

9. 食品中のトロパンアルカロイド汚染実態の解明

○福光 徹、熊坂 謙一（神奈川県衛生研究所）

【研究目的】

穀類の栽培及び収穫段階において、チョウセンアサガオ属等の有毒植物の種子が混入することにより、食品へのトロパンアルカロイドの汚染が起こる事例が報告されており、EUでは特定の食品に対し基準値が設定されている¹⁾。しかし、国内では汚染実態調査の報告は少なく、規制もなされていない。そこで、国内に流通する穀類及び穀類加工品を対象に、トロパンアルカロイドの汚染実態を解明し、食の安全性確保に寄与する。

【研究の必要性】

トロパンアルカロイドは、代表的なものにアトロピン及びスコポラミンが挙げられ、食品衛生分野では、チョウセンアサガオ属等植物の誤食による食中毒の原因物質として知られている。また、そばや大豆等の穀類について、栽培及び収穫段階でチョウセンアサガオ属の種子が混入し、トロパンアルカロイドの汚染が起こる事例が報告されている。大規模な事例として、ウガンダにおいて、国連世界食糧計画から提供されたトロパンアルカロイド汚染シリアルを原因とする食中毒により、2019年3月～4月に293人が発症し、うち5人が死亡している²⁾。

EUでは、アトロピン及びスコポラミンの総量として、グループ急性参照用量が0.016 µg/kg体重と規定されている¹⁾。また、そば、とうもろこし、きび及びソルガムを主成分とする乳幼児用食品について、アトロピン及びスコポラミンの基準値がそれぞれ1.0 µg/kgと設定されているほか、未加工の上記穀物やハーブ等にもアトロピン及びスコポラミンの和として基準値が設定されている¹⁾。しかし、国内では、食品を対象としたトロパンアルカロイドの汚染実態調査の報告は少なく、食品中の含有規制値も設定されていない。また、国内では、農産物規格規定³⁾において、主要な穀類に対し異物等の混入限度が規定されているが、有毒種子等の混入について特別な規定はなく、農産物規格規定内であれば混入してしまう可能性も否定できない。

以上のことから、国内においてトロパンアルカロイドによる汚染実態調査を実施し、その汚染状況を踏まえたリスク管理を行うことは急務であると考えられる。

【研究計画】

1 LC-MS/MSによる高感度分析法の確立

分析対象とするトロパンアルカロイドは、EUにおいてグループ急性参照用量及び基準値が設定されているアトロピン及びスコポラミンに加え、アニソダミン、アニソジン及びコンボルバミンの合計5成分(図1)とした。また、既報⁴⁾を参考とし、5成分を1 µg/kgまで定量可能な食品試料からの抽出精製法及びLC-MS/MSによる測定法を確立した。分析法の検証は、代表的な試料を用いた妥当性評価により実施した。

