

グロリオサ及びイヌサフラン中のコルヒチン分析

小山和志¹・鎌田光貴¹・宮川あし子¹・高橋佳代子^{1,2}・宇都宮れい子^{1,3}・土屋としみ¹

令和元年度地方衛生研究所全国協議会地域保健総合推進事業に係る関東・甲・信・静ブロック精度管理事業を実施するにあたり、精度管理テーマの一つであるグロリオサ塊茎（球根）に含まれるコルヒチンの分析法を検討した。また、その分析法により市販グロリオサ塊茎及び栽培イヌサフラン（別名：コルチカム）地上部に含まれるコルヒチンを分析し、若干の知見が得られたので報告する。

キーワード：コルヒチン，グロリオサ，イヌサフラン，LC-MS/MS法

1 はじめに

地方衛生研究所全国協議会では、地域保健総合推進事業の一環として、健康危機事例への対応能力の向上を目的に、地域ブロックごとに模擬訓練又は精度管理事業を実施している。

令和元年度関東・甲・信・静ブロックの精度管理は、有毒植物の誤食による食中毒を想定した模擬訓練を実施し、参加機関の健康危機対応能力の向上を図ることを目的に、当研究所がその立案・取りまとめ等の事務を担当した。有毒植物としては、コルヒチンを含むグロリオサ塊茎を想定した。

グロリオサはコルヒチンを含むユリ科の園芸植物であり、塊茎はヤマイモに類似しているため、誤食により死亡事故が発生し^{1),2),3),5)}、また、自殺に使用されたとの報告⁴⁾もある。コルヒチンは同科のイヌサフランにも含まれる。イヌサフランは、多年生の球根植物であり、その地上部をギョウジャニンニクに、球根をイモと誤って食したことによる死亡事故が発生している^{1),2),3),6)}。それらの塊茎又は球根はインターネット通販等で簡単に入手できる。コルヒチンは医薬品として痛風の発作時等に用いられる⁷⁾こともあるが、ヒトにおける最小致死量は体重 50 kg の場合で 4.3 mg 程度 (4.3mg/50kgBW) とされ⁶⁾ 毒性も強い。

当該事業の実施にあたり、コルヒチンの分析については汎用の高速液体クロマトグラフ法（以下 HP LC 法）や感度・選択性に優れた液体クロマトグラフトリプル四重極質量分析法（以下 LC-MS/MS 法）による報告等があるが^{8),9)}、今後の自然毒関係の検査項目の追加を視野に入れ、LC-MS/MS 法で検討した。また、その分析法で市販グロリオサ塊茎

及び栽培イヌサフラン地上部の分析を行った。

分析法の検討並びにグロリオサ及びイヌサフランの分析により、分析法の評価及びコルヒチン含有量等について、若干の知見が得られたので報告する。

2 分析方法

2.1 検体

2.1.1 グロリオサ塊茎

通信販売で入手したグロリオサの塊茎 5 検体の冷凍保存品を用いた。また、ブランク及び添加回収試験には、当研究所薬草園栽培でコルヒチンを含まず性状が類似したシャクヤク根の冷凍保存品を用いた。

2.1.2 イヌサフラン地上部

県内栽培で別々の株から採取したイヌサフランの地上部 6 検体の冷蔵保存品を用いた。また、ブランク及び添加回収試験には県内栽培でコルヒチンを含まず性状が類似したギョウジャニンニク地上部の冷凍保存品を用いた。

2.2 試薬及び標準品

2.2.1 試薬

蒸留水：LC/MS 用（関東化学）

メタノール：LC/MS 用（関東化学）、残留農薬試験用（関東化学）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学）

2.2.2 標準品

1 長野県環境保全研究所 食品・生活衛生部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

2 現：長野県長野保健福祉事務所 検査課 〒380-0936 長野市中御所岡田 98-1

3 現：退職

コルヒチン：純度>97.0% (HPLC) (東京化成工業)

2.3 試料溶液の調製

検体を次の操作により均一化して試料とした。グロリオサ塊茎及びシャクヤク根は包丁で数mm角のみじん切りにし混合した。イヌサフラン地上部及びギョウジャニンニク地上部は7~8mm角のざく切りにして混合した。

