17.2

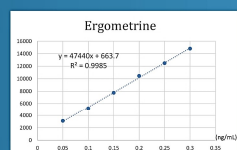


図3：Ergometrineの検量線

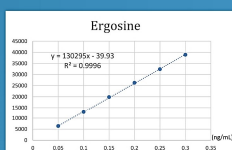


図5：Ergosineの検量線

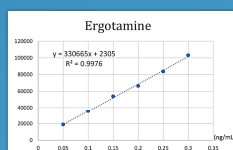


図7：Ergotamineの検量線

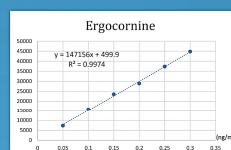


図9：Ergocornineの検量線

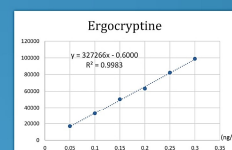


図11：Ergocryptineの検量線

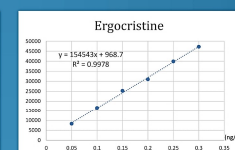


図13：Ergocristineの検量線

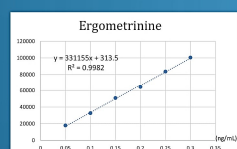


図4：Ergometrinineの検量線

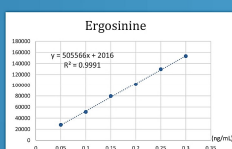


図6：Ergosinineの検量線

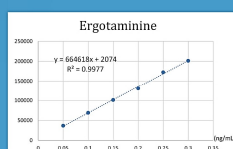


図8：Ergotaminineの検量線

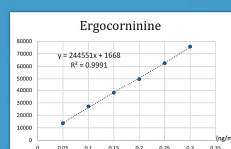


図10：Ergocorninineの検量線

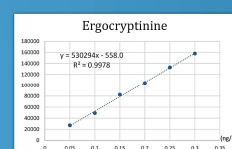


図12：Ergocryptinineの検量線

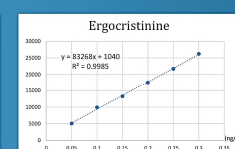


図14：Ergocristinineの検量線

【まとめ】

- ・麦角アルカロイド12種を対象としたLC-MS/MS一斉分析法の改良を行ったところ、高速高感度化に成功した。
- ・小麦及び大麦を対象に本分析法の性能評価を実施したところ、真度、併行精度、室内精度及び検量線の直線性において良好な結果が得られた。

参考文献

- 1) 第114回日本食品衛生学会 学術講演会講演要旨集、p.176(2018).
- 2) AOAC Official Methods Of Analysis Guidelines For Standard Method Performance Requirements Appendix F, p.9(2016).
- 3) Food Chemistry, **135**, p.292-303(2012).
- 4) Anal. Bioanal. Chem., **391**, p.563-576(2008).
- 5) HPLC/MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF ERGOT ALKALOIDS IN CEREALS (2007).