2 汚染実態調査

海外で検出事例がある穀類や、国内において消費量の多い穀類の加工品を中心に対象食品を選定し、確立した分析法により汚染実態調査を実施した。

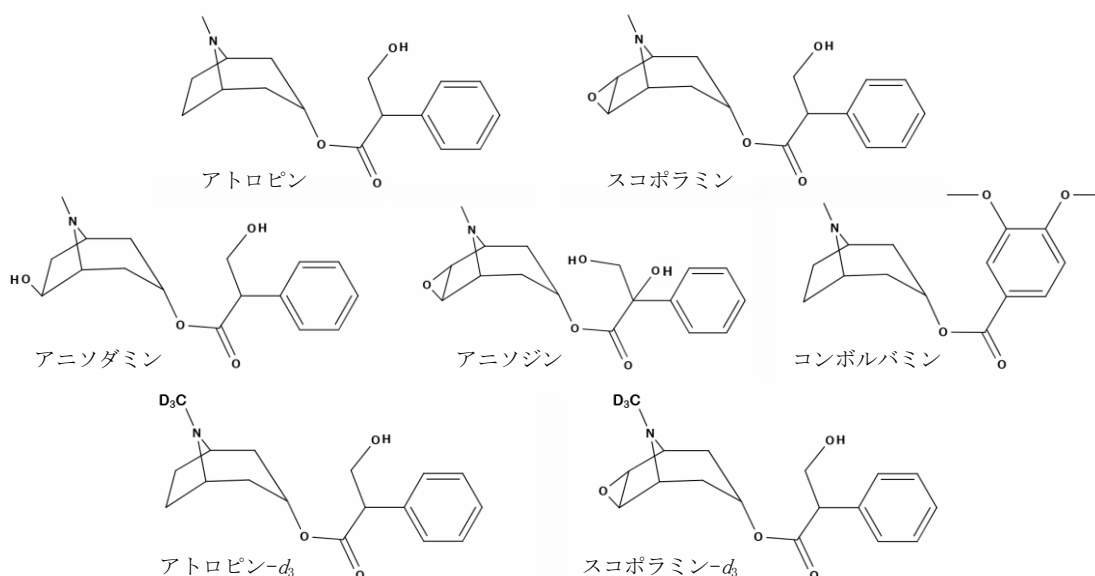


図1 トロパンアルカロイドの構造（分析対象5成分及び内部標準2成分）

【実施内容・結果】

1 方法

(1) 標準物質

Sigma-Aldrich 製のアトロピン硫酸塩一水和物及びスコポラミン臭化水素酸塩三水和物、LKT Laboratories 製のアニソダミン、PhytoLab 製のアニソジン臭化水素酸塩、ChromaDex 製のコンボルバミン塩酸塩を標準物質として用いた。各標準物質をメタノールに溶かし、各分析対象成分として同一濃度の混合標準溶液を調製した。

内部標準物質として、Toronto Research Chemicals 製のアトロピン-d₃及びスコポラミン-d₃臭化水素酸塩（水和物）を用いた。それぞれをメタノールに溶かし、内部標準溶液を調製した。

(2) 分析法（本研究により確立した分析法）

装置及び測定条件を表1及び表2に、試験溶液の調製方法を図2に示した。

(3) 定量及び確認

混合標準溶液及び内部標準溶液を0.1%ギ酸・15%アセトニトリル水溶液で希釈し、各内部標準物質を0.1 ng/mL含む6濃度の検量線用混合標準溶液(0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5及び1 ng/mL)を調製し、内部標準法により定量した。アトロピン及びコンボルバミンはアトロピン-d₃を、その他の成分はスコポラミン-d₃を内部標準とした。

なお、分析対象成分と考えられるピークが認識された検体については、標準溶液及び試験溶液のイオン比（定量及び確認イオンの面積比）を比較し、表3に示す許容範囲⁵⁾を外れる場合は不検出とした。

(4) 妥当性評価及び添加回収試験

そば（そば粉）を対象試料とし、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⁶⁾に従い本分析法の妥当性評価を実施した。試料への添加濃度は各成分

表1 装置及び測定条件

| LC | |
|----------|--|
| 装置 | ACQUITY UPLC I-Class PLUS (Waters) |
| カラム | Raptor C18 (Restek) 2.1 mmI.D. × 100 mm, 粒子径2.7 μm |
| ガードカラム | Raptor C18 EXP ガードカラムカートリッジ (Restek) 2.1 mmI.D. × 5 mm, 粒子径2.7 μm |
| カラム温度 | 40°C |
| 移動相 | A液: 0.1%ギ酸水溶液 B液: アセトニトリル |
| グラジエント | B液%: 0分 (5%) - 4分 (5%) - 6分 (15%) - 9分 (90%) (直線グラジエント) |
| 流量 | 0.3 mL/min |
| 注入量 | 2 μL |
| MS/MS | |
| 装置 | Xevo TQ-XS (Waters) |
| キャピラリー電圧 | 1 kV |
| イオン源温度 | 150°C |
| 脱溶媒ガス温度 | 500°C |
| コーンガス流量 | 150 L/hr |
| 脱溶媒ガス流量 | 1,000 L/hr |
| イオン化法 | ESI+ |
| 分析モード | 選択反応モニタリング (SRM) |