その試料から図1に示したフローにより分析用試料溶液を調製し、LC-MS/MS法で分析を行った。

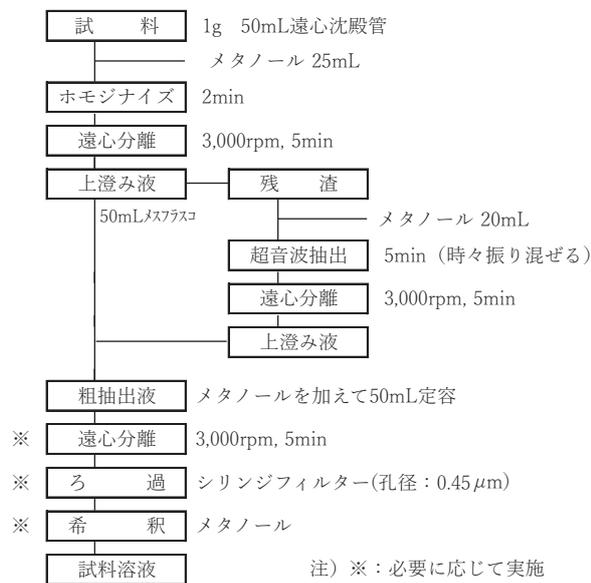


図1 試料溶液調製フロー

2.4 分析装置及び操作条件

LC-MS/MS

LC部：Nexera XR (島津製作所)

MS/MS部：LCMS-8050 (島津製作所)

2.4.1 分析装置

LC部

カラム：Inertsil ODS-3(2.1mmI.D.×150mmL, 3µm), (ジーエルサイエンス)

カラム温度：40°C

移動相：5mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液及び5mmol/L酢酸アンモニウム溶液(5:95)を5分間維持し、(100:0)までの濃度勾配を25分間で行い、(100:0)で5分間保持した。

流量：0.2mL/min

注入量：5µL

MS/MS部

イオン化モード：ESI (+)

ネブライザーガス流量：3 L/min

ドライイングガス流量：10 L/min

ヒーティングガス流量：10 L/min

ヒートブロック温度：400°C

DL温度：250°C

インターフェース温度：300°C

CIDガス：アルゴン, 270kPa

SRM条件：表1に示した。

表1 SRM条件

	プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	コリジョン エネルギー(V)
定量用	400	358	23
確認用1	400	310	27
確認用2	400	326	26

2.5 検量線の作成

コルヒチンをメタノールで溶かし、0.5~100ng/mLの標準溶液列を調製した。その溶液列をLC-MS/MSに注入し、ピーク面積から絶対検量線を作成した。

2.6 定量下限値

定量下限値：0.006mg/g

3 結果及び考察

3.1 分析方法

3.1.1 試料溶液の調製及び抽出効率

試料からの抽出は、抽出効率等を考慮し、ホモジナイズ及び超音波洗浄器を用いた超音波照射の2種類の方法を組み合わせた。その詳細は図1に示した。

その抽出効率を確認するため、グロリオサ塊茎の検体 No.5 を除き、メタノール共存下でホモジナイズ及び超音波照射による抽出後に得られた粗抽出液の抽出残渣にメタノール約20mLを加え、時々振り混ぜながら5分間超音波照射し、メタノールで25mLに定容した液について、試料と同様の分析でコルヒチン濃度を求めた。その結果から抽出効率を算

出したところ、グルリオサ塊茎は平均 99%, CV 0.2%, イヌサフラン地上部では平均 99%, CV 0.2% で共に良好であった。

3.1.2 分析装置及び操作条件の検討

コルヒチン等自然毒の分析は、緊急対応が想定される。そこで装置操作条件は、装置の洗浄・コンディショニング等に係る時間の短縮により、速やかに自然毒の分析に移行できるよう、当研究所の農産物中の残留農薬分析に係る条件¹⁰⁾を基本にした。

LC 部では分析カラムに当研究所で一般的に使用している ODS の Inertsil ODS-3 (2.1mmI.D.×150mmL. 3μm) を用いた。移動相は 5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液及び 5mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で、試料由来のマトリックスが不明なためグラジエントとした。グラジエント条件はコルヒチン以外の自然毒の追加を念頭に、30 分以内に低極性物質から高極性物質が分離できる条件とした。

MS/MS 部では、「M+H」⁺ をプリカーサーイオンとし、500ng/mL コルヒチン標準溶液を LC-MS/MS に導入してパラメータの最適化により、プロダクトイオン等を決定した。また、各トランジションに係る LC-MS/MS からの指示値 (ピーク面積) 等を考慮して定量用、確認用を決定した。この SRM 条件は分析装置等の違いによるものか既報等^{8),9)}とは異なっていた。

3.1.3 検量線

コルヒチン濃度として 0.5~100ng/mL の標準溶液列を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積から絶対検量線を作成した。その結果、図 2 に示すように 0.5~25ng/mL 程度の濃度範囲で検量線の直線性が確認できた。しかし、この範囲での分析には、各試料粗抽出液をそれぞれ数 100~数 1,000 倍に希釈する必要があった。希釈倍率は分析装置のキャリーオーバー等を考慮しながら段階的に決める必要があるため、かなり煩雑であった。