表2 保持時間及びMS/MS条件

| 分析対象成分 | 保持時間 (分) | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | |
|-----------------------|-----------|---------------------|-------------------|-------|
| | | | 定量 | 確認 |
| アニソジン | 1.8 | 320.1 | 156.1 | 119.0 |
| アニソダミン | 3.5 / 5.1 | 306.2 | 140.1 | 122.1 |
| スコポラミン | 4.0 | 304.2 | 156.1 | 103.1 |
| アトロピン | 6.5 | 290.2 | 124.1 | 93.1 |
| コンボルバミン | 7.2 | 306.2 | 124.1 | 93.1 |
| スコポラミン-d ₃ | 4.0 | 307.2 | 159.1 | 141.1 |
| アトロピン-d ₃ | 6.5 | 293.2 | 127.1 | 93.1 |

表3 標準溶液に対する試験溶液のイオン比の許容範囲

| 標準溶液のイオン比 | 試験溶液のイオン比の許容範囲 |
|------------|----------------|
| >50% | ± 20% |
| >20% ~ 50% | ± 25% |
| >10% ~ 20% | ± 30% |
| ≤10% | ± 50% |

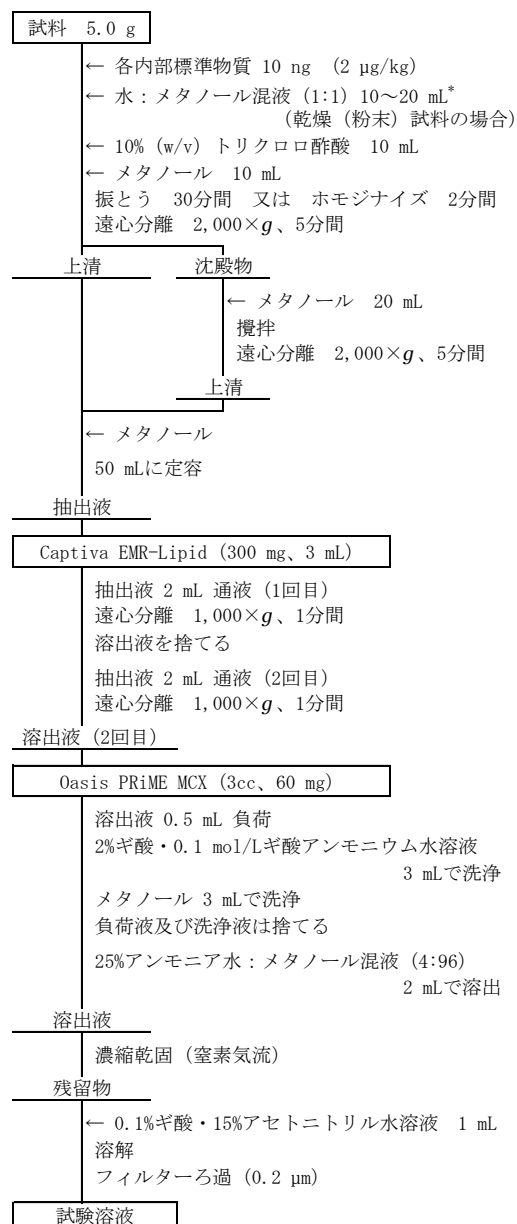


図2 試験溶液の調製方法

*おからは20 mL、その他乾燥試料は10 mL

1 μg/kg とした。1 回 5 併行の添加回収試験により併行精度 (RSD、目標値: 30%未満) を、異なる 5 日における各 1 併行の添加回収試験により室内精度 (RSD、目標値: 35%未満) を、全試行の結果を用いて真度 (回収率、目標値: 70%~120%) を評価した。また、添加濃度に相当する標準溶液 0.05 ng/mL と比較し、選択性 (目標値: 試料の妨害ピーク面積が標準溶液のピーク面積の 1/3 未満) を評価した。さらに、添加回収試料 (1 μg/kg) のピークから定量限界 (目標値: S/N 比が 10 以上) を評価した。そば粉以外の試料として、大豆、そば、とうもろこし及びオーツ麦を原材料とする 10 試料について、同濃度で添加回収試験を実施し、回収率のみ確認した。なお、各試料に添加した内部標準物質の回収率は、検量線用混合標準溶液における内部標準物質のピーク面積値との比較により算出し、目標値を 40%以上⁶⁾とした。