なお、装置コンディション等により、直線性の得られた濃度範囲がわずかに変動することがあった。

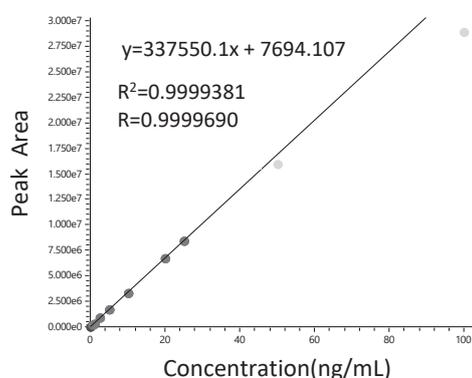


図 2 コルヒチンの検量線

3.1.4 添加回収試験

各ブランク試料 1g に 100μg のコルヒチンを添加

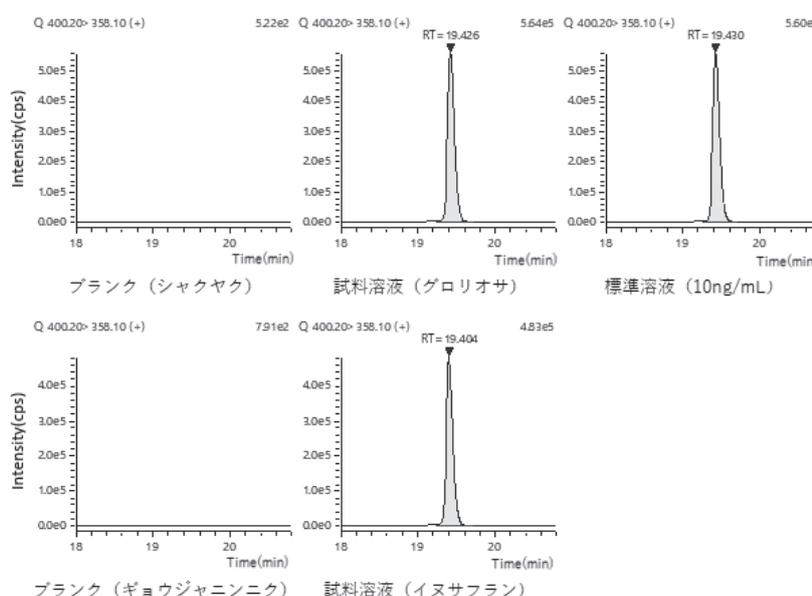


図 3 LC-MS/MS (SRM) クロマトグラム例

し、3 併行で添加回収試験を実施した。その結果はグロリオサで平均回収率 99%、CV 0.9%、イヌサフランで平均回収率 97%、CV 3.5%であり共に良好であった。また、両ブランクに妨害となるピークはなかった。クロマトグラムを図 3 に示した。

3.1.5 定量下限値

コルヒチン濃度 2.5ng/mL の標準溶液を 5 回分析し、対応する試料濃度を求めた。その濃度の標準偏差の 10 倍 (10 σ) を定量下限値とした。定量下限値は 0.006mg/g であり、十分な感度が確認できた。

3.2 分析結果

3.2.1 グロリオサ塊茎

No.5 を除く各検体は、塊茎の長手方向中央付近から左右 2 分割し、それぞれの分析を行った。その結果を表 2 に示した。コルヒチン濃度は各試料左右の平均で最大 1.25mg/g、最小で 0.47mg/g であり、3 倍弱の差があった。

最小致死量 (4.3mg/50kgBW) と比較すると、最大濃度の場合には約 3.4g、最小濃度でも約 9.1g の少量の誤食で到達することになる。

左右で数 10% の濃度差があるため、塊茎内の濃度分布は均一でないことが考えられた。

表 2 グロリオサ塊茎の分析結果

No.	重量(g)	コルヒチン濃度 (mg/g)			備 考
		右側	左側	平均	
1	36.4	0.41	0.53	0.47	品種：ファイヤーパート
2	9.7	0.47	0.60	0.54	品種：アフリカーナ
3	7.2	1.18	1.08	1.13	品種：ピンク
4	13.4	1.35	1.15	1.25	品種：ファイヤーパート
5	18.0	0.58*		0.58	品種：ファイヤーパート
平均				0.79	

注) *: 3 併行の平均値, CV 1.0%

3.2.2 イヌサフラン

県内で栽培されたイヌサフラン 6 株の地上部の分析結果を表 3 に示した。コルヒチン濃度は、平均で 0.51mg/g であった。また、最大は 0.67mg/g、最小で 0.26mg/g であり、約 2.6 倍の差があった。

最小致死量 (4.3mg/50kgBW) と比較すると、最大濃度の場合には約 6.4g、最小濃度でも約 16.5g の誤食で到達することになる。

表 3 イヌサフラン地上部の分析結果

No.	性 状			コルヒチン濃度(mg/g)
	長さ(cm)	幅(cm)	重量(g)	
1	22.5	4.1	3.2	0.26
2	20.5	4.8	2.9	0.51
3	20.8	2.6	1.6	0.62
4	18.5	2.1	1.3	0.67
5	16.8	3.6	1.9	0.45
6	15.6	1.2	0.6	0.58
平均				0.51

4 まとめ

植物性自然毒による食中毒のうち、死亡等重篤な健康被害が発現することの多いグロリオサ塊茎中のコルヒチンについて、LC-MS/MS を用いた分析法を検討したところ、良好な結果が得られたため、市販品の分析を行った。また、その方法をイヌサフラン地上部の分析に適用したところ、同様に良好な結果が得られたため、県内で栽培されたイヌサフラン地上部の分析を行った。

これらの分析法の検討及び分析をとおして次の知見が得られた。

- (1) 検量線はコルヒチン濃度 0.5~25ng/mL の間で直線性が確認できた。また、定量下限値は 0.006mg/g であった。
- (2) 粗抽出液の抽出残渣を分析し、この分析法の抽出効率を求めたところ、グロリオサ塊茎及びイヌサフラン地上部共に 99% 以上であった。
- (3) 添加回収試験の結果は、グロリオサで平均回収率 99%、CV 0.9%、イヌサフランで平均回収率 97%、CV 3.5% であり共に良好であった。また、両ブランクに試験において妨害となるピークはなかった。
- (4) 市販グロリオサ塊茎 5 検体のコルヒチン濃度は、平均 0.79mg/g であった。濃度の最大は 1.25mg/g、最小 0.47mg/g であり、検体間で 3 倍弱の差があった。また、左右で 2 分割した検体の分析結果から、塊茎内の濃度分布は不均一だと考えられた。
- (5) 栽培イヌサフラン 6 検体中のコルヒチン濃度は、平均 0.51mg/g であった。また、濃度の最大は 0.67mg/g、最小 0.26mg/g であり、検体間で約

- 2.6 倍の差があった。
- (6) 誤食した場合には、グロリオサ塊茎約 3.4g～9.1g、イヌサフラン地上部約 6.4g～16.5g の比較的少量で最小致死量 (4.3mg/50kgBW) に到達することが分かった。
- (7) LC-MS/MS 法は感度や選択性に優れる。しかし、比較的高濃度に含まれるコルヒチン分析においては、検量線の直線性等を考慮した試料溶液の希釈の煩雑さ、それによる希釈誤差等を考慮した場合、汎用される HPLC 法と比べて適用性に劣る面があった。今後、成分濃度に応じた分析装置の使い分けを検討したい。
- (8) グロリオサ塊茎等に含まれるコルヒチンの分析法を確立することができたが自然毒は多種多様であるため、毒性や中毒発生状況等を勘案しながら分析対象項目を増やしていきたい。

文 献

- 1) 登田美桜・畝山智香子ら (2014) 過去 50 年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向, 食品衛生学雑誌, 55: 55-63.
- 2) 厚生労働省ホームページ, 4.食中毒統計資料: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-3 (令和 2 年 12 月確認).
- 3) 国立保健医療科学院ホームページ, 健康被害危機管理事例データベース: <https://h-crisis.niph.go.jp/?cat=18> (令和 2 年 12 月確認).
- 4) 桑原佑典・朱祐珍ら (2017) グロリオサの球根を自殺目的に摂取し死亡したコルヒチン中毒の 1 例, 日本救急医学学会雑誌, 28: 812-817.
- 5) 厚生労働省ホームページ, 自然毒のリスクプロファイル: 高等植物: グロリオサ: <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000082123.html> (令和 2 年 12 月確認).
- 6) 厚生労働省ホームページ, 自然毒のリスクプロファイル: 高等植物: イヌサフラン: <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000058791.html> (令和 2 年 12 月確認).
- 7) 医薬品インタビューフォーム, コルヒチン錠 0.5mg「タカタ」, 2018 年 1 月改訂 (第 6 版).
- 8) (公社) 日本食品衛生協会, 食品衛生検査指針理化学編 (2015): 931-936
- 9) 影山温子・平松佐穂ら (2017) グロリオサ塊茎中の自然毒成分 (コルヒチン) 含有量検査に係る精度管理について, 高知研衛生研究所報, 63: 33-39.
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 (平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号)「食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(別添) 第 2 章一斉試験法 LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物).

Analysis of colchicine in plants, *Gloriosa* and *Colchicum*

Kazushi KOYAMA¹, Koki KAMATA¹, Ashiko MIYAGAWA¹, Kayoko TAKAHASHI^{1,2},
Reiko UTSUNOMIYA^{1,3} and Toshimi TSUCHIYA¹

1 Food and Pharmaceutical Sciences Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan

2 Present address: Inspection Division, Nagano Health and Welfare Office, 98-1 Okada, Nakagosho, Nagano 380-0936, Japan

3 Present address: Retirement