(5) 汚染実態調査試料

大豆、そば、とうもろこし及びオーツ麦について、簡易な加工品を中心に99検体を対象とした(表4)。各検体は、2022年～2023年に神奈川県内の販売店又はインターネット販売店から購入した。粉末状の検体についてはそのまま均一化、その他の形態の検体についてはフードミルで粉砕又は細切均一化して使用した。

2 結果

(1) 分析法の検討

簡便な植物性自然毒一斉分析法である既報⁴⁾を参考とし、分析法を検討した。様々な試料についてトロパンアルカロイド5成分を1 µg/kgまで

定量可能な分析法を確立するため、既報⁴⁾に陽イオン交換ミニカラム(Oasis PRiME MCX)による精製を追加した。その結果、妨害ピークが軽減されるとともに、試験溶液の希釈率の低下によりピーク面積値が増加し、1 µg/kgの安定した定量が可能となった。

(2) 妥当性評価及び添加回収試験

そば粉を用いた妥当性評価の結果は、真度 70.5%～98.9% (内部標準物質の回収率: 92.9%、94.0%) (表5)、併行精度 1.7%以下、室内精度 6.5%以下であり、選択性及びS/N比も含めガイドライン⁶⁾の目標値を満たした。その他の10試料の添加回収試験についても、すべて回収率の目標値を満たした(表5)。また、検量線はいずれの成分も $r^2 \geq 0.999$ を満たす良好な直線性を示した。以上のことから、本分析法は本汚染実態調査(定量限界: 1 µg/kg)に適用可能と判断した。

なお、調査対象の99検体について、内部標準物質の回収率は65.1%～102.6%であり、

表4 調査対象検体

| 分類・検体数 | 検体 | 検体数 | | | |
|--------------|---------|--------|-------|----|----|
| | | 合計* | 原料原産地 | | |
| | | | 海外 | 国内 | 不明 |
| 大豆 18 | 大豆粉 | 2 | 1 | 1 | |
| | きな粉 | 11 | 5 | 6 | |
| | 大豆肉 | 3 (1) | 1 | 1 | 1 |
| | 大豆茶 | 1 | | 1 | |
| | おから | 1 | 1 | | |
| そば 42 | そばの実 | 13 | 7 | 6 | |
| | そば粉 | 11 | 5 | 6 | |
| | そば茶 | 9 | 3 | 6 | |
| | 干しそば | 6 (2) | 4 | 2 | |
| | シリアル | 2 (1) | 1 | 1 | |
| | ガレット粉 | 1 (1) | 1 | | |
| とうもろこし 23 | とうもろこし粉 | 5 | 3 | 2 | |
| | コーンスターチ | 7 | 7 | | |
| | コーンフレーク | 6 (6) | 5 | | 1 |
| | コーン茶 | 5 | 4 | 1 | |
| オーツ麦 16 | オートミール | 13 (1) | 13 | | |
| | シリアル | 3 (3) | 3 | | |

*「分類」に示した穀類以外が原材料に使用されている検体の数(内数)を()内に示した

表5 添加回収試験結果

| 分類 | 試料 | 回収率*1 (%) | | | | | | |
|--------|-------------------|-----------|----------|--------|-------|---------|-----------------------|----------------------|
| | | 分析対象成分 | | | | 内部標準物質 | | |
| | | アニソジン | アニソダミン*2 | スコボラミン | アトロピン | コンボルバミン | スコボラミン-d ₃ | アトロピン-d ₃ |
| 大豆 | 大豆粉 | 105.5 | 98.2 | 91.0 | 101.6 | 85.0 | 78.1 | 85.0 |
| | きな粉 | 97.5 | 91.0 | 89.0 | 110.1 | 84.0 | 88.1 | 85.8 |
| | 大豆肉 | 97.6 | 91.7 | 93.6 | 98.8 | 83.7 | 94.0 | 89.4 |
| そば | そば粉 ³⁾ | 70.5 | 92.2 | 98.9 | 94.9 | 85.6 | 94.0 | 92.9 |
| | そば茶 | 90.4 | 90.6 | 85.7 | 98.2 | 87.2 | 86.0 | 77.9 |
| | シリアル | 95.7 | 86.0 | 94.4 | 98.3 | 81.6 | 91.7 | 93.1 |
| とうもろこし | とうもろこし粉 | 90.3 | 86.4 | 90.4 | 94.4 | 82.3 | 96.5 | 94.1 |
| | コーンフレーク | 104.1 | 99.4 | 97.2 | 107.4 | 89.8 | 83.8 | 85.5 |
| | コーン茶 | 88.4 | 98.6 | 94.9 | 92.2 | 84.2 | 79.5 | 75.8 |
| オーツ麦 | オートミール | 101.3 | 94.7 | 95.9 | 105.9 | 91.3 | 95.7 | 92.5 |
| | シリアル | 105.4 | 97.7 | 100.0 | 103.5 | 90.2 | 90.2 | 91.1 |

*1 試料への添加濃度及び定量 分析対象成分: 1 µg/kg 内部標準法
内部標準物質: 2 µg/kg 標準溶液のピーク面積値と比較

*2 ピークが2本検出されたため、合算して定量

*3 妥当性評価の真度(平均回収率)を記載

すべて目標値を満たしたことから、本分析法の採用は妥当であったと考えた。

(3) 汚染実態調査

99 検体の分析の結果、いずれの検体からも 1 µg/kg を超える成分は検出されなかった。ただし、海外産のオーツ麦（オートミール）1 検体から、1 µg/kg 未満のアトロピン及びスコポラミンが検出された。なお、本検体にはオーツ麦以外の原材料は使用されていなかった。

【考察と今後の課題】

本研究の結果、穀類を原材料とする 99 検体から定量限界を超えるトロパンアルカロイドは検出されなかった。また、国産の大豆及びそばを対象とした農林水産省による予備的な調査においても、汚染はきわめて少ないことが確認されていることから⁷⁾、健康への影響が懸念される濃度のトロパンアルカロイドに汚染された穀類が国内に流通する可能性は低いと考えられた。ただし、海外産のオーツ麦（オートミール）から、定量限界未満ではあるもののアトロピン及びスコポラミンが検出されたことを考慮すると、国内流通食品の汚染リスクが全くないとはいえない。そのため、今後も汚染状況をモニタリングし、リスク管理のための情報を蓄積していく必要があると考える。

【参考文献】

- 1) European Commission Regulation (EU) 2021/1408, L 304/1-4, 27 August 2021.
- 2) Mutebi, R. R., et al. Large outbreak of Jimsonweed (*Datura stramonium*) poisoning due to consumption of contaminated humanitarian relief food: Uganda, March-April 2019. BMC public health, 22(1), 1-10 (2022).
- 3) 農産物規格規定、農林水産省告示第 244 号、平成 13 年 2 月 28 日（最終改正：農林水産省告示第 797 号、平成 25 年 3 月 29 日）
- 4) 南谷臣昭ほか：令和元年度厚生労働科学研究費補助金 植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究 研究分担報告書、10-78
- 5) European Commission Decision 2002/657/EC, L 221/8-36, 12 August 2002.
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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の一部改正について、食安発 1224 第 1 号、平成 22 年 12 月 24 日
- 7) 第 55 回かび毒・自然毒等専門調査会説明資料（食品安全委員会）、令和 4 年 7 月 13 日

【経費使途明細】

| 使 途 | 金 額 |
|-------------------------|-----------|
| 試薬（標準品） | 78,210 円 |
| 試薬（抽出用試薬） | 6,336 円 |
| 器材（抽出用ミニカラム、分析用カラム等） | 160,435 円 |
| 食品検体（そば、大豆、とうもろこし、オーツ麦） | 52,968 円 |
| 振込手数料 | 2,080 円 |
| 合 計 | 300,029 円 |
| 大同生命厚生事業団助成金 | 300,000 円